

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET  
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU

Anet Režek Jambrak

**UTJECAJ ULTRAZVUKA NA FIZIKALNA I  
FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA SIRUTKE**

DISERTACIJA

Zagreb, studeni, 2008.

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni poslijediplomski studij  
Nutricionizam

Disertacija

UDK: 637.344:534-8(043.3)  
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ ULTRAZVUKA NA FIZIKALNA I FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA SIRUTKE

Anet Režek Jambrak, dipl. ing

Rad je izrađen na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te na Coventry University (Sonochemistry Centre), Coventry, Velika Britanija

Mentor: Dr.sc. Vesna Lelas, red.prof.

### Kratki sažetak:

Primjena ultrazvuka predstavlja novu metodu ne-toplinske obrade hrane, te se zbog toga željela iskoristiti kao brza metoda, niske energetske potrošnje i vremena tretiranja u usporedbi s tradicionalnim metodama (nekoliko sati obrade). Obrada medija ovim postupkom traje nekoliko minuta i predstavlja novi način obrade sirovine koja se može iskoristiti u dobivanju novih proizvoda i unaprjeđenje tehnološkog postupka što je i svrha rada. U radu se željelo istražiti na koji način ultrazvuk različitih frekvencija, snaga i duljine trajanja tretiranja može utjecati na pojedina funkcionalna svojstva proteina sirutke te modelnih sustava pripremljenih sa proteinima sirutke i različitim dodacima kao što su guar guma, metil celuloza, saharoza te mlijeko u prahu.

Ispitivanja su vršena na materijalima izolata, koncentrata, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina. Korištene su ultrazvučne sonde od 20 kHz i 30 kHz, te ultrazvučne kupelji od 40 kHz i 500 kHz. Vrijeme tretiranja sa ultrazvukom od 20 kHz, 40 kHz i 500 kHz bilo je 15 i 30 minuta, a sa sondom od 30 kHz 3, 5 i 10 minuta. Ispitivana su svojstva topljivosti, pjenjenja i emulgiranja proteina sirutke, promjene pH vrijednosti suspenzija, elektroprovodljivosti i temperature suspenzija nakon tretmana. Također je ispitan utjecaj ultrazvučnog vala na veličinu čestica, molekularnu masu proteina putem gel elektroforeze, te na viskoznost i termofizičke značajke suspenzija.

Ispitivanjem je utvrđeno da tretmani ultrazvukom imaju različite utjecaje na fizikalna i funkcionalna svojstva istraživanih sustava. Na osnovu dobivenih rezultata tretiranjem ultrazvukom od 20 kHz i od 40 kHz kod svih uzoraka proteina, ultrazvuk je uzrokovao smanjenje veličine čestica, te suzio njihovu raspodjelu, osim kod hidrolizata proteina sirutke, a došlo je i do poboljšanja kapaciteta pjenjenja i stabilnosti pjena, te vrijednosti indeksa aktiviteta emulzija. Dodatak metil celuloze, guar gume, saharoze i mlijeka u prahu u modelne sustave, te tretman ultrazvukom od 30 kHz pokazao je različit utjecaj na pojedina ispitivana svojstva.

**Broj stranica: 194**

**Broj slika: 75**

**Broj tablica: 30**

**Broj literaturnih navoda: 194**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi: ultrazvuk visoke snage, ultrazvuk niske snage, proteini sirutke, funkcionalna svojstva, fizikalna svojstva**

**Datum obrane: 27.11.2008**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr.sc. Branko Tripalo, red.prof., PBF, Zagreb
2. dr.sc. Vesna Lelas, red. prof., PBF, Zagreb
3. dr.sc. Greta Krešić, doc., Fakultet za menadžment u turizmu i ugostiteljstvu, Opatija (FMTU)
4. dr.sc. Rajka Božanić, izv.prof., PBF, Zagreb
5. dr.sc. Mladen Brnčić, doc., PBF, Zagreb
6. dr.sc. Ljubica Tratnik, red.prof., PBF, Zagreb (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23. i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb; Sveučilištu u Zagrebu, Trg maršala Tita 14; Sveučilištu u Rijeci, Riječke rezolucije 7; Sveučilištu u Splitu, Livanjska 5 i Sveučilištu u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

---

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Postgraduate study in Nutrition Science**

**Ph.D. thesis**

**UDK: 637.344:534-8(043.3)**  
**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### **ULTRASONIC EFFECT ON PHYSICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF WHEY PROTEINS**

**Anet Režek Jambrak, B.Sc.**

**Thesis performed at Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb and at Coventry University (Sonochemistry Centre), Coventry, United Kingdom**

**Supervisor: Full professor Vesna Lelas, Ph.D.**

#### **Short abstract:**

Application of ultrasound in food processing presents novel non-thermal method, with low energy consumption and short treatment time as compared to traditional technological processes. Treatment with this procedure takes few minutes and presents novel method for food processing that can be used for new product development as improvement of technological process what is the purpose of this thesis. The main aim of this thesis was to investigate in what way various ultrasound treatments, with usage of different ultrasound frequencies, power and treatment time, affects functional and physical properties of whey proteins and model systems prepared with whey proteins and diverse supplements like guar gum, methyl cellulose, sucrose and milk powder.

The examinations were conducted on powdered whey protein isolates, concentrates, hydrolysates and  $\alpha$ -lactalbumin samples. Ultrasound probes of 20 kHz and 30 kHz frequency were used, as well as ultrasound baths of 40 kHz and 500 kHz frequency. Treatment times with ultrasound of 20 kHz, 40 kHz and 500 kHz were 15 and 30 minutes, and with 30 kHz probe 3, 5 and 10 minutes. Investigated whey protein and model system properties were: solubility, foaming and emulsifying properties, pH, conductivity and temperature changes after treatments. Then, the effect of ultrasound on particle size, protein molecular weight using gel electrophoresis, and changes in viscosity and thermophysical properties of suspensions have been investigated.

The obtained results showed that ultrasound treatments have different influence on physical and functional properties of investigated systems. Ultrasound treatment with 20 kHz and 40 kHz frequencies caused significant reduction in particle size, and narrowed their distribution, except for whey protein hydrolysates. The same treatment caused improvement in foam capacity and stability, and also increases emulsion activity indexes. Addition of methyl cellulose, guar gum, sucrose and milk powder in combination with ultrasound treatment with 30 kHz showed different influence on investigated properties.

**Number of pages: 194**

**Number of figures: 75**

**Number of tables: 30**

**Number of references: 194**

**Original in: Croatian**

**Key words: high power ultrasound, low power ultrasound, whey proteins, functional properties, physical properties**

**Date of the thesis defence: 27.11.2008**

**Reviewers:**

- 1. Branko Tripalo, Ph.D., Full professor, PBF, Zagreb**
- 2. Vesna Lelas, Ph.D., Full professor, PBF, Zagreb**
- 3. Greta Krešić, Ph.D., Assistant professor, Faculty for tourism and catering industry management, Opatija (FMTU)**
- 4. Rajka Božanić, Ph.D., Full professor, PBF, Zagreb**
- 5. Mladen Brnčić, Ph.D., Assistant professor, PBF, Zagreb**
- 6. Ljubica Tratnik, Ph.D., Full professor, PBF, Zagreb (in substitution)**

**Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23. and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb; University of Zagreb, Trg maršala Tita 14; University of Rijeka, Riječke rezolucije 7; University of Split, Livanjska 5 and University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3.**

Tema rada prihvaćena je na 9. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj dana 19. lipnja 2008.

## SAŽETAK

U ovom radu željelo se istražiti na koji način djelovanje ultrazvuka različitih frekvencija, snaga i duljine trajanja tretiranja može utjecati na pojedina funkcionalna svojstva proteina sirutke te modelnih sustava pripremljenih sa proteinima sirutke i različitim dodacima kao što su guar guma, metil celuloza, saharoza te mlijeko u prahu.

Ispitivanja su vršena na materijalima izolata, koncentrata, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina. Korištene su ultrazvučne sonde od 20 kHz i 30 kHz, te ultrazvučne kupelji od 40 kHz i 500 kHz. Vrijeme tretiranja sa ultrazvukom od 20 kHz, 40 kHz i 500 kHz bilo je 15 i 30 minuta, a sa sondom od 30 kHz 3, 5 i 10 minuta. Ispitivana su svojstva topljivosti, pjenjenja i emulgiranja proteina sirutke, promjene pH vrijednosti suspenzija, elektroprovodljivosti i temperature suspenzija nakon tretmana. Također je ispitan utjecaj ultrazvučnog vala na veličinu čestica, molekularnu masu proteina putem gel elektroforeze, te na viskoznost i termofizičke karakteristike suspenzija. Upotrebom sonde od 30 kHz, visokog intenziteta, ispitan je utjecaj ultrazvuka na kompleksne sustave izolata i koncentrata proteina sirutke s različitim dodacima. Sustavi su sadržavali proteine i dodatke guar gume, metil celuloze, saharoze ili mlijeka u prahu. Ispitivan je utjecaj na topljivost proteina u tim sustavima, svojstava pjenjenja, emulgiranja, te na reološke i termofizičke karakteristike navedenih sustava.

Ispitivanjem je utvrđeno da tretmani ultrazvukom imaju različite utjecaje na fizikalna i funkcionalna svojstva istraživanih sustava. Nakon tretiranja ultrazvukom od 20 kHz i od 40 kHz kod svih uzoraka proteina ultrazvuk je uzrokovao smanjenje veličine čestica, suzio njihovu raspodjelu, te značajno povećao specifičnu slobodnu površinu, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Došlo je do značajnog smanjenja molekularne mase i cijepanja proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Kapaciteti pjenjenja i stabilnosti pjena, vrijednosti indeksa aktiviteta emulzije kod svih uzoraka poboljšani su ultrazvučnim tretmanima sondom od 20 kHz i ultrazvukom od 40 kHz. Nakon tretiranja modelnih sustava ultrazvukom nije se promijenio tip tečenja. Dodatak metil celuloze, guar gume, saharoze i mlijeka u prahu u modelne sustave, te tretman ultrazvukom od 30 kHz pokazao je različit utjecaj na pojedina ispitivana svojstva. Nakon tretmana ultrazvukom niskog intenziteta od 500 kHz nije došlo do promjena u navedenim ispitivanim svojstvima modelnih sustava.

## **ABSTRACT**

The main aim of this thesis was to investigate in what way various ultrasound treatments, with usage of different ultrasound frequencies, power and treatment time, affects functional and physical properties of whey proteins and model systems prepared with whey proteins and diverse supplements like guar gum, methyl cellulose, sucrose and milk powder.

The examinations were conducted on powdered whey protein isolates, concentrates, hydrolysates and  $\alpha$ -lactalbumin samples. Ultrasound probes of 20 kHz and 30 kHz frequency were used, as well as ultrasound baths of 40 kHz and 500 kHz frequency. Treatment times with ultrasound of 20 kHz, 40 kHz and 500 kHz were 15 and 30 minutes, and with 30 kHz probe 3, 5 and 10 minutes. Investigated whey protein and model system properties were: solubility, foaming and emulsifying properties, pH, conductivity and temperature changes after treatments. After ultrasound treatment with probe several parameters of protein model systems prepared with whey protein concentrates or isolates and different supplements like methyl cellulose, guar gum, sucrose or milk powder, have been investigated. The effect of ultrasound treatment of solubility, foaming and emulsifying properties, and also the effect on rheological and thermophysical properties of model systems have been investigated.

The obtained results showed that ultrasound treatments have different influence on physical and functional properties of investigated systems. Ultrasound treatment with 20 kHz and 40 kHz frequencies caused significant reduction in particle size, narrowed their distribution and significantly increased specific surface area, except for whey protein hydrolysates. Significant reduction in molecular weight and protein fractioning has been also observed. The same treatment caused improvement in foam capacity and stability, and also increases emulsion activity indexes. There was no change in systems flow behaviour after ultrasound treatment. Addition of methyl cellulose, guar gum, sucrose and milk powder in combination with ultrasound treatment with 30 kHz showed different influence on investigated properties. Ultrasound treatment with 500 kHz frequency has not showed changes in investigated properties.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr.sc.Vesni Lelas, na pruženim znanstveno-stručnim savjetima tijekom izrade rada.

Zahvaljujem prof. dr.sc.Timothy J. Masonu, iz Coventry-a, Coventry University (Sonochemistry Centre), Velika Britanija, na pruženoj pomoći i znanju, te predanom velikom iskustvu tijekom izrade rada. Isto tako zahvaljujem se svim djelatnicima Coventry University na pruženoj pomoći, tehničkoj opremi i izdvojenom vremenu. ([www.sonochemistry.info](http://www.sonochemistry.info); [www.coventry.ac.uk](http://www.coventry.ac.uk)).

Zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za tehnološke operacije (Zavoda za procesno inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet) na pruženoj pomoći i tehničkoj opremi za izradu ovog rada, a posebice prof. dr.sc.Branku Tripalu, doc. dr.sc.Mladenu Brnčiću i prof. dr.sc.Damiru Ježeku.

Zahvaljujem djelatnicima Laboratorija za procesno-prehrambeno inženjerstvo (Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet) na pomoći pri izradi rada i prijateljskoj podršci.

Zahvaljujem Stručnom povjerenstvu za obranu prof. dr.sc.B.Tripalu, prof. dr.sc.V.Lelas, doc. dr.sc.G.Krešić, prof. dr.sc.R.Božanić, doc. dr.sc.M.Brnčiću i prof. dr.sc. Lj.Tratnik na stručnim, znanstvenim i prijateljskim savjetima.

Zahvaljujem svojim prijateljima asistentima i znanstvenim novacima na prijateljskoj podršci i zabavnim trenucima, te svim djelatnicima Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta na tome što rade svoj posao.

*Ovaj rad posvećujem cijeloj svojoj obitelji, a posebno mojim najdražima i najmilijima Petri i Stjepanu!*

*„Success is the ability to go from one failure to another with no loss of enthusiasm.“*

*Sir Winston Churchill (1874 - 1965)*



# SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1 ULTRAZVUK	2
2.1.1. NASTAJANJE ZVUČNOG VALA	4
2.1.2. MEHANIZMI I UČINCI ULTRAZVUKA	13
2.1.3. PRIMJENA ULTRAZVUKA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI	16
2.2 SASTAV i SVOJSTVA SIRUTKE	21
2.2.1. PROTEINI SIRUTKE	23
2.2.2. IZOLAT PROTEINA SIRUTKE	32
2.2.3. KONCENTRAT PROTEINA SIRUTKE	33
2.2.4. HIDROLIZAT PROTEINA SIRUTKE	35
2.3 FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA SIRUTKE	36
2.3.1. INTERAKCIJE HIDROKOLOIDA SA SASTOJČIMA HRANE	44
3. EKSPERIMENTALNI DIO	49
3.1. MATERIJALI	49
3.2. METODE RADA	55
3.2.1. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM SONDOM OD 20 kHz	55
3.2.2. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM SONDOM OD 30 kHz	56
3.2.3. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM KUPELJI OD 40 kHz	57
3.2.4. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM KUPELJI OD 500 kHz	58
3.2.5. ODREĐIVANJE SNAGE I INTENZITETA ULTRAZVUKA	58
3.2.6. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA	59
3.2.7. ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI	60
3.2.8. ODREĐIVANJE ZNAČAJKI PJENJENJA	61
3.2.9. ODREĐIVANJE EMULGIRAJUĆIH SVOJSTAVA	62
3.2.10. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI	63
3.2.11. ODREĐIVANJE ELEKTROPROVODLJIVOSTI	63
3.2.12. ODREĐIVANJE PROMJENA TEMPERATURE TIJEKOM TRETMANA	63
3.2.13. SDS-PAGE GEL ELEKTROFOREZA	64
3.2.14. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA	67
3.2.15. ODREĐIVANJE TEMPERATURA FAZNIH PROMJENA POMOĆU	70
3.2.16. STATISTIČKA ANALIZA	72
4. REZULTATI	73

## SADRŽAJ

5.	RASPRAVA	137
5.1.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA RASPODJELU VELIČINE ČESTICA	137
5.2.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA MOLEKULARNE MASE TRETIRANIH PROTEINSKIH FRAKCIJA	140
5.3.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA ZNAČAJKE PJENJENJA PROTEINSKIH PRIPRAVAKA	147
5.4.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA EMULGIRAJUĆA SVOJSTVA PROTEINSKIH PRIPRAVAKA	154
5.5.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA TOPLJIVOST PROTEINA	162
5.6.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA pH VRIJEDNOSTI PROTEINSKIH SUSPENZIJA	164
5.7.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA ELEKTROPROVODLJIVOST PROTEINSKIH SUSPENZIJA	165
5.8.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA PROMJENE TEMPERATURA PROTEINSKIH SUSPENZIJA TIJEKOM TRETMANA	166
5.9.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA REOLOŠKA SVOJSTVA PROTEINSKIH SUSPENZIJA	167
5.10.	UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA TEMPERATURE FAZNIH PROMJENA PROTEINSKIH SUSPENZIJA	169
6.	ZAKLJUČCI	171
7.	LITERATURA	175

## **1. UVOD**

U zadnje vrijeme znanstvena istraživanja su sve više usmjerena na razvoj različitih novih tehnika procesiranja hrane kojima je moguće dobiti proizvode visoke kvalitete. Jedna od tih tehnika je i ultrazvuk niske frekvencije i visoke snage zbog čije primjene dolazi do fizičkih promjena na biološkom materijalu te do ubrzavanja pojedinih kemijskih reakcija. Posljedica toga je inaktivacija mikroorganizama i enzima, olakšano emulgiranje i homogenizacija, bolja ekstrakcija, bolji učinci sušenja i sl.

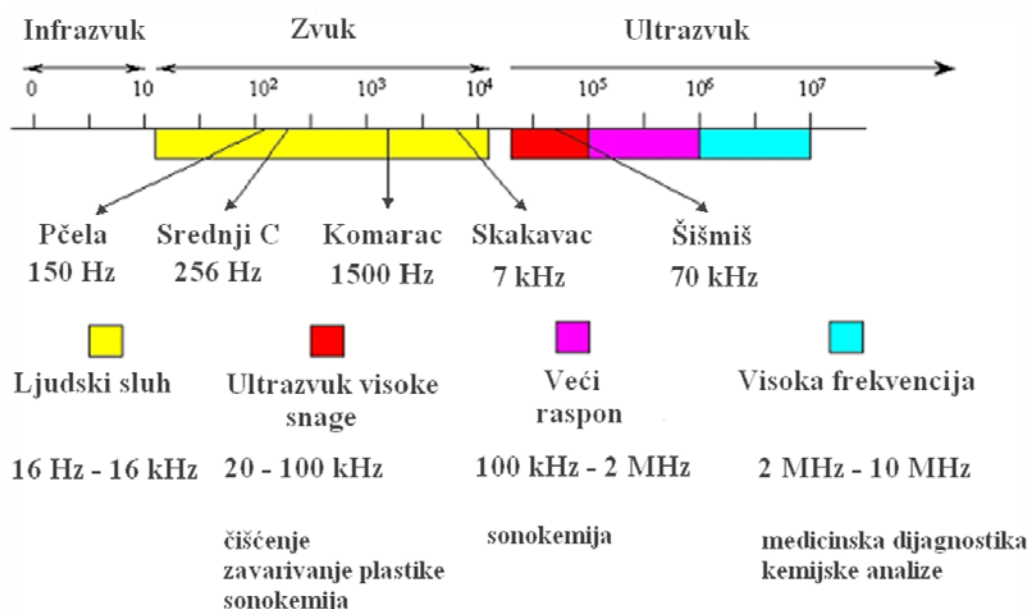
U ovom radu željelo se istražiti na koji način ultrazvuk različitih frekvencija, snaga i duljine trajanja tretiranja može utjecati na pojedina funkcionalna svojstva proteina sirutke te modelnih sustava pripremljenih sa proteinima sirutke i različitim dodacima kao što su guar guma, metil celuloza, saharoza te mlijeko u prahu. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje promjena nekih tradicionalnih tehnoloških postupaka proizvodnje pojedinih prehrambenih proizvoda sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava, te povećanja mikrobiološke i kemijske stabilnosti.

Osnovni materijali s kojim su provedena istraživanja bili su različiti pripravci proteina sirutke, kao što su koncentrat proteina sirutke, izolat i hidrolizat proteina sirutke, te alfa-laktalbumin i beta-laktoglobulin, koji su odabrani zbog velike nutritivne vrijednosti i poželjnih funkcionalnih svojstava. Upravo zbog toga sve se više i primjenjuju u prehrambenoj industriji kao dodatak različitim prehrambenim proizvodima kao što su sladoled, mliječni deserti, pekarski i slastičarski proizvodi, mesni proizvodi i drugo.

## **2. OPĆI DIO**

## 2.1. ULTRAZVUK

Zvučni valovi mogu se podijeliti s obzirom na frekvenciju u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu (slika 1).



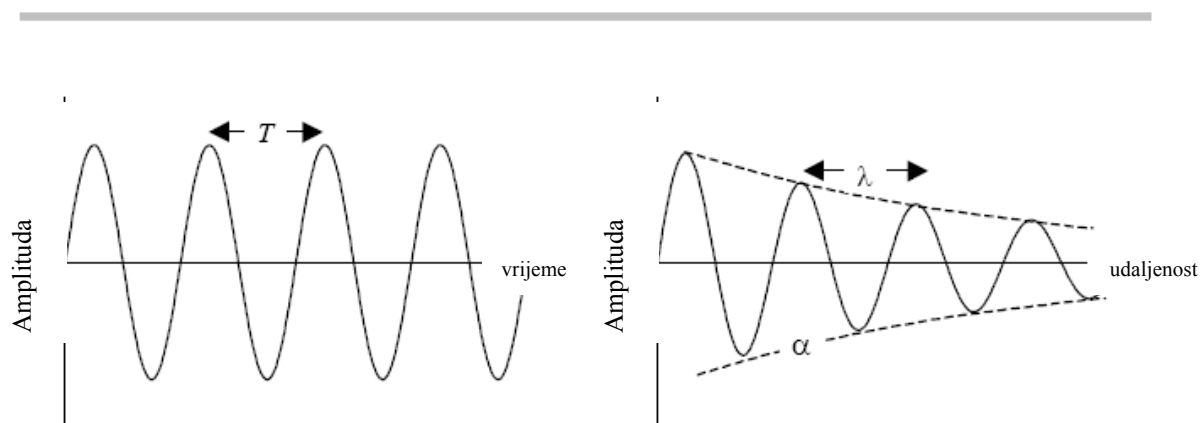
Slika 1. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998)

Pri tome su za primjenu u prehrambenoj industriji najznačajnije frekvencije ultrazvuka više od 20 kHz.

Zvučni val određen je svojom amplitudom  $[A]$  i frekvencijom  $[f]$  (može se odabrati), te valnom duljinom  $[l]$  i koeficijentom prigušenja  $[\alpha]$ . Promjene amplitude ultrazvučnog vala kod određenih položaja u materijalu, i vremena prikazane su na slici 2. Kod fiksnih položaja u materijalu, udaljenost između susjednih maksimuma vala varira sinusoidno s vremenom. Amplituda  $[A]$  se smanjuje s porastom udaljenosti zbog prigušenja, a koeficijent prigušenja  $[\alpha]$  je mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon njegova prolaska materijalom. Koeficijent prigušenja  $[\alpha]$  materijala može se definirati slijedećim izrazom (1):

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (1)$$

gdje je,  $A_0$  početna amplituda zvučnog vala, a  $x$  je prijeđena udaljenost. Glavni uzroci prigušenja su adsorpcija i raspršivanje. Adsorpcija je uzrokovana fizikalnim mehanizmom koji pretvara ultrazvučnu energiju u toplinu. Raspršivanje se pojavljuje u heterogenim materijalima, kao što su emulzije, suspenzije i pjene. Za razliku od adsorpcije, energija uslijed raspršivanja još je uvijek spremljena u obliku ultrazvučne energije, ali se ne registrira jer su njezin smjer i faza prenošenja promijenjeni (McClements, 1995).



**Slika 2. Promjene amplitude ultrazvuka kod određenih položaja u materijalu (lijevo), te kod određenog vremena (desno).  $T$  je udaljenost između susjednih maksimuma vala,  $\lambda$  je valna duljina i  $\alpha$  je koeficijent atenuacije (McClements, 1995)**

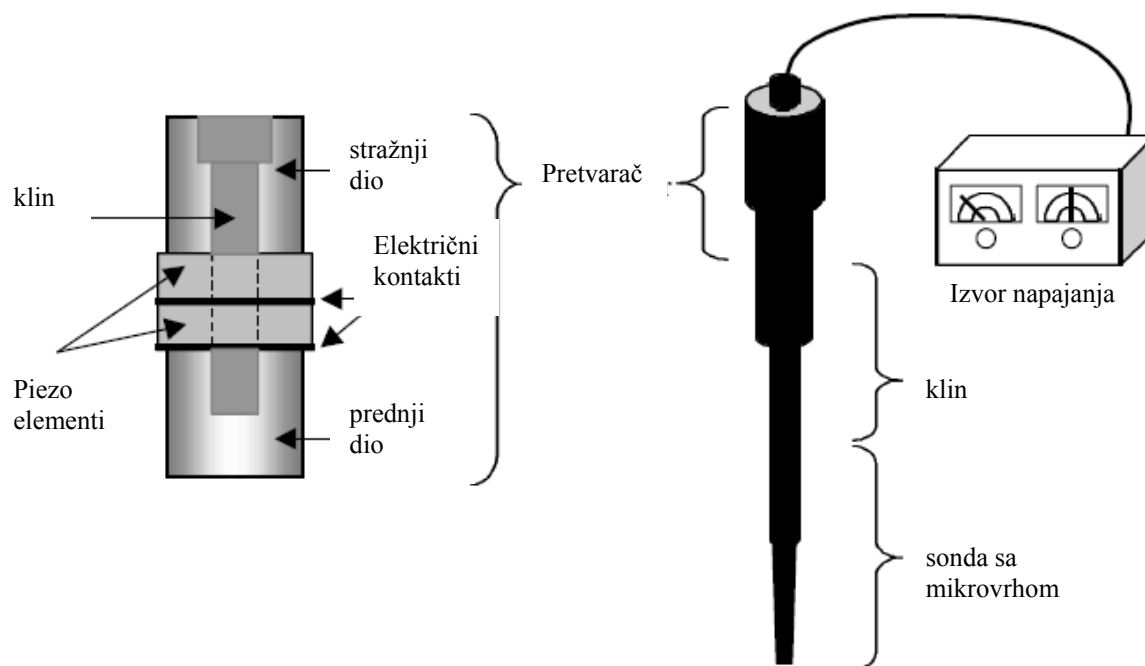
Ultrazvučna brzina vala kod većine materijala je nelinearna funkcija temperature. Kod vode koja je glavni sastojak hrane, brzina vala mijenja se za otprilike  $3 \text{ m s}^{-1}$  po stupnju Celzijusa na sobnoj temperaturi. Preciznost određivanja brzine vala može se povećati upotrebom usavršenih uređaja (Buckin i Smyth, 1999).

### **2.1.1. NASTAJANJE ZVUČNOG VALA**

Ultrazvučni pretvarač pretvara električnu ili mehaničku energiju u energiju zvuka. Postoje tri tipa pretvarača u uobičajenoj upotrebi koji uključuju pretvarač sa tekućinom, magnetostriktivni pretvarač i piezoelektrični pretvarač (Mason, 1998).

Specifičan tip ultrazvučnog pretvarača sastoji se od dva diska piezoelektrične keramike složene poput sendviča između dva identična metalna bloka. Piezoelektrična keramika upotrebljava se u paru kako bi se osigurala dodatna mehanička gibanja. Dva diska se polariziraju u suprotnim smjerovima i razdvajaju elektrodom spojenom na izvor snage. Dijelovi se izlažu predstresu klinom (slika 3). Piezoelektrični pretvarači su najčešće korišteni uređaji koji se koriste u stvaranju ultrazvuka. Piezoelektrični materijali kao što je barij-titanat ili olovo-metaniobat šire se i kontrahiraju u promjenjivom električnom polju te na taj način stvaraju ultrazvučne valove. Piezoelektrični elementi koji se uobičajeno koriste u ultrazvučnim pretvaračima su potencijalno krhki te se zato ugrađuju između metalnih blokova (prednji i stražnji dio) (slika 3). Pretvarači sa tekućinom i magnetostriktivni pretvarači također se koriste u stvaranju ultrazvuka. Ova dva sustava imaju vrlo robusnu konstrukciju, ali ograničen raspon frekvencija.





Slika 3. Ultrazvuk visokog intenziteta u obliku sonde s piezoelektričnim pretvaračem u obliku 'sendviča' (Mason, 1998)

### 2.1.1.1. ULTRAZVUČNI SUSTAV VISOKE SNAGE POKRETAN ELEKTRIČNOM SNAGOM

Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij stvaraju se longitudinalni valovi koji uzrokuju stvaranje alternativne kompresije i razrjeđenje dijelova medija (Povey i Mason, 1998). U ovisnosti o primijenjenoj frekvenciji i amplitudi zvučnog vala, može se promatrati veliki broj fizičkih, kemijskih i biokemijskih učinaka. Kod obrade hrane važna je činjenica da se tretiranjem ultrazvukom razvija toplina zbog nastanka kavitacije (implozije mjehurića plina) koja uzrokuje brzu promjenu temperature do (5227 °C) 5500 K i tlaka do 50 MPa (Leighton, 1998). Temperatura i tlak generirani su tijekom vrlo kratkih razdoblja na mjestu gdje se dogodila kavitacija (Suslick, 1988). Količina energije koja se oslobađa uslijed kavitacije ovisi o kinetici rasta i raspada mjehurića. Ova energija trebala bi se povećati s porastom napetosti površine na međufazi mjehurića, a smanjiti s tlakom pare tekućine. U

namirnicama sa velikim udjelom vode postoji visoka površinska napetost, tako da ona može biti vrlo podesan medij za stvaranje kavitacije.

Zvučni val moguće je najbolje postići putem principa elektrostriktivne transformacije materijala putem kojeg će se stvoriti val. Transformacija se osniva na elastičnoj deformaciji feroelektričnih materijala unutar električnog polja visoke frekvencije, koja je uzrokovana uzajamnim privlačenjem molekula polariziranih u polju. Za polarizaciju molekula primijenjena je izmjenična struja visoke frekvencije putem dviju elektroda do feroelektričnog materijala. Tada se, nakon pretvorbe u mehaničko titranje, zvučni valovi prenose do pojačala, do sonde koja širi zvuk te konačno do medija koji se tretira. Ultrazvuk visoke snage može se stvoriti na više različitih načina, primjerice električnom snagom, pokretanjem tekućine, mlazom plina i slično. Najčešće upotrebljavani ultrazvučni sustav u prehrambenoj industriji je onaj pokretan električnom snagom.

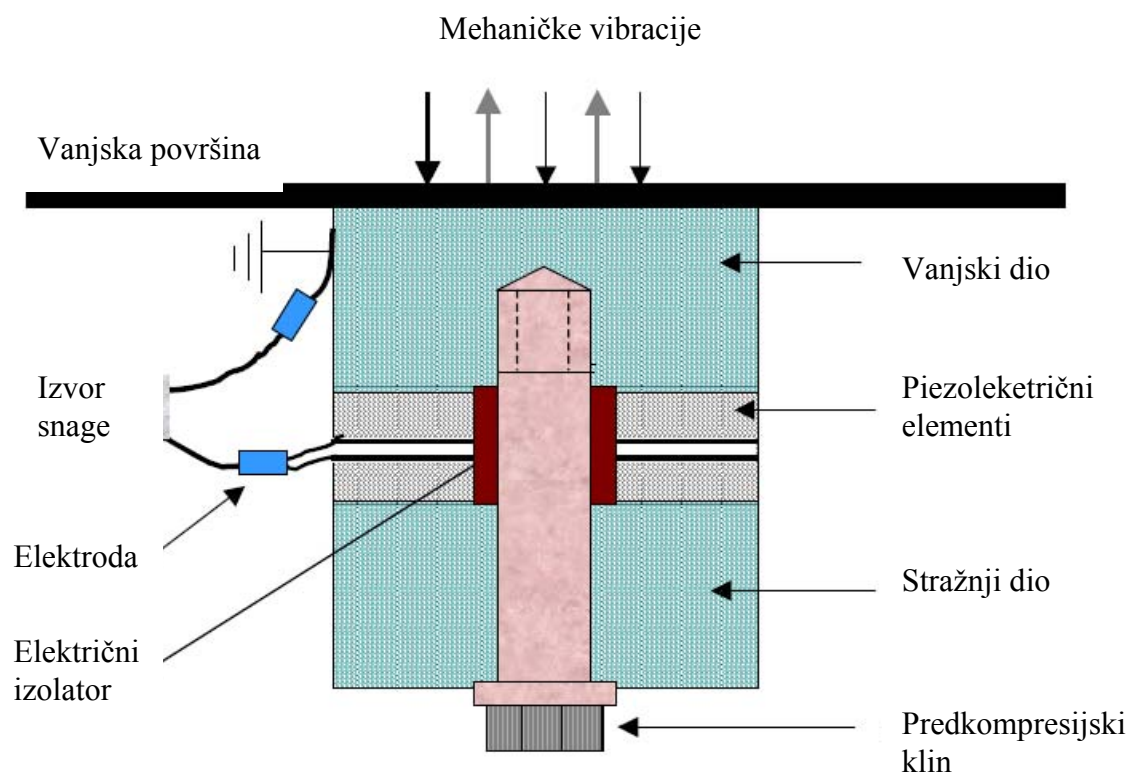
Osnovna komponenta sustava sastoji se od generatora snage koji osigurava elektricitet pretvaraču na željenoj ultrazvučnoj frekvenciji te od pretvarača, koji funkcionira pretvarajući električnu snagu u mehaničke vibracije. Glavna funkcija generatora snage je pretvaranje standardne električne frekvencije (obično 50-60 Hz) u visoko promjenjivu frekvenciju (iznad 20 kHz) potrebnu za ultrazvučno prenošenje kroz seriju oscilirajućih, pojačavajućih i podudarnih krugova. Generator snage prije je bio konstruiran kod točno određene i definirane rezonantne frekvencije. Međutim, zbog tolerancije od strane proizvođača teško je postići da svaki pretvarač ima točno istu rezonantnu frekvenciju. Zbog toga, za sustave sa više pretvarača, samo oni pretvarači sa rezonantnom frekvencijom koja je najbliža generatoru mogu djelovati sa svojim maksimalnim učinkom. To posljedično dovodi do problema kao što su, vruće točke, stajajući val itd. (Mason, 1998). Rješenje ovih problema osigurala je tehnologija "čiste" frekvencije (Fuchs, 1999), u kojoj je izlazna frekvencija generatora promijenjena oko centralne frekvencije pri čemu se centralna frekvencija isto tako može podešavati. Podešavanjem frekvencije samo malo iznad ili ispod centralne frekvencije, svaki pretvarač može djelovati kod svoje rezonantne frekvencije te se na taj način može postići maksimalna učinkovitost (Fuchs, 1999).

Nadalje za sustav ultrazvuka potrebni su i ultrazvučni pretvarači. Danas postoje dva glavna tipa ultrazvučnih pretvarača: magnetrostriktivni i piezoelektrični.

Magnetrostriktivni pretvarač je u svojem najjednostavnijem obliku solenoid sa navojem sastavljenim kao laminat sa više slojeva magnetrostriktivnih materijala i od jezgre koju čini metalna traka od bakra. Kada se propusti struja kroz navoj, stvara se magnetsko polje koje uzrokuje smanjenje dimenzija jezgre. Kada se struja isključi jezgra se vraća u prvotni oblik. Brza izmjena uključivanja i isključivanja struje stvara mehaničke vibracije, koje se dovode mediju putem membrane. Međutim, pretvarač je jednostavno odvojiti od membrane napravljene od nehrđajućeg čelika te se stoga zavaruju zajedno. Zato je važno da je pretvarač čvrsto vezan na membranu budući da će bilo kakva zračna praznina između pretvarača i membrane izgubiti akustičnu energiju zbog zraka koji posjeduje vrlo nisku akustičnu impedancu i visoku akustičnu apsorpciju (Gallego-Juarez, 1998). Obično se koriste epoksi-rezini kako bi ih se povezal. Kompaktna konstrukcija glavna je prednost magnetrostriktivnih pretvarača jer omogućuje stvaranje velike pokretačke snage (Mason, 1998). Međutim, oko 40% električne energije izgubi se kao toplina te je stoga potrebno vanjsko hlađenje. Isto tako, njegova maksimalna radna frekvencija je ograničena na 100 kHz (Mason, 1998).

Piezoelektrični pretvarači su najčešće upotrebljavana vrsta pretvarača. U njihovoj konstrukciji koristi se piezoelektrična keramika koja se širi i skuplja u promjenjivom električnom polju, dovodeći do tlačnih valova koji se šire kroz medij. Za primjenu pretvarača, potrebne su karakteristične konstante keramičkog materijala koji bi bio u mogućnosti ostati stabilan u ovisnosti o vremenu, mehaničkom stresu, električnom polju i temperaturi. Zbog toga se mogu koristiti samo materijali koji imaju niske dielektrične i mehaničke gubitke, kao što su olovo-zikronat-titanat, niobati i barij-titanat (Keil i Swamy, 1999). Kako su keramički materijali krhki, obično se stavljaju u "sendvič" između blokova metala (slika 4).

Ovakva struktura ne samo da štiti keramiku od loma nego i sprječava njeno pregrijavanje jer metalni blokovi odvede toplinu. Uspoređujući s magnetrostriktivnim pretvaračima, piezoelektrični pretvarači osiguravaju višu elektromagnetsku pretvorbu (Hamonic i Decarpigny, 1988), 95% su učinkovitiji zbog čega mogu djelovati u cijelom ultrazvučnom području (Hamonic i Decarpigny, 1988), a malih su dimenzija, lagani i jeftini. Međutim, manje su izdržljivi budući da se piezoelektrični materijal troši s vremenom te stvorena vibracijska energija postaje sve slabija i slabija (Thompson i Doraiswamy, 1999).



Slika 4. Piezoelektrični pretvarač (Fuchs, 1999)

Postoji više stotina tipova ultrazvučnih sustava koji se trenutno upotrebljavaju, a koji se razlikuju prema izgledu pretvarača, tipovima pretvarača te načinu na koji se ultrazvuk predaje procesu. Nabrojani su oni od posebnog značaja u prehrambenoj industriji.

### **Ultrazvučna kupelj**

Ultrazvučna kupelj (slika 5) je spremnik koji sadrži procesni medij sa pretvaračem ili više njih vezanim na dno tj. bazu. Kako bi se kupelj mogla koristiti za različite svrhe mogu joj se ugraditi i dodatni dijelovi. Na primjer, spremnik može biti izveden kao spremnik sa izolacijom i hladilom koji pluta unutar spremnika; sa elektroničkim satom kako bi se mogla kontrolirati duljina ultrazvučnog tretmana i periodi prekida; sa kontroliranim grijanjem te promjenjivim izlazom zvučne snage. Većina ultrazvučnih kupelji radi kod frekvencije od oko 40 kHz. Oni su isto tako i niske snage kako bi se izbjegla kavitacija na stjenke spremnika (Mason, 1998).

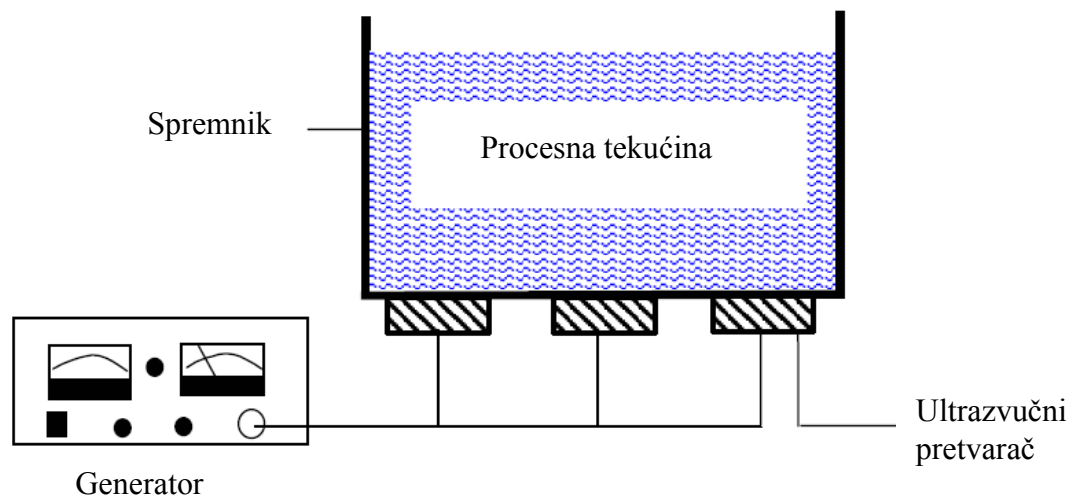
### **Sustav ultrazvučne sonde**

Ultrazvučni sustavi visoke snage mogu biti izvedeni i kao sonde (slika 6), u kojem su jedan ili više metalnih klinova vezani na pretvarač kako bi se osigurao intenzitet visoke snage. Klinovi moraju biti oblikovani tako da rezoniraju na istoj frekvenciji kao i pretvarač. Važno je osigurati točnu amplitudu kretanja vrhova klina, koji ovisi o njegovom obliku i dimenzijama. Za ujednačen cilindrični klin nema porasta amplitude. Umjesto toga, klin jednostavno djeluje kao produžetak za prijenos zvučne energije. U nekim slučajevima, gdje je potrebno osigurati veći unos ultrazvučne energije moguće je serijski povezati sonde. Za to su potrebni višestruki klinovi kako bi se omogućili veći stupnjevi pojačanja koji su dizajnirani tako da se još u sredini nalaze dodatni klinovi koji se zovu "podizači" (Keil i Swamy, 1999).

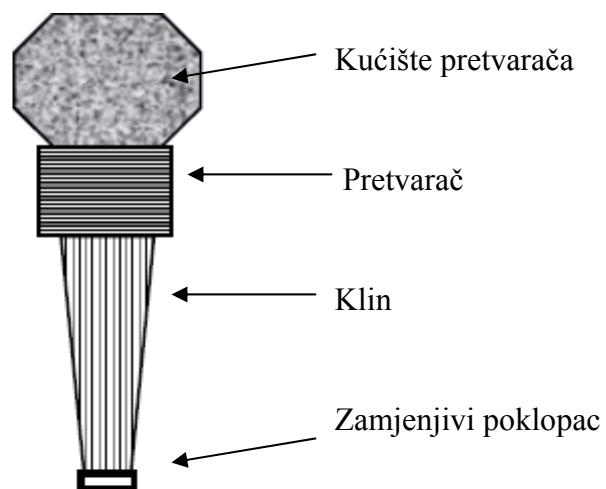
### **Sustav ultrazvuka visoke snage sa zrakom**

Zrak ima malu gustoću te zbog toga ima vrlo malu specifičnu zvučnu impedanciju i visoku zvučnu apsorpciju. Posljedično tome, kako bi se omogućila primjena ultrazvuka sa zrakom, pretvarači moraju osigurati vrlo učinkovit prijenos ultrazvučnog vala. Najprikladniji za tu namjenu je pretvarač sa stupnjevitom pločom kojeg su konstruirali Gallego-Juraz-a i sur. (1998). Sastoji se od kružne savitljive vibracijske ploče stepenastog oblika koja se pokreće iz centra putem piezoelektričnog vibratora. Rastezljiva površina ploče povećava otpor na širenje i pruža dobru impedancijsku podudarnost s medijem. Pomoću adekvatnih

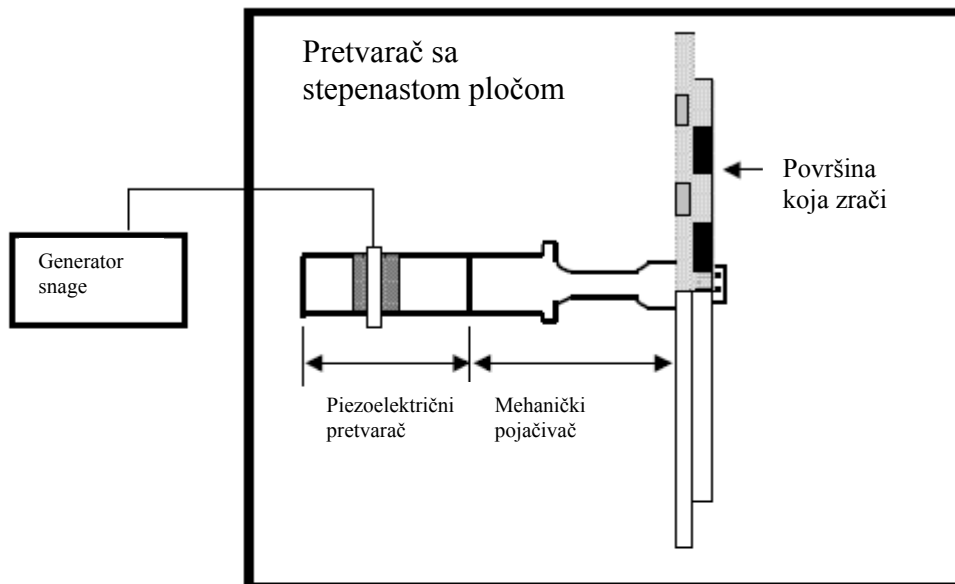
modifikacija površine ploče mogu se postići različite konfiguracije zvučnog polja. Prikaz sustava ultrazvuka sa zrakom prikazan je na slici 7.



Slika 5. Ultrazvučna kupelj (Mason, 1998)



Slika 6. Ultrazvučna sonda (Mason, 1998)



Slika 7. Ultrazvuk visoke snage sa zrakom (Gallego-Juarez, 1998)



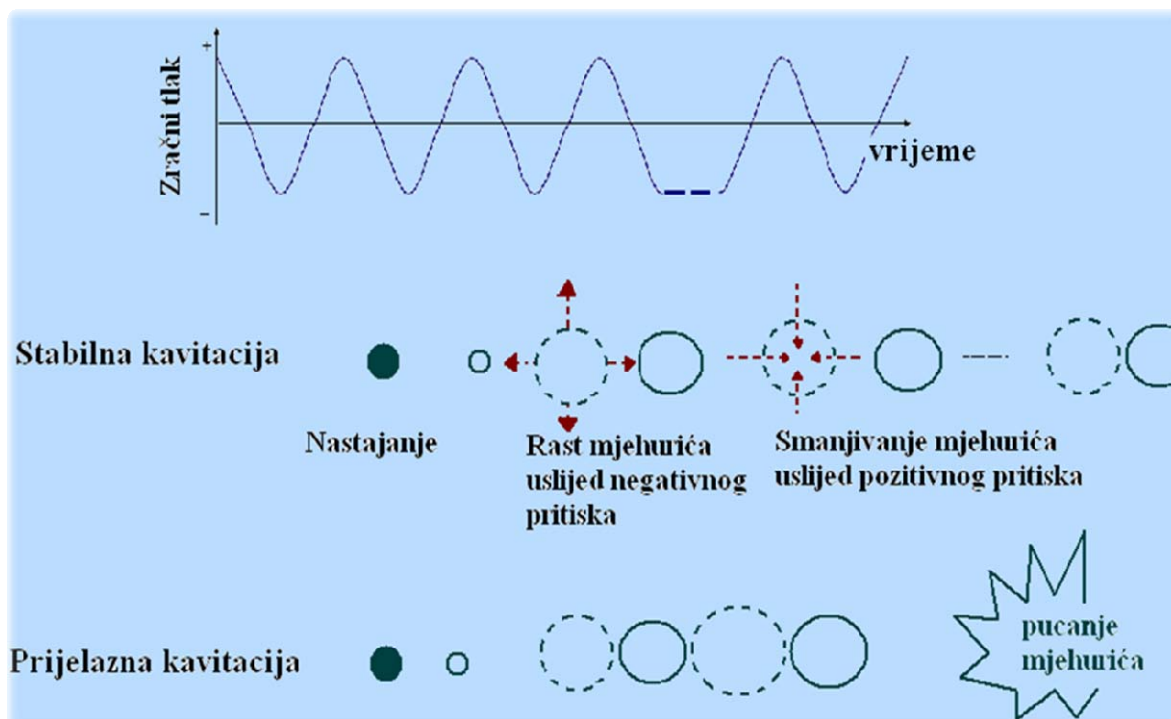
### 2.1.2. MEHANIZMI I UČINCI ULTRAZVUKA

Širenje akustičnog vala kroz medij uzrokuje različite promjene od kojih se samo neke mogu objasniti pojedinim mehanizmima. Najznačajniji učinci ultrazvuka su: zagrijavanje, kavitacija, strukturni učinci, kompresija i širenje, turbulencija, čišćenje i drugi.

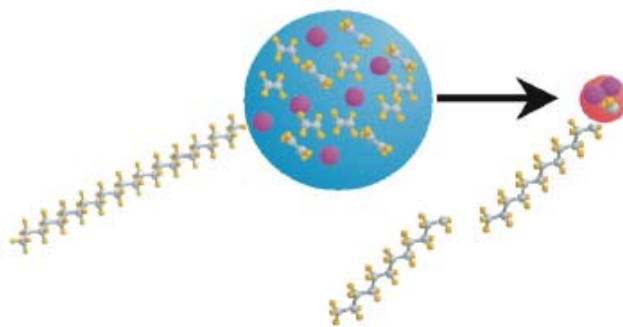
Moguća je pojava selektivnog povišenja temperature kao rezultat specifične apsorpcije akustične energije na membranama i bio-materijalima (pogotovo na njihovim međupovršinama). Floros i Liang (1994) su pomoću jednadžbe ravnoteže topline dokazali da se može izračunati gubitak ultrazvučne energije nakon prolaska kroz medij. Promjena temperature zbog apsorpcije na čvrstoj stijenci, pod određenim uvjetima, bila je 0,1°C za vodu i oko 1°C za zrak.

**Akustična kavitacija** uključuje stvaranje, rast i snažan raspad malih mjehurića ili praznina u tekućini kao rezultat fluktuacije tlaka (Suslick, 1988). Općenito, kavitacija u tekućinama može uzrokovati brzo i potpuno odzračivanje; inicirati različite kemijske reakcije stvarajući slobodne kemijske ione (radikale); ubrzati kemijske reakcije poboljšavajući miješanje reaktanata; potaknuti reakcije polimerizacije/depolimerizacije privremenim raspršivanjem agregata ili nepovratnim prekidom kemijskih veza u polimernim lancima; povećati stupanj stvaranja emulzije; poboljšati brzinu difuzije; stvarati visoko koncentrirane emulzije ili jednolične disperzije čestica; pomoći u ekstrakciji tvari kao što su enzimi iz životinjskih, biljnih ili bakterijskih stanica; ukloniti viruse iz zaraženog tkiva; te na kraju, erodirati i slomiti osjetljive čestice, uključujući mikroorganizme. Na slici 8. prikazana je stabilna i prijelazna kavitacija (rast i raspad mjehurića) te primjer reakcija koje se događaju oko reaktivnog ili raspadajućeg mjehurića (slika 9). Tim reakcijama sinteze i drugih reakcija bavi se sonokemija. Kolaps mjehurića rezultira intenzivnim jakim valovima koji mogu značajno promijeniti fizikalno-kemijska svojstva okružujućeg materijala. Kada se ultrazvuk koristi u kombinaciji s konvencionalnim grijanjem, učinak tretmana ultrazvukom se pojačava (npr. homogenizacija mlijeka). Početak kavitacije medija (tj. minimum oscilacije tlaka koji je potreban da uzrokuje kavitaciju) određen je velikim brojem čimbenika (Rahman, 1999). Među njima su: otopljen plin, hidrostatski tlak, specifična toplina tekućine i plina u mjehuriću, te napetost tekućine. Druga, iznimno važna veličina je temperatura, koja se ponaša obrnuto proporcionalno početku kavitacije. Međutim, frekvencija ultrazvuka je odlučujući faktor kavitacije. Kod vrlo visokih frekvencija (iznad 1 MHz) teško je postignuti kavitaciju, a iznad 2,5 MHz nema kavitacije (Sala i sur., 1995).

Primjena ultrazvuka u svrhu inaktivacije mikroorganizama započela je 1960-tih godina, nakon što je otkriveno da zvučni valovi koji su se koristili u ratu podmornica uzrokuju pomor riba (Earnshaw i sur., 1995). Kavitacija uzrokovana promjenama tlaka (stvorenim ultrazvučnim valovima) pokazuje baktericidno djelovanje. Baktericidni učinak uglavnom se zasniva na stanjivanju staničnih membrana, lokaliziranog grijanja i stvaranja slobodnih radikala (Butz i Tauscher, 2002; Fellows, 2000). Tijekom procesa sonifikacije, kada zvučni val stigne do tekućeg medija stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995) što uzrokuju pojavu kavitacije i stvaranja mjehurića plina. Ovi mjehurići imaju veću površinu tijekom ciklusa ekspanzije, te se povećava difuzija plina. Maksimum je dostignut tamo gdje osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna kako bi se zadržala plinska faza u mjehuriću, te se na taj način, pojavljuje brza kondenzacija. Kondenzirane molekule se sudaraju, stvarajući udarne valove. Ti udarni valovi stvaraju područja vrlo visoke temperature i tlaka, dosežući do 5500 K i 50 MPa. Vruće zone mogu djelovati baktericidno, međutim one su vrlo ograničene i ne utječu na dovoljno veliku površinu, tako da se baktericidni učinak zasniva na promjenama tlaka.



Slika 8. Stabilna i prijelazna kavitacija (Kujipers, van Eck, Kemmere, Keurentjes, 2002)



**Slika 9. Shematski prikaz reakcija sonokemije koje se dešavaju u i oko raspadajućeg mjehurića (Kujipers, van Eck, Kemmere, Keurentjes, 2002)**

Djelovanjem zvučnog polja visokog intenziteta na tekućine dolazi do dinamičkog miješanja i smičnog naprezanja. Time dolazi do promjena njihove strukture, pogotovo njihove viskoznosti. Newtonske tekućine obično zadrže svoju strukturu, ali dilatantne i tiksotropne tekućine nastoje se zgusnuti ili postati manje viskozne (Ensminger, 1986).

Prolaskom akustične energije visokog intenziteta kroz čvrsti medij, zvučni val uzrokuje serije brzih i sukcesivnih kompresija i opuštanja, sa brzinama koje ovise o njegovoj frekvenciji. Zbog toga je materijal izložen brzim serijama promjenjivih stezanja i širenja, vrlo nalik neprekidnom stiskanju i opuštanju spužve. Ovaj mehanizam, poznat kao "rektificirana difuzija", vrlo je važan u akustičnom sušenju i migraciji vlage (Ensminger, 1986). Kod gušćih materijala koji su praktički nestlačivi, promjenjiv akustični tlak potiče odvlaživanje. Do toga dolazi očuvanjem postojećih kanala za uklanjanje vode ili stvaranjem novih. Gušći materijali obično "pucaju" pod akustičnim pritiskom. Mikroskopski kanali se stvaraju u smjeru u kojem se širi val tijekom svojeg opuštanja ili paralelno sa širenjem vala tijekom kompresije (Floros i Liang, 1994). Isti mehanizam rezultira povišenjem i smanjenjem tlaka na međufazama plin/tekuće te na taj način povećava stupanj isparavanja. Iako su promjene tlaka pod djelovanjem zvučnog vala vrlo male, njegov učinak je jak zbog brze oscilacije tlaka.

Ultrazvuk visokog intenziteta u tekućinama male viskoznosti i plinovima uzrokuje snažno miješanje i potresanje, koje raspršuju čestice (Ensminger, 1998). Na međufazama tekuće/čvrsto ili plinovito/čvrsto, zvučni valovi uzrokuju ekstremnu turbulenciju poznatu kao "akustično strujanje" ili "mikro strujanje" (Nyborg, 1965), što smanjuje difuzivni sloj, povećava konvekcijski prijenos mase te značajno ubrzava difuziju u sustavima gdje uobičajeno miješanje nije moguće.

Ultrazvučni valovi visokog intenziteta mogu se koristiti kod čišćenja površina. Ultrazvučni valovi koriste se u sprječavanju vezanja ili stvaranja filterskog "kolača" čime se pojačava brzina filtracije (Floros i Liang, 1994). Pod određenim uvjetima, ultrazvuk visokog intenziteta uzrokuje koalescenciju različitih vrsta čestica te se može učinkovito koristiti u suspenzijama male koncentracije.

### 2.1.3. PRIMJENA ULTRAZVUKA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

U svrhu odgovarajuće primjene ultrazvuka u pojedinim područjima kako prehrambene tehnologije tako i drugima, važno je poznavati njegovu energiju koja je određena snagom zvuka ( $W$ ), intenzitetom ( $W/m^2$ ) i gustoćom ( $W s/m^3$ ). Uobičajena je podjela na ultrazvuk niske i visoke snage ili sinonime niske frekvencije niske amplitude, visoke frekvencije niske amplitude ili niske frekvencije visoke amplitude.

**Ultrazvuk niske snage** odnosi se na intenzitete manje od  $1 W/cm^2$  i frekvencije više od 100 kHz (Mason i Luche, 1996; Villamiel i de Jong, 2000a, 2000b). Uspješno se koriste za neinvazivnu detekciju (kontrolu procesa) i za karakterizaciju fizikalno-kemijskih značajki materijala (procjenu proizvoda i kontrolu) (McClements, 1997; Povey i Mason, 1998; Withers, 1996), te stimulaciju aktivnosti živih stanica, površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju asistiranu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, procese sušenja i smrzavanja, te omekšavanje mesa (Behrend i Schubert, 2001; Mason i Luche, 1996). Ultrazvuk niskog intenziteta posjeduje važne značajke koje ga čine prikladnim za ispitivanje struktura i značajki prehrambenih sustava tijekom obrade (on-line).

**Ultrazvuk visoke snage** znači primjenu intenziteta višeg od  $1 W/cm^2$  (uobičajeno u rasponu od 10–1000  $W/cm^2$ ) i frekvencija između 18 i 100 kHz (McClements, 1995; Povey i Mason, 1998; Villamiel i de Jong, 2000b). Ultrazvuk veće snage niskih frekvencija (20 do 100 kHz) smatra se «snažnim ultrazvukom», jer uzrokuje kavitaciju te ima primjenu u prehrambenoj industriji. Primjenjuje se kod odzračivanja tekuće hrane, za induciranje reakcija oksidacije/redukcije, za ekstrakciju enzima i proteina, za inaktivaciju enzima i za indukciju nukleacije kod kristalizacije (Roberts, 1993; Thakur i Nelson, 1997; Villamiel i de Jong, 2000a). Kombinacija ultrazvuka s toplinom i tlakom (manotermosonifikacija) pokazala se učinkovitom u inaktivaciji enzima otpornih na toplinu (Vercet i sur., 1997). Postoje rezultati ispitivanja utjecaja ultrazvuka na inaktivaciju mikroorganizama u kombinaciji s kemijskim antimikrobioticima (Phull i sur., 1997), zatim u kombinaciji s toplinom ili u kombinaciji s toplinom i neznatno povišenim tlakom (Ciccolini i sur., 1997; Sala i sur., 1995; Villamiel i de

Jong, 2000a). Ultrazvuk visokog intenziteta dokazano je koristan u nastajanju kristala leda tijekom zamrzavanja vode (Li i Sun, 2002). Pod utjecajem jakog ultrazvuka dolazi do skraćivanja vremena između inicijacije kristalizacije i potpune tvorbe leda te time smanjenja oštećenja stanice. Nadalje, druga ispitivanja (Lima i Sastry, 1990; Sastry i sur., 1989) pokazala su da snažni ultrazvuk pospješuje prijenos topline. Koristi se kod emulgiranja, sterilizacije, ekstrakcije, odzračivanja, filtriranja, sušenja i pojačavanja oksidacije (Mason, 1998). Ultrazvuk visokog intenziteta generiran periodičnim mehaničkim gibanjima sonde, prenosi ultrazvučnu energiju u tekući medij i uzrokuje vrlo velike promjene u tlaku, koje dovode do stvaranja malih vrlo brzo rastućih mjehurića (udubljenja) (Mason, 1998). Mjehurić se širi tijekom negativnog tlaka te implodira tijekom pozitivnog tlaka stvarajući visoke temperature, tlakove i sile na vrhu sonde (Suslick, 1988). Ultrazvuk visokog intenziteta potiče ekstrakciju proteina povećavajući topljivost (Moulton i Wang, 1982), ali i vodi do smanjenja molekularne mase proteina. Nedavno je ultrazvuk visokog intenziteta primijenjen u izolaciji škroba iz riže sa obećavajućim rezultatima kod kratkog vremena obrade (Wang i Wang, 2004).

Floros i Liang opisali su primjenu ultrazvuka niskog intenziteta i visoke frekvencije u poboljšanju praćenja procesa proizvodnje hrane, što uključuje određivanje teksture, viskoznosti i udjela pojedinih komponenti u namirnicama. Istovremeno, primjena ultrazvuka uključuje ubrzavanje konvencionalnih reakcija te reakcija razgradnje polimera i polimerizacije (Floros i Liang, 1994). Kada se čestice materijala u suspenziji podvrgnu sonifikaciji moguć je velik broj fizičkih i kemijskih učinaka. Velike čestice podliježu površinskoj eroziji (putem kavitacionog kolapsa u tekućini) ili smanjenu veličine čestica (zbog fizije tijekom međučestičnih sudara ili kolapsom kavitacijskih mjehurića stvorenih na površini). Nedavne studije o učinku sonifikacije na suspendirane prahove pokazale su da se čestice mogu podvrgnuti snažnim sudarima, tako da se u slučaju metala može dogoditi fuzija. U nekim slučajevima kolidirajući prahovi podliježu kemijskim reakcijama. Tako npr., kada se bakar i sumpor podvrgnu zajedničkoj sonifikaciji u heksanu tijekom 1 sata, stvara se 65%  $\text{Cu}_2\text{S}$  (Goh i sur., 1994).

Mehanički i fizički učinci ultrazvuka koriste se u poboljšavanju čišćenja površina (Crawford, 1963). Učinci kavitacije, koji su temelj sonokemije, razlog su vrlo učinkovite upotrebe ultrazvuka u odzračivanju tekućina. Bilo koja prisutnost otopljenog plina ili mjehurića plina u mediju djeluje kao nukleus za stvaranje kavitacijskih mjehurića. Takvi mjehurići ne raspadaju se lako u kompresijskom stupnju vala zbog činjenice da sadrže plin, te će oni nastaviti rasti u slijedećim stupnjevima širenja, puneći se sve više plinom i eventualno

plutajući prema površini. Kako se stupnjevi širenja događaju vrlo brzo (prilikom korištenja kupelji 40 000 puta u sekundi) mjehurići rastu tako brzo da se odzračivanje događa gotovo trenutno.

Budući da je za ultrazvuk visokog intenziteta dokazana njegova velika učinkovitost u procesima kristalizacije (Mason i sur., 1996), njegova je uloga u inicijaciji stvaranja i rasta kristala. Tekstura prehrambenih proizvoda ovisi i o veličini kristala pojedinih sastojaka na što se može utjecati djelovanjem ultrazvuka.

Ultrazvučnom filtracijom moguće je povećati stupanj protoka kroz filtar. Postoje dva specifična učinka djelovanja ultrazvuka koja se mogu upotrijebiti kao bi se poboljšala tehnika filtracije: (1) sonifikacija djeluje tako da uzrokuje aglomeraciju finih čestica te vodi do brze filtracije, te (2) sonifikacija djeluje tako da će osigurati dovoljno vibracijske energije sustavu za održavanje djelomično suspendiranih čestica. Na taj način vibracijskom energijom osigurava se stvaranje slobodnih "kanala" za izlazak tekućine. Kombinirani utjecaj ovih učinaka uspješno se primjenjuje u poboljšavanju vakuum filtracije industrijskih mješavina kao što su otpadne vode, koje zahtijevaju osobito težak i dugotrajan proces (Senapati, 1991).

Konzerviranje hrane povišenom temperaturom kroz kratko vrijeme još uvijek je najčešći oblik procesa konzerviranja hrane. U većini slučajeva procesne veličine izvedene su iz empirijskog istraživanja učinaka temperature i vremena izlaganja na kinetiku mikrobnog preživljavanja. Malo pažnje je posvećeno kvaliteti hrane povezane s toplinskim učincima na sastav hrane i strukturu. Gubitak kvalitete povezan je sa deformacijom biljnih i životinjskih struktura, modifikacijom makromolekula i stvaranjem novih tvari iz reakcija kataliziranih toplinom. Ultrazvuk pruža nove mogućnosti koje bi omogućile smanjenje ovih učinaka. Visoke temperature (kojima su izložene mikrobne stanice) neće utjecati na samo jedan određeni cilj. Toplinska energija u stanici integralan je dio cijelog kompleksnog sustava i djeluje na stanice, na molekule i reakcije u stanici. Primjena ultrazvučnih valova koji stvaraju kavitaciju u suspenzijama koje sadrže mikroorganizme i enzime, obično ima letalni učinak i deaktivacijsko djelovanje (Suslick, 1988). Kada se ultrazvuk visoke snage širi u tekućinu, mikro mjehurići, koji su obično prisutni ili se mogu stvoriti iz prisutnosti suspendiranih čestica, oscilirati će prema tlačnom valu. Visok zvučni tlak odredit će njihov rast i nagli raspad, koji je praćen trenutnim porastom temperature i tlaka u okolnom području. Sala i sur. (1995) utvrdili su da učinkovitost tretmana namirnica ultrazvukom ovisi o vrsti prisutnih bakterija. Bakterije, a pogotovo spore, su relativno otporne na djelovanje ultrazvuka, pa bi ga trebalo koristiti u kombinaciji s povišenim tlakom (manosonifikacija) ili temperaturom i tlakom (manotermosonifikacija).

Prvi rad u ovom području objavili su Ordonez i sur. (1984) koristeći ultrazvuk od 20 kHz i 160 W u kombinaciji s temperaturama u rasponu od 5 do 62 °C. Kombinacija povišene temperature i ultrazvuka bila je učinkovitija obzirom na vrijeme tretiranja i potrošenu energiju, u usporedbi s bilo kojim individualnim tretmanom (Ordonez i sur., 1984). McClements (1995) je ustvrdio da je inaktivacija mikroba učinkovitija kada se ultrazvuk koristi u kombinaciji s drugim metodama dekontaminacije kao što su grijanje, ekstremni pH ili klorifikacija. Procese sonifikacije, manosonifikacije, termosonifikacije i manotermosonifikacije koristili su mnogi istraživači (Manas i sur., 2000; Miles i sur., 1995; Raso i sur., 1998; Ordonez i sur., 1984). Scherba i sur. (1991) proučavali su učinke ultrazvuka kod 24 kHz na *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, gljivu *Trichophyton mentagrophytes* i viruse (feline herpesvirus tip 1 i feline calicivirus). Na sve bakterije ultrazvuk utječe baktericidnim djelovanjem koji raste s vremenom i intenzitetom. Lopez-Malo i sur. (2001) pokazali su da termosonifikacija može učinkovito inaktivirati *Penicillium digitatum*. Toplinski i termosonifikacijski tretmani ocjenjivani su kako bi se odredio optimalan pH, aktivitet vode ( $a_w$ ) temperatura i amplitude ultrazvuka. Kod  $a_w$  od 0.99, povećana amplituda ultrazvuka i smanjen pH rezultirali su smanjenjem D-vrijednosti. Kada je pH bio konstantan, veći  $a_w$  rezultirao je manjom D-vrijednosti.

Ultrazvuk se može koristiti i za homogenizaciju (Villamiel i de Jong (2000b)) i ekstrakciju. Ekstrakcija organskih tvari (s otapalom) iz dijelova biljaka značajno se može poboljšati upotrebom ultrazvuka visoke snage. Mehanički učinci ultrazvuka osiguravaju veće prodiranje otapala u stanične materijale te poboljšavaju prijenosa mase (Kim i Zayas, 1991).

Jedna od najranijih upotreba ultrazvuka u procesiranju hrane je pri emulgiranju (Povey i Mason, 1998). Ako mjehurić kolapsira blizu fazne granice dviju tekućina koje se ne miješaju rezultirajući val nakon implozije može osigurati učinkovito miješanje slojeva. Stabilne emulzije stvorene ultrazvukom koriste se u tekstilnoj, kozmetičkoj, farmaceutskoj i raznim proizvodima prehrambene industrije. Takve emulzije su obično stabilnije od onih konvencionalno proizvedenih i obično zahtijevaju vrlo malo ili nimalo površinski aktivne tvari. Dobivene emulzije u usporedbi s drugim metodama imaju manju veličinu kapljica i užu raspodjelu veličine.

Smrzavanje je izvrsna metoda za dugotrajno očuvanje voća i povrća (Delgado i Sun, 2001). Kvaliteta smrznute hrane ovisi o veličini kristala leda (Li i Sun, 2002). Prisutnost velikih kristala leda unutar tkiva smrznute hrane uzrokuju mehanička oštećenja, gubitak tekućine te na taj način smanjenje kvalitete proizvoda. Veličina i položaj kristala leda usko su povezani sa brzinom smrzavanja (Delgado i Sun, 2001; Martino i sur., 1998; Ngapo i sur., 1999), budući da brzo smrzavanje stvara male intracelularne kristale leda, dok sporo smrzavanje stvara velike kristale leda. Zbog toga se brzina smrzavanja smatra kritičnom u kvaliteti smrznutih proizvoda. Za ultrazvuk je dokazana učinkovitost u stvaranju kristala leda tijekom smrzavanja vode (Li i Sun, 2002) jer centri kristalizacije nastaju brže i jednoličnije. To dovodi do kraćeg vremena između inicijacije kristalizacije i potpune tvorbe leda i time smanjuje oštećenje stanica. Uzrok toga je akustična kavitacija koja se sastoji od stvaranja, rasta i naglog raspada malih mjehurića ili praznina u tekućinama (Simal i sur., 1998). Kavitacijski mjehurić djeluje kao nukleus za rast kristala ili dolazi do disrupcije već prisutnih nukleusa (Mason, 1998). Nadalje, druge studije (Lima i Sastry, 1990; Sastry i sur., 1989) pokazale su da ultrazvuk visoke snage potiče prijenos topline. Biljna tkiva (voće i povrće) posjeduju polutvrdu staničnu strukturu te stvaraju manji otpor ekspanziji kristala leda u volumenu, tako da su podložne ireverzibilnom oštećenju smrzavanjem. Kao dodatna oštećenja prilikom smrzavanja biljnih tkiva, prisutna su još oštećenja smrzavanjem, oštećenja prekoncentracijom tvari, oštećenja dehidracijom i mehanička oštećenja od kristala leda. Oštećenja smrzavanjem su rezultat izlaganja biljnih tkiva niskim temperaturama. Oštećenja prekoncentriranjem tvari su rezultat povećanja koncentracije otopljenih tvari u nesmrznutoj tekućini sa stvaranjem kristala leda. Oštećenja dehidracijom rezultiraju povećanom koncentracijom otopljenih tvari u nesmrznutoj tekućini i osmotskog transfera vode iz unutrašnjosti stanice. Mehanička oštećenja pojavljuju se kao rezultat stvaranja kristala leda. Ova oštećenja biljnih tkiva rezultiraju smanjenjem funkcije stanične membrane, poremećajem metaboličkih sustava, denaturacijom proteina, stalnim prijelazom vode iz unutrašnjosti u ekstracelularni prostor, inaktivacijom enzima i ekstenzivnom rupturom stanica. Gube se i svojstva koja odražavaju svježinu i čvrstoću smrznute hrane, zbog toga što oni većinom ovise o strukturnom uređenju i kemijskom sastavu staničnog zida i intercelularnih prostora gdje su pektinske tvari primarni sastojci (Cano, 1996). Očuvanje stanične strukture funkcija je brzine smrzavanja. Brže smrzavanje stvara veliki broj malih kristala leda što rezultira manjim oštećenjem stanične strukture, dok nasuprot tome, sporo smrzavanje vodi do malog broja kristala leda koji su krupni te uzrokuju cijepanje stanične strukture.



## 2.2. SASTAV I SVOJSTVA SIRUTKE

Sirutka je tekućina zeleno-žute boje koja se dobiva odvajanjem koaguluma iz mlijeka, vrhnja i/ili obranog mlijeka tijekom proizvodnje sira ili kazeina. Sastav i fizička svojstva sirutke ovise o kakvoći upotrijebljenog mlijeka te o vrsti proizvedenog sira ili kazeina (tablica 1). Najveći udio u sirutki čini voda (94%), a suhu tvar pretežito čine laktoza (75%), proteini (14%) te masti i mineralne tvari (11%). Proteini sirutke se ne mijenjaju tijekom proizvodnje sira te nakon izdvajanja gruša kazeina u cijelosti prelaze u sirutku (tablica 2). U sirutku prelaze gotovo sve topljive soli i mikroelementi mlijeka te svi ugljikohidrati iz mlijeka preostali nakon proizvodnje sira, a to su laktoza, glukoza, galaktoza, oligosaharidi te aminošećeri.

**Tablica 1. Sastav i neka fizička svojstva sirutke od proizvodnje slatkih sireva (1), kiselih sireva (2) te od kiselog kazeina (3) (Hramcov, 1979)**

Sastav i svojstva sirutke	Slatka sirutka (1)		Kisela sirutka (2)		Kazeinska sirutka (3)	
	od-do	$\bar{X}$	od-do	$\bar{X}$	od-do	$\bar{X}$
Suha tvar (%)	4,5-7,2	6,5	4,2-7,4	6,0	4,5-7,5	6,8
Laktoza (%)	3,9-4,9	4,5	3,2-5,1	4,2	3,5-5,2	4,5
Proteini (%)	0,5-1,1	0,7	0,5-1,4	0,8	0,5-1,5	1,0
Pepeo(%)	0,3-0,8	0,5	0,5-0,8	0,6	0,3-0,9	0,7
Mast (%)	0,3-0,5	0,4	0,05-0,4	0,2	0,02-0,2	0,1
Kiselost (°T)	10-25	20	50-85	70	50-120	70
Gustoća (kg/m <sup>3</sup> )	1018-1027	1023	1019-1026	1029	1020-1025	1023

Prema kiselosti sirutka se dijeli (Zadow, 1986) na:

- ✚ slatku sirutku (0,1-0,2 % mliječne kiseline, pH-vrijednost 5,8-6,6)
- ✚ srednje kiselu (0,2-0,4 % mliječne kiseline, pH-vrijednost 5,0-5,8) i
- ✚ kiselu sirutku (veća od 0,4 % mliječne kiseline, pH-vrijednost manja od 5,0)

Titracijska kiselost se izražava u postocima mliječne kiseline.

U kiseloj i slatkoj sirutki najviše se mijenja udio mineralnih tvari. Razlog tome su različiti biokemijski procesi koji se odvijaju tijekom proizvodnje sira. Veći udio mineralnih tvari sadrži kisela sirutka, a posebno kisela kazeinska sirutka (pH=4,3-4,6). Razlika je

uglavnom u količini fosfora i kalcija, jer je pri većoj kiselosti sredine topljivost soli i kalcij-fosfata veća. Sirutka u ljudskoj prehrani se koristi ili kao sirutka u prahu ili kao suhi sirutkini proteini.

**Tablica 2. Sastojci suhe tvari sirutke (Hramcov, 1976)**

Sastojci suhe tvari	(g/100ml)	(%) od ukupne suhe tvari	Proteini sirutke *	(%) od ukupnih proteina
Laktoza	4,66	71,7	$\beta$ -laktoglobulin	50,0
Proteini sirutke	0,91	14,0	$\alpha$ -laktalbumin	22,0
Mineralne tvari	0,50	7,7	Imunoglobulini	12,0
Mliječna mast	0,37	5,7	Proteoza-peptoni	10,0
Ostalo	0,06	0,9	Albumini krvnog seruma	5,0
UKUPNO:	6,50	100,0	Ostalo	1,0

\* (Bird, 1996)

Vitamini topljivi u vodi također prelaze iz mlijeka u sirutku dok vitamini topljivi u mastima prelaze u sirutku samo djelomično, ovisno o količini masti koja zaostaje u proizvodnji sira. Udio vitamina je promjenjiv i ovisi o načinu čuvanja sirutke. Žutozelena boja sirutke potječe od riboflavina ( $B_2$ ). Riboflavina može biti više u sirutki nego u mlijeku zbog aktivnosti bakterija mliječne kiseline pri proizvodnji sira. Mliječna mast koja prelazi u sirutku bolje je dispergirana i sadržava veći postotak manjih globula nego ona u mlijeku. Sirutka sadrži nutritivno najvrednije proteine (tablica 3) koji imaju visok udio esencijalnih aminokiselina, osobito cisteina. Biološka vrijednost proteina sirutke označava koji postotak od raspoložive količine proteina organizam zaista i iskorištava. Prema biološkoj vrijednosti postoji rangiranje proteina sirutke. Najveća je biološka vrijednost izolata proteina sirutke, zatim koncentrata proteina sirutke, peptida proteina sirutke, intaktnog proteina i na kraju slobodnih aminokiselina (čak i ako je njihov sastav identičan kao i protein sirutke) (Gašparević-Ivanek, 1999). Veća biološka vrijednost proteina sirutke u odnosu na proteine mlijeka potječe od velikog udjela lizina (40% više) te cisteina i metionina (2,5 puta više) (Tratnik, 1998).

Tablica 3. Biološka vrijednost (BV) proteina sirutke i drugih proteina (Werner,1981)

Proteini	sirutke	jaja	mlijeka	govedine	kazeina	krumpira	Brašna
BV	104	100	92	78	73	69	45

BV – prosječna biološka vrijednost

### 2.2.1. PROTEINI SIRUTKE

Proteini sirutke imaju visok udio aminokiselina razgranatih lanaca (tzv. BCAA- valin, leucin, izoleucin), cisteina, laktalbumina, laktoze, mineralnih tvari i tragova masti. Proteine sirutke sačinjavaju proteinske sub-frakcije poput beta-laktoglobulina, alfa-laktalbumina, imunoglobulina (IgG), glikomakropeptida, bovin serum albumina (BSA) i manjih peptida poput laktoperoksidaze, lizozima i laktoferina. Svaka sub-frakcija sirutke ima svoja jedinstvena biološka svojstva. Sve donedavno separacija spomenutih sub-frakcija u masovnoj proizvodnji bila je ili nemoguća ili preskupa za bilo što osim istraživačke svrhe. Moderne tehnologije filtracije značajno su se poboljšale tijekom proteklog desetljeća te su neke tvrtke uspjele izdvojiti čak i pojedine visoko bioaktivne peptide iz sirutke, kao što su laktoferin i laktoperoksidaza.

Toplinskom obradom sirutke dolazi do promjena u strukturi aminokiselina, pri čemu se uništava značajni dio cisteina, lizina i arginina, a raspoloživost drugih aminokiselina se također bitno smanjuje (npr. lizina, prolina, aspartamske kiseline, glutaminske kiseline, treonina, alanina, glicina i serina). Metodom ionske izmjene i mikrofiltracije dobiva se protein sirutke iz kojeg su, na niskim temperaturama, odstranjeni mikrobi i druge nečistoće, a zadržane esencijalne tvari. Isto tako, metodom filtracije uklanja se laktoza (kao npr. kod izolata proteina sirutke), što je od vitalne važnosti za osobe koje ne podnose laktozu. Ovom metodom dobiveni protein sirutke ima dodatno povećanu biološku vrijednost (iznad 100), izrazito visok sadržaj (čak 23 %) aminokiselina razgranatih lanaca (valin, leucin, izoleucin) te povećanu topljivost. No, uz visoku stopu iskoristivosti, protein sirutke ima i druga vrlo vrijedna svojstva. Protein sirutke može se podvrgnuti enzimatskoj ili kemijskoj razgradnji do hidrolizata ili slobodnih masnih kiselina pri čemu se dodatno povećava njihova biološka vrijednost. Neka istraživanja pokazala su da produkti kemijske i enzimatske hidrolize sirutkinih proteina mogu izazvati alergijske reakcije. No, one se bitno smanjuju ukoliko se primijene neke druge metode razgradnje proteina sirutke.

U tablici 4. prikazana su neka svojstva pojedinih frakcija proteina sirutke. Za svaku od frakcija proteina sirutke dane su vrijednosti za izoelektričnu točku, molarnu masu te konstantu sedimentacije.  $\beta$ -laktoglobulin ima molekularnu masu 18 400 g/mol te je pI = 5,3 (Tanford i sur., 1959.; Qin i sur., 1998.). Vidi se da najveću molnu masu imaju vrste IgG imunoglobulina, zatim BSA te  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin.

**Tablica 4. Svojstva frakcija proteina sirutke (Webb, 1974)**

FRAKCIJE PROTEINA SIRUTKE	IZOELEKTRIČNA TOČKA pI (kod pH)	MOLARNA MASA (Da)	KONSTANTA SEDIMENTACIJE
$\beta$ -laktoglobulin	5,3	36 000 (dimer) 18 400 kod $8 < \text{pH} < 3$	2,7
$\alpha$ -laktalbumin	4,2 – 4,5	14 400	1,75
albumin krvnog seruma (BSA)	4,7	66 300	4,0
IgG imunoglobulini			
IgG1		150 000	6,3
IgG2	5,6 – 6,0	170 000	6,6
IgM		900 000 – 1 000 000	18 – 19
IgA		300 000 – 500 000	10 – 12
proteoze-peptoni	3,3 – 3,7	4 100 – 10 000	0,8 – 0,4

Pojedine frakcije proteina sirutke posjeduju veliku zaštitnu ulogu u organizmu i sudjeluju u odvijanju vrlo važnih reakcija metabolizma (tablica 5). Posjeduju posebno dobru zaštitu imuniteta te pokazuju antimikrobno, antioksidativno, antikarcinogeno, antiupalno, imunomodulatorsko djelovanje, a djeluju i kao prekursori za bioaktivne peptide. Prehrambene i funkcionalne značajke proteina sirutke su ovisne o strukturi i njihovom biološkom djelovanju. Uobičajene metode pasterizacije djelomično uništavaju vrijedne sastojke sirutke.

Tablica 5. Biološke funkcije glavnih proteina sirutke ([www.mtt.fi](http://www.mtt.fi))

FRAKCIJE PROTEINA SIRUTKE	FUNKCIJA
$\beta$ -laktoglobulin	nosač retinola, vezanje masnih kiselina, potencijalan antioksidans, prekursor za bioaktivne peptide
$\alpha$ -laktalbumin	sinteza laktoze u mliječnim žlijezdama, nosač kalcija, imunomodulator, antikancerogen, prekursor za bioaktivne peptide
albumin krvnog seruma (BSA)	prekursor za bioaktivne peptide
IgG imunoglobulini IgG1 IgG2 IgM IgA	specifična zaštita imuniteta (antitijela i komplementarni sustav), potencijalni prekursori za bioaktivne peptide
glikomakropeptid	antivirusno, antitrombotično, bifidogeno djelovanje, regulacija probave
proteoze-peptoni	potencijalni nosači mineralnih tvari
laktoferin	antimikrobno, antioksidativno, antikarcinogeno, antiupalno, imunomodulatorsko djelovanje, transport željeza, regulacija rasta stanica, prekursor za bioaktivne peptide
laktoperoksidaza	antimikrobno, sinergistično djelovanje s imunoglobulinima i laktoferinom
lizozim	antimikrobno, sinergistično djelovanje s imunoglobulinima i laktoferinom

Tablica 6. Udio proteina sirutke u mlijeku (Bylund, 1995)

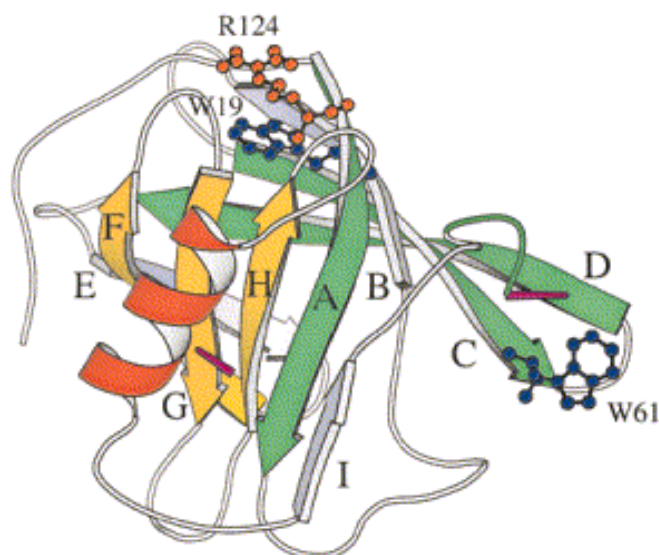
PROTEINI (glavne frakcije)	Količina u mlijeku (g/kg)	Udjel od ukupne količine (%)
PROTEINI SIRUTKE (ukupno)	<b>6,3</b>	<b>19,3</b>
$\alpha$ - laktalbumin	1,2	3,7
$\beta$ - laktoglobulin	3,2	9,8
Albumin krvnog seruma	0,4	1,2
Imunoglobulini	0,7	2,1
Proteoze – peptoni (i drugi)	0,8	2,4
Proteini membrane masne globule	<b>0,4</b>	<b>1,2</b>
UKUPNI PROTEINI	<b>32,7</b>	<b>100,0</b>

Prema klasičnoj podjeli, frakcija laktalbumina je dio proteina seruma mlijeka koja se za razliku od frakcije laktoglobulina otapa u neutralnom poluzasićenom otapalu amonij sulfata ili u neutralnom zasićenom otapalu magnezij sulfata. Proteini sirutke su hidrofilni pa su za razliku od kazeina stabilni na utjecaj enzima ili kiseline. Zbog toga zaostaju u otopini nakon koagulacije kazeina i odvajanja sirnog gruša. Istovremeno, proteini sirutke su termolabilni i koaguliraju pod utjecajem topline za razliku od termostabilnog kazeina. Relativno velika toplinska nestabilnost proteina sirutke u usporedbi sa kazeinom pripisuje se odsustvu fosfora, njihovom niskom sadržaju prolina i visokom sadržaju cistina, cisteina i metionina. Proteini sirutke se reverzibilno denaturiraju na temperaturi između 60 i 70°C, a ireverzibilno na temperaturi višoj od 70°C. Prema strukturi, proteini sirutke su kompaktni, globularni proteini s relativno podjednakom raspodjelom niza polarnih (neutralnih), nepolarnih (hidrofobnih) te nabijenih ili nenabijenih ostataka aminokiselina (kisele ili bazne). Disulfidne veze između ostataka cisteina, prekrivene hidrofobnim ostacima daju proteinima sirutke intramolekularno nabranu strukturu. Proteini sirutke posjeduju dobra funkcionalna svojstva: viskoznost, sposobnost želiranja, stvaranja pjene, emulgiranja, vezanja vode i dobru topljivost. Denaturacijom proteina sirutke povećava im se kapacitet vezanja vode. Osim poželjnih funkcionalnih značajka, posjeduju i prednosti zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i GRAS statusa (generally recognized as safe - sigurni za upotrebu).

Proteinske dušične tvari sirutke se sastoje od:

- ☀️ frakcije albumina (80%):  $\beta$ -laktoglobulin (55%),  $\alpha$ -laktalbumin (20%) i albumin krvnog seruma (5%)
- ☀️ frakcije globulina (10%): imunoglobulini i
- ☀️ frakcije proteoza-peptona (10%)

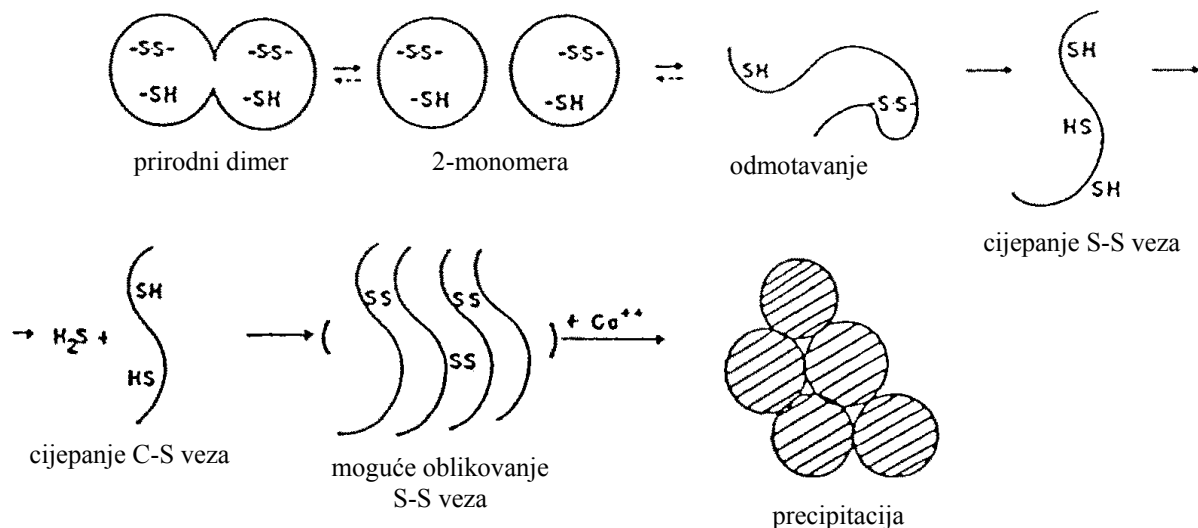
U kravljem se mlijeku  **$\beta$ -laktoglobulin** pojavljuje kao nekovalentno vezani dimer (slika 10) kojeg uz vodikove veze stabilizira i nekoliko drugih interakcija.  $\beta$ -laktoglobulin je globularan protein koji je zamotan tako, da je osam antiparalelnih  $\beta$ -nabranih ploča formirano oko centralne šupljine, kaliksa (Damodaran, 1996a, 1996b, 1997). Veliki doprinos stabilnosti dimera daju suprotni naboji koji se nalaze na dva kraja glavne uzvojnice. Doprinosu i pri neutralnom pH, hidrofobne interakcije koje uključuju hidrofobne ostatke na  $\beta$ -vlaknu koji povezuju dvije uzvojnice proteina. Dimer se sastoji od dva identična peptidna lanca koji se drže zajedno nekovalentnim vezama s ukupno 162 aminokiseline u monomeru.  $\beta$ -laktoglobulin sadrži 2 disulfidne veze i 3 tiolne skupine. Konformacija  $\beta$ -laktoglobulina uključuje sekundarnu strukturu (dio  $\alpha$ -uzvojnice i  $\beta$ -nabrane strukture) te dio neodređene strukture (slučajnog klupka). Četiri disulfidne veze po  $\beta$ -Lg dimeru stupaju u reakciju formirajući intermolekularne veze koje odražavaju strukturni integritet polimera i snižavanjem entropije povećavaju stabilnost proteina.



**Slika 10. Struktura monomera  $\beta$ -laktoglobulina (Brownlow i sur., 1997)**

*Crveno- $\alpha$ -uzvojnica; žuto-F, G i H vlakna; zeleno- područja za koja se predviđa da imaju veliku sklonost uvijanju; grimizno-disulfidne veze. Na slici su prikazani i položaji aminokiselina Trp19, Trp61 i Arg124.*

Kod izoelektrične točke (pH 3,5-5,2) dimeri se povezuju u oktamere, dok pri pH nižem od 3,4 dimeri disociraju do monomera. Pri 60°C dimer disocira u otopini i postaje pogodan za denaturaciju-odmotavanje (slika 11).



Slika 11. Prikaz utjecaja topline na  $\beta$ -laktoglobulin (Harper, 1976)

Na temperaturama iznad 70°C pojačava se aktivnost SH-skupina  $\beta$ -laktoglobulina i pri tome se stvaraju disulfidni mostovi (S-S). Time se objašnjava agregacija i precipitacija globularnih proteina. Agregacija se može pospješiti u prisutnosti iona bakra, kalcija ili nekog drugog teškog metala koji se aktivno vežu na površinu proteinske molekule i tako smanjuju njezinu stabilnost. Na visokim temperaturama postupno se otpuštaju sumporni spojevi koji su odgovorni za specifičan miris i okus mlijeka tretiranog toplinom. Pod utjecajem topline, koja dovodi do denaturacije proteina sirutke, dolazi i do interakcije s  $\kappa$ -kazeinom gdje se  $\beta$ -laktoglobulin (nakon odmotavanja) slobodnim SH-skupinama upliće u kompleks s  $\kappa$ -kazeinom i s njime tvori disulfidne veze. U tu reakciju može biti uključen i  $\alpha$ -laktalbumin, ovisno o uvjetima pri zagrijavanju mlijeka (koncentraciji proteina, temperaturi i trajanju zagrijavanja, pH vrijednosti). Ova interakcija proteina, koja se događa pri toplinskoj obradi mlijeka kod 90-95°C/3-5 minuta, koristi se pri proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka radi dobivanja bolje konzistencije. Međutim, tom se interakcijom inhibira enzimska faza koagulacije kazeina jer su time «osjetljive» veze  $\kappa$ -kazeina (Phe105-Met106) fizikalno zaštićene denaturiranim proteinima sirutke. Zbog toga se toplinska obrada mlijeka ne preporučuje u proizvodnji sira primjenom enzimske koagulacije (Tratnik, 1998).

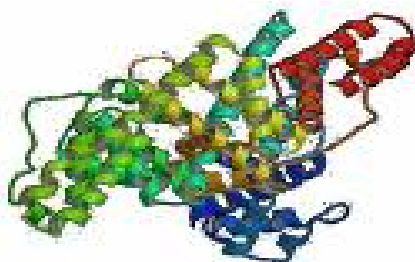


**$\alpha$ -laktalbumin** je kompaktan protein, skoro okruglog oblika koji ima homolognu primarnu strukturu s lizozimom, visoko uređenu sekundarnu strukturu i kompaktnu, sferičnu tercijarnu strukturu (slika 12). Sastoji se od jednostrukog lanca s približno 123 aminokiseline koji sadrži 8 cisteinskih skupina koje su uključene u disulfidne veze te 4 aminokiseline triptofan. Molekula ne sadrži slobodne SH-skupine, ali ima 4 disulfidne veze (S-S).  $\alpha$ -laktalbumin se pojavljuje u dvije genetske varijante (A i B) te predstavlja faktor regulacije enzimatskog sustava sintetaze laktoze. Laktoza-sintetaza katalizira prvi korak u biosintezi laktoze. Protein A je UDP-galaktozil-transferaza, a protein B je  $\alpha$ -laktalbumin, koji ima funkciju povećavanja aktivnosti tog enzima (Tratnik, 1998).  $\alpha$ -laktalbumin je protein sirutke najotporniji na djelovanje topline, što ovisi o optimalnoj kombinaciji trajanja zagrijavanja i temperaturi (Tratnik, 1998). Uspoređujući sa  $\beta$ -laktoglobulinom,  $\alpha$ -laktalbumin je mnogo otporniji na denaturaciju visokim hidrostatskim tlakom (Hayashi i sur., 1987; Nakamura i sur., 1993).



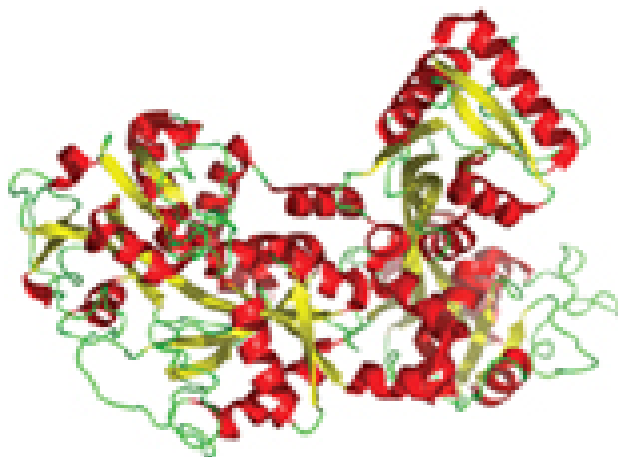
Slika 12. Struktura  $\alpha$ -laktalbumina (<http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-lactalbumin>)

**Albumin krvnog seruma (BSA)** potječe iz krvi životinja. Identičan je sastavu i svojstvima serum-albumina, a ni imunološki se ne razlikuje od njega. Imunoglobulini su u mlijeku prisutni u neznatnoj količini, ali u kolostrumu čine 85 - 90 % ukupnih proteina sirutke te imaju funkciju gama-globulina.



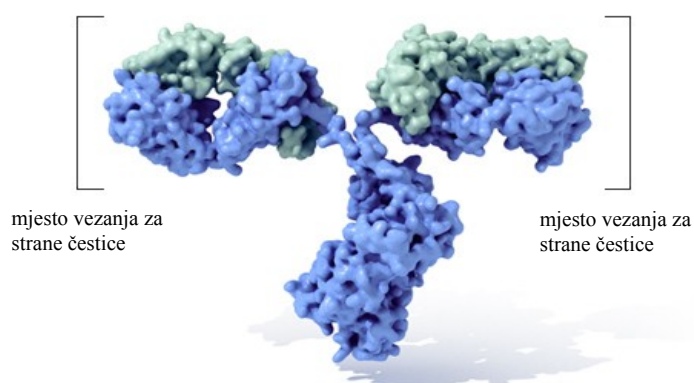
Slika 13. Struktura albumina krvnog seruma (BSA) ([http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine\\_serum\\_albumin](http://en.wikipedia.org/wiki/Bovine_serum_albumin))

U **proteoza-peptone** se ubrajaju frakcije heterogenog sastava što se djelomično nalaze vezane za micelle ( $\beta$ -kazein), a dijelom se nalaze u serumu mlijeka. Proteoza-peptoni su važni jer kataliziraju neke biološke reakcije, utječu na stabilnost okusa mlijeka i na vezanje vitamina i mineralnih tvari. Stabilne su na djelovanje kiseline, enzima ili topline, a prisutne su u tragovima, kao i laktoferin, transferin, laktolin, laktoperoksidaza, lizozim i drugi imunoaktivni enzimi.



Slika 14. Struktura laktoferina ([www.entreprises-wallonnes.com](http://www.entreprises-wallonnes.com))

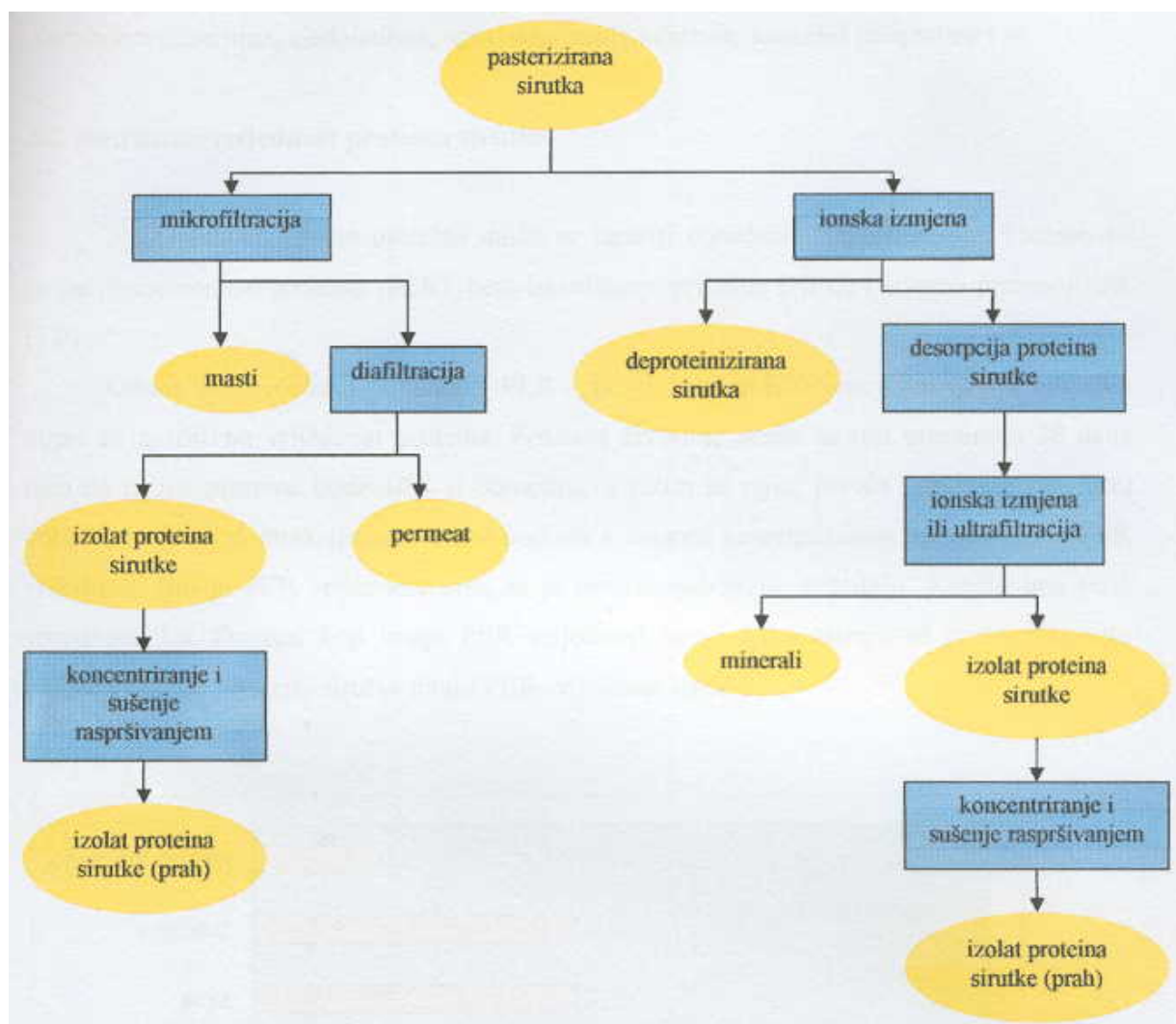
**Imunoglobulina** u mlijeku ima vrlo malo (2,1 %). Oni su najosjetljiviji od proteina sirutke na toplinu. Sadrže u svojoj strukturi i ugljikohidratnu komponentu (heksoze i heksozamin) pa se ubrajaju u glikoproteine. Sastoje se iz više genetskih varijanti: IgM, IgA i IgG (IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>). U navedenom redoslijedu sadrže sve manju količinu ugljikohidratnih komponenti, a koeficijent sedimentacije «S» je različit: IgA (10 - 12 S); IgM (oko 19 S) te IgG (oko 7,5 S) (Kinsella i Whitehead, 1989).



Slika 15. Struktura Imunoglobulina G (IgG) (<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/igg>)

### **2.2.2. IZOLAT PROTEINA SIRUTKE**

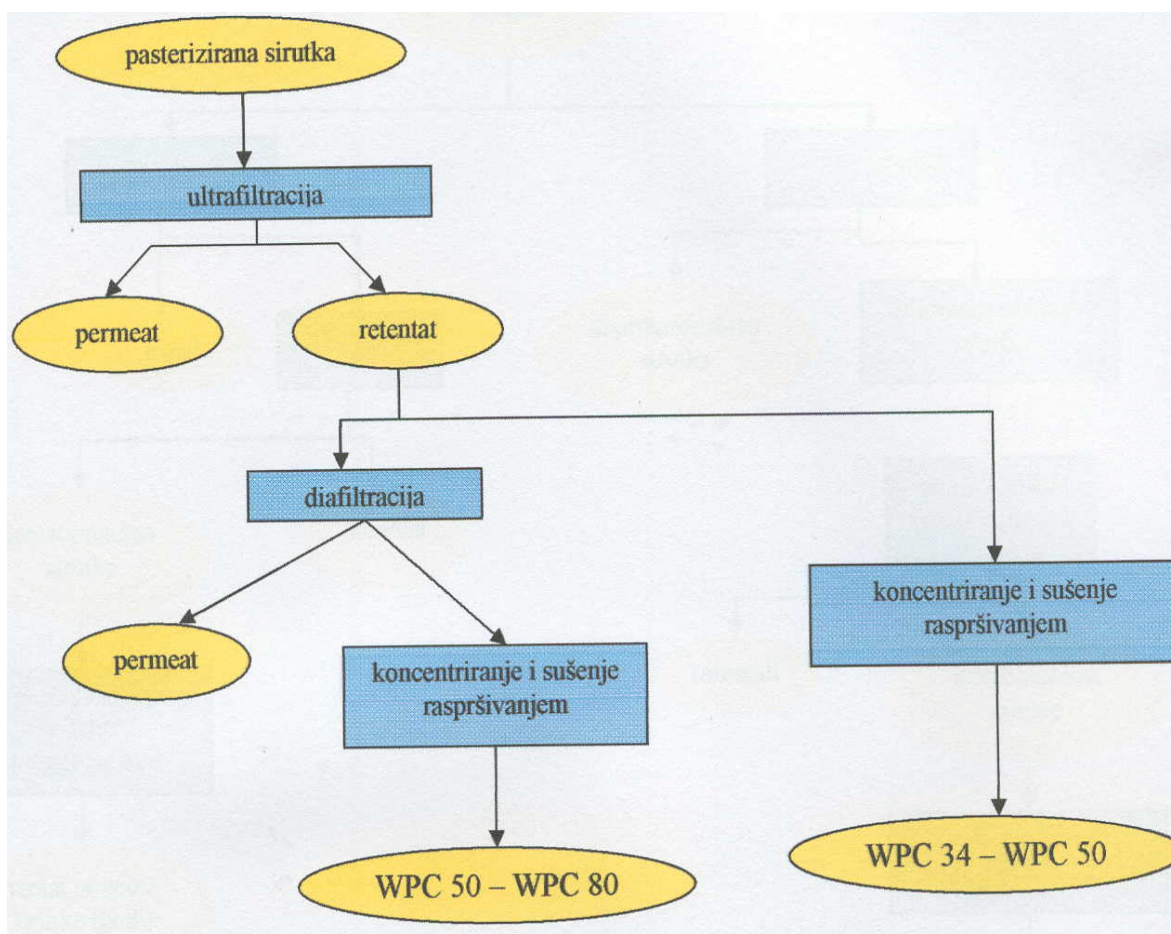
Izolat proteina sirutke je proizvod koji sadrži oko 90 % proteina, a dobiva se postupkom ionske izmjene (slika 16). Kod tog postupka potrebno je prethodno podešiti pH vrijednost sirutke zbog postizanja željenog naboja proteinske molekule. Prolaskom kroz ionski izmjenjivač na njemu se adsorbiraju proteinske molekule, a izdvaja deproteinizirana sirutka. Podešavanjem pH vrijednosti vrši se desorpcija proteina koji se potom koncentriraju ultrafiltracijom te naknadno suše raspršivanjem. Ovdje je potrebno naglasiti da je tijekom obrade proteina sirutke potrebno posebnu pažnju pokloniti sprječavanju uklanjanja biološki aktivnih sastojaka sirutke. Očuvanje prirodnog, nedenaturiranog stanja proteina od iznimne je važnosti za njegovu antikancerogenu i imuno-stimulativnu aktivnost. Često se u proizvodnji izolata proteina sirutke koristi mikrofiltracija, tzv. Flow micro filtration (FMF) postupak. To je postupak filtriranja sirutke kroz keramičke membrane (filtre) bez upotrebe kemijskih reagensa poput klorovodične kiseline ili natrijevog hidroksida koji se često koriste za podešavanje pH vrijednosti sirutke. Nakon provedene mikrofiltracije, proteini se najčešće suše raspršivanjem. Izolati proteina sirutke upotrebljavaju se kao dodatak u namirnicama gdje odlučujuću ulogu imaju čvrstoća gela, viskoznost, vezanje vode i topljivost, pri čemu izolati proteina sirutke mogu značajno poboljšati okus i teksturu gotovog proizvoda. Ovakvi proteini najčešće se dodaju zamrznutim desertima, pićima, sladoledima te sportskim suplementima. Izolat proteina sirutke pogodan je i za snižavanje pH, te u proizvodnji hranjivih napitaka.



Slika 16. Shematski prikaz dva različita procesa proizvodnje izolata proteina sirutke ([www.usdec.org](http://www.usdec.org))

### 2.2.3. KONCENTRAT PROTEINA SIRUTKE

Koncentrat proteina sirutke je prah dobiven sušenjem retentata (koncentrata) koji se zadržava na membrani pri ultrafiltraciji sirutke (slika 17). Ultrafiltracijom se dobiva koncentrat proteina sirutke koji sadrži oko 60% proteina sirutke. Veći udio proteina u suhoj tvari koncentrata proteina sirutke moguće je dobiti diafiltracijom. Proteini se mogu koncentrirati do 90% udjela u suhoj tvari u ograničenim količinama. Koncentrati sirutkinih proteina se primjenjuju u mnogim prehrambenim proizvodima kao što su jogurt, mliječni deserti, mesni proizvodi i pića, a najviše u pripremi hrane za dojenčad i dijetetske hrane (Tratnik, 1998).



Slika 17. Shematski prikaz procesa proizvodnje koncentrata proteina sirutke ([www.usdec.org](http://www.usdec.org))

Ekonomski promatrano, dalje koncentriranje može se opravdati jedino u slučaju kada se ovaj proizvod ugrađuje u finalni proizvod visoke tržišne vrijednosti, kao što su dijetalni proizvodi, farmaceutski ili specijalni kozmetički proizvodi. Prva generacija koncentrata proteina sirutke u prahu sadržavala je 30 - 40 % proteina te značajne količine laktoze, masti i denaturiranih proteina. Nazvana je «koncentratom» (WPC, «Whey Protein Concentrate»). Tako proizvedene proteine sirutke prvotno su izdvajali raznim postupcima taloženja (najčešće pomoću karboksimetilceluloze), pri čemu je dobiven denaturirani sirutkin protein visoke nutritivne vrijednosti ali smanjenih funkcionalnih osobina, što je često bila i posljedica termičkog tretmana koji se primjenjuje pri njihovu izdvajanju. S razvojem tehnike membranske separacije, omogućena je proizvodnja nendenaturiranih koncentrata proteina sirutke koji se mogu frakcionirati na različite proteinske komponente važne za proizvodnju dječje hrane. Na slici 17. dan je shematski prikaz procesa proizvodnje koncentrata proteina sirutke. Ultrafiltracija sirutke je jedna od najperspektivnijih tehnologija koja se koristi za

koncentriranje i izdvajanje nativnih proteina sirutke. Tehnološki proces dobivanja koncentrata sirutkinih proteina korištenjem ultrafiltracije, vrlo je jednostavan. Započinje centrifugalnim separatorom pomoću kojeg se vrši separiranje masti i čestica sira. Nakon separiranja vrši se pasterizacija, hlađenje i održavanje na određenoj temperaturi, a zatim slijedi ultrafiltracija ili diafiltracija, te sušenje. Tako proizvedeni koncentri proteina sirutke sadrže 70 - 80 % (pa čak i nešto više) proteina u suhoj tvari te manju količinu laktoze i masti.

Koncentrat može sadržavati druge sastojke koji se rijetko mogu naći u izolatima (zbog različitih procesnih rješenja). Tako koncentrat proteina sirutke sadrži daleko veći udio faktora rasta (IGF-1, TGF-alfa i TGF-beta), više različitih bioaktivnih lipida (konjugirane linolne kiseline), imunoglobulina i laktoferina. Istraživanja su pokazala da ti sastojci mogu jačati imunitet, povoljno utjecati na unutarnje organe i opće stanje organizma.

#### **2.2.4. HIDROLIZAT PROTEINA SIRUTKE**

Hidrolizat proteina sirutke proizvodi se enzimskom razgradnjom kod kontrolirane temperature i pH, iz sirovina kao što su koncentri proteina sirutke ili laktalbumin. Proteolitički enzimi cijepaju veze između aminokiselina, te nastaju peptidi s različitim brojem aminokiselina i slobodne aminokiseline. Hidrolizati proteina sirutke nalaze primjenu u visoko specijaliziranim nutricionističkim proizvodima kao što su pripravci za hranjenje sondom ili specijalni prehrambeni dodaci, te dječja hrana. Izbor prikladnog enzima i potrebna kontrola procesa hidrolize potrebni su kako bi se dobio željeni produkt hidrolizata.

### 2.3. FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA SIRUTKE

Koncentrati i izolati proteina sirutke imaju vrlo dobra funkcionalna svojstva i zbog toga se primjenjuju u proizvodnji mnogih prehrambenih proizvoda (tablica 7). Ta svojstva su: sposobnost vezanja vode, stvaranje pjene, emulgiranje, želiranje, topljivost i viskoznost.

Tablica 7. Upotreba proteina sirutke pri proizvodnji hrane (Herceg i Lelas, 2005)

PRIMJENA	SVOJSTVO
mlječni proizvodi sir topljeni sir	poboljšava nutritivna svojstva povećava mazivost poboljšava sposobnost vezanja vode smanjuje krtost
pekarska industrija	topljivost, bubrenje, struktura proizvoda, distribucija masti
mesna industrija	emulgiranje, stabiliziranje masti, poboljšanje strukture, formiranje gela, povećanje kapaciteta vezanja vode
emulgirani proizvodi (majoneze, preljevi za salate, juhe, umaci, deserti)	poboljšanje strukture i okusa, poboljšanje mazivosti, povećanje viskoznosti i povećanje stabilnosti emulzije
bezalkoholna pića	povećanje viskoznosti, topljivost kod nižeg pH

Funkcionalna svojstva proteina sirutke utječu na njihovo ponašanje u proizvodima tijekom pripreme, obrade, skladištenja i konzumacije, a na njih utječu brojni čimbenici od kojih su najvažniji: izvor sirutke, udio proteina, masti i mineralnih tvari, interakcije s drugim sastojcima hrane, stupanj denaturacije (Corradini, 1998.; Foegeding i sur., 2002).

**Topljivost** je jedna od najvažnijih osobina proteina, a ovisi o sastavu, pH i temperaturi. Proteini sirutke topljivi su u širokom rasponu pH. Stabilni su na djelovanje kiseline, ali je njihova topljivost najbolja izvan raspona pH 4 - 5 jer se njihove izoelektrične točke nalaze unutar tog područja. Topljivost se smanjuje pri povišenim temperaturama koje izazivaju denaturaciju. Kod 70 °C denaturiraju se imunoglobulini, a kod 100 °C  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin i albumin krvnog seruma te peptonske komponente proteina sirutke. Denaturacijom se kidaju S – S veze unutar molekula, što je uzrok odvajanju proteina koje rezultira netopljivošću. Topljivost proteina znatno opada pri višim temperaturama i povećanim udjelima proteina u koncentratu proteina sirutke. Koncentriranjem sirutke



uparavanjem, topljivost sirutkinih proteina se smanjuje za oko 25 %, dok za koncentrat proteina sirutke dobiven postupkom ultrafiltracije, smanjenje topljivosti nije utvrđeno.

U usporedbi s većinom drugih proteina, **viskoznost** koncentrata proteina sirutke u vodenoj otopini je niska, a ovisi o udjelu suhe tvari i proteina. Zbog slabijeg vezivanja vode, koncentrat proteina sirutke čak i pri višim udjelima suhe tvari (45 – 50 %) imaju nižu viskoznost nego što ima Na-kazeinat. Zbog toga se koncentrat sirutkinih proteina sa 50 % suhe tvari, mogu bez poteškoća sušiti raspršivanjem (Delaney, 1976). Sposobnost vezanja vode i viskoznost su usko povezana funkcionalna svojstva. Proizvodi koji vežu velike količine vode kao što su škrobovi i gume povećavaju viskoznost. Kada se proteini sirutke zagrijavaju, veze koje su odgovorne za njihovu globularnu strukturu pucaju. Kako se molekula proteina odmotava, stvaraju se dodatna mjesta za vezanje vode koja vode do povećanja viskoznosti otopine. Sirutka može povećati mutnoću ili prozirnost proizvodu, stvarajući tako više kremast mliječni napitak.

**Sposobnost vezanja vode** je izuzetno važno svojstvo proteina sirutke koji se koriste u prehrambenim proizvodima kao što su razni napitci, jogurti, sirevi ili mliječni proizvodi sa smanjenim udjelom mliječne masti, jer direktno utječe na strukturu proizvoda.

**Pjenjenje** se definira kao stvaranje i stabilizacija mjehurića zraka u tekućini. Formiranje pjene od proteinske smjese ovisi o sposobnosti proteinskih lanaca da se otvore i usmjere na međupovršine tekućina-zrak. Za to je neophodna brza difuzija proteina na međupovršinu radi smanjenja površinske napetosti, pri čemu dolazi do djelomičnog otvaranja proteinske molekule što rezultira inkapsuliranjem mjehurića zraka i asocijacijom proteinskih molekula čime se stvara intramolekulski kohezivni film određenog stupnja elastičnosti. Kada se suspenzija proteina sirutke u vodi miješa, inkorporira se zrak i stvara pjena stabilne strukture. Potpuna razgradnja proteinskih lanaca znači denaturaciju proteina koja rezultira stvaranjem krhke međupovršine i raspadom pjene. Sposobnost stvaranja pjene (povećanje volumena) i stabilnost pjene ovisi o više čimbenika od kojih su najvažniji kvaliteta proteina odnosno stupanj njihova denaturiranja, zatim udio proteina, udio Ca i drugih iona, temperatura, pH sredine i udio masti (Morr i Foegeding, 1990.; Jovanović i sur., 2005.) Proteini sirutke imaju dobru sposobnost stvaranja pjene kada nisu denaturirani. Povišena temperatura (iznad 60 °C) i prisutnost masti smanjuju sposobnost stvaranja pjene. S povećanjem udjela proteina, pjena postaje gušća.

Proteini sirutke djeluju kao dobri emulgatori jer smanjuju površinsku napetost između faza. Tu dolazi do izražaja njihova intramolekularna nabrana struktura s relativno podjednakom raspodjelom nepolarnih, polarnih, neutralnih te nenabijenih ili nabijenih

ostataka aminokiselina. Čimbenici koji utječu na emulgirajuće osobine slični su činiteljima koji utječu na stvaranje pjene i uvjetovani su sustavom koji se koristi za emulgiranje, ionskom jačinom sredine i tipom proteina sirutke (Webb i sur., 2002.). Kapacitet emulgiranja proteina direktno ovisi o topljivosti, tako da svi činitelji koji smanjuju topljivost utječu na snižavanje kapaciteta emulgiranja. Kod nativnih proteina emulgirajuća sposobnost je utoliko veća ukoliko je manji stupanj denaturacije. S obzirom da su proteini sirutke vrlo topljivi u kiselim sredinama, oni će djelovati kao emulgatori i pri niskim pH vrijednostima, kod kojih je većina drugih proteina netopljiva. U pH području 4 do 5 (izoelektričnom) nije moguće stvaranje stabilne emulzije.

Sposobnost **želiranja** je važna funkcionalna osobina proteina sirutke u proizvodnji pojedinih prehrambenih proizvoda. Niska toplinska stabilnost sirutkinih proteina ograničava njihovu primjenu u sustavima podvrgnutim djelovanju topline, ali omogućava proizvodnju novih tipova proizvoda na mliječnoj osnovi. U želiranje su uključene reakcije «otvaranja» proteina, vezivanja vode, interakcija protein - protein i imobilizacija vode. Proteini sirutke, zagrijavanjem pod određenim uvjetima otopine (pH, suha tvar, sastav mineralnih tvari) mogu stvarati vrlo elastične gelove. Zagrijavanje je prvi korak u tvorbi gela i što je temperatura viša, raste stupanj intramolekularnog vezivanja i gel je čvršći (Morr i Foegeding, 1990.; Jovanović i sur., 2005.). Želiranje se odvija u dvije faze. U prvoj dolazi do disocijacije molekula proteina, nakon čega slijedi agregacija i asocijacija u drugoj fazi što rezultira stvaranjem gela. Za stvaranje stabilnog gela bitno je da se agregacija odvija sporije. Kovalentne veze povećavaju čvrstoću gela. To pomaže proteinima da apsorbiraju i zadrže vodu i može povećati sočnost u mesnim proizvodima. Gelovi što ih stvaraju proteini sirutke su ireverzibilni te posjeduju važne osobine kao što su: čvrstoća, elastičnost i kohezivnost.

Tablica 8. Osnovne značajke interakcija proteinskih molekula u vodenim otopinama (Israelachvili, 1992)

Vrsta	Veza	Snaga veze	Duljina veze	Utjecaj pH	Utjecaj ionske jakosti	Utjecaj temperature
Hidrofobne	Privlačne	Jake	Duga	Ne utječe	Ne	Povećava
Elektrostatske	Odbojne	Slabe do jake <sup>a</sup>	Kratke do duge <sup>a</sup>	Utječe	Smanjuje	Povećava
Vodikove veze	Privlačne	Slabe	Kratke	Ne utječe <sup>b</sup>	Ne	Smanjuje
Hidratacijske	Odbojne	Jake	Kratke	Ne utječe	Ne	Smanjuje
Van der Waals	Privlačne	Slabe	Kratke	Ne utječe	Ne	-
Steričke	Odbojne	Jake	Kratke	Ne utječe	Ne	-
Disulfidne veze	Privlačne	Vrlo jake	Vrlo čvrste	Ne utječe	Da	ne

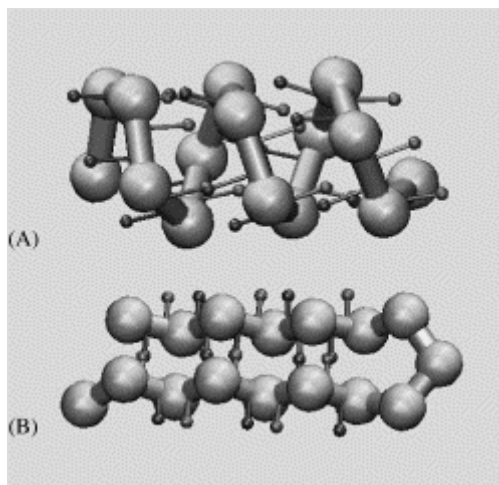
a – ovisi o pH i ionskoj jakosti

b – indirektno ovisi o pH i ionskoj jakosti zato jer utječu na stupanj hidratacije proteina

Izuzetno je važno razumjeti različite načine međudjelovanja proteina i iskoristiti ih na najbolji mogući način. Sa stajališta znanosti, funkcionalna svojstva proteina su određena makroskopskim svojstvima kao što su sposobnost želiranja i vezanja vode. Međutim, navedena svojstva proizlaze iz građe i međudjelovanja pojedinačnih proteinskih molekula i zbog toga je neophodno dobro razumijevanje njihove interakcije (tablica 8). U tablici 8. su prikazane vrste veza, njihove jakosti i duljine, te su navedeni čimbenici koji imaju utjecaj na interakcije pojedine veze. Većina proteina kada se zagrijava mijenja strukturu i to uglavnom ireverzibilno. Iznimka je kazein koji nije globularan protein i uglavnom nema uobičajenu sekundarnu i tercijarnu strukturu koja bi se mogla narušiti zagrijavanjem. S druge strane, proteini kao što su  $\alpha$ -laktalbumin i  $\beta$ -laktoglobulin podložni su toplinskim promjenama u području između 60 i 80 °C.  $\beta$ -laktoglobulin se toplinski denaturira ireverzibilno, dok je kod  $\alpha$ -laktalbumina denaturacija djelomično reverzibilna (Paulsson i Visser, 1992). Jednom kad se proteini toplinski denaturiraju, postoje mogućnosti za njihove daljnje reakcije. Ako su u

izoliranom sustavu, proteini sirutke mogu kod 70 °C stvarati gelove. U mlijeku, denaturirani proteini sirutke stupaju u reakciju s kazeinom, budući da i on sadrži sulfhidrilne grupe (Jang i Swaisgood, 1990). Dokazano je da proteini sirutke stvaraju komplekse s kazeinom preko disulfidnih mostova, a broj i zastupljenost tih veza ovisi o temperaturi i vremenu zagrijavanja (Dalglish i Hunt, 1995).

Proteini su po svojoj građi polipeptidi visoke molekulske mase. Primarna struktura proteina je slijed sastavnih aminokiselina i prostetičkih skupina. Pod sekundarnom i tercijarnom strukturom proteina podrazumijeva se trodimenzionalna usmjerenost makromolekule. Sekundarna struktura opisuje odnose susjednih skupina, a tercijarna nabiranje proteina. Kvaterna struktura je raspored mnogolančanih proteinskih kompleksa (Pine, 1994). Utvrđeno je da polipeptidni lanci proteina mogu biti vezani na specifične načine, koji ovise o sekvencama aminokiselina različitih proteina. Na taj način proteini mogu tvoriti strukture kao što su  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča (slika 18), koje nastaju stabilizacijom posebnih konformacija lanca uz povezivanje amino grupa polipeptidnog lanca vodikovim vezama (Branden i Tooze, 1991).



Slika 18. Prikaz strukture  $\alpha$  - uzvojnice ( A ) i  $\beta$ -nabrane ploče ( B ) (Pine, 1994)

**Steričke reakcije** nastaju zbog izrazito snažne odbojne interakcije između atoma ili molekula na bliskoj udaljenosti zbog preklapanja njihovih elektronskih oblaka (Israelachvili, 1992). Navedeno steričko odbijanje, preklapanjem definira veličinu i oblik atoma i molekula te utvrđuje koliko se blizu smiju nakupine molekula proteina gomilati. Interakcije steričkog preklapanja igraju iznimno važnu ulogu u utvrđivanju moguće konformacije proteina u otopini zbog toga što molekula ne može poprimiti nikakav prostorni raspored u kojima dva ili više segmenata zauzimaju isti prostor.

Na molekularnoj razini, **van der Waalsove interakcije** upravljaju između svih vrsta molekula pri čemu imaju sličan značaj kao i steričke reakcije (Israelachvili, 1992). Stoga one imaju samo manju ulogu u određivanju konformacije biopolimera u otopini jer postoji samo mala razlika u van der Waalsovima interakcijama u zamotanim ili odmotanim stanjima proteina. Međutim, ako je molekula biopolimera dovoljno velika da se ponaša kao koloidna čestica, tada mogu postojati iznimno značajna van der Waalsova privlačenja, koja pogoduju njegovim agregacijama sa drugim molekulama biopolimera (de Wit i Kessel, 1996).

**Hidrofobne interakcije** imaju manji utjecaj na konformaciju i interakcije molekula proteina u otopini (Israelachvili, 1992, Nakai i Li-Chan, 1988). Očituju se kao snažne privlačne sile između nepolarnih grupa koje su odvojene vodom (Israelachvili, 1992). Međutim, one nastaju zbog sposobnosti molekula vode da tvore relativno snažne vodikove veze sa drugim molekulama vode, pa nepolarne molekule mogu tvoriti samo relativno slabe van der Waalsove veze sa svojim susjedima (Israelachvili, 1992). Kada se nepolarna molekula uvede u vodu, molekule vode u njoj izravnoj blizini se preurede, što mijenja entropiju i entalpiju sustava. Te promjene su termodinamički nepoželjne tako da sustav nastoji smanjiti područje kontakta između vode i nepolarnih grupa, što proizvodi privlačne sile između nepolarnih grupa (Evans i Wennerstrom, 1994). Hidrofobne interakcije su relativno jake i dugog raspona (0 do 10 nm) (Israelachvili, 1992). Jedna od karakterističnih osobina hidrofobnih interakcija je njihova sklonost ka povećanju jakosti sa povišenjem temperature do 60-70 °C. Nakon toga počinju polagano gubiti jačinu što se više temperatura povisuje (Lumry i Rajeneder, 1970).

**Elektrostatske interakcije** djeluju između grupa (molekula) koje imaju trajan električni naboj, npr. dipola ili iona. One mogu biti privlačne ili odbojne u ovisnosti od relativne veličine naboja koji nose (Koning i Visser, 1992). Kada naboji imaju isti znak, interakcije su odbojne, ali kada imaju različite znakove one su privlačne (Israelachvili, 1992). Proteini mogu biti uključeni u mnoštvo različitih tipova elektrostatskih interakcija u ovisnosti od prirode uključenih molekularnih vrsta, kao npr. ion – ion, ion – dipol ili dipol –dipol (u

padajućem nizu jakosti). Znak, veličina i raspodjela naboja na molekuli proteina prije svega je upravljana pH vrijednosti okružujuće vodene otopine (Howell, 1992). Iznad izoelektrične točke (pI) proteini su negativno nabijeni, ispod nje su pozitivno nabijeni. U izoelektričnoj točki nemaju mrežu naboja (iako i dalje imaju dijelove pozitivnog naboja i dijelove negativnog naboja) (Doi, 1993). Elektrostatske interakcije između nabijenih vrsta su naročito osjetljive na ionsku jakost medija u kojem se nalaze (vode). Veličina i raspon interakcija može se osjetno smanjiti prisutnošću elektrolita zbog elektrostatskog prikrivanja protu-iona (Evans i Wennerstrom, 1994; Doi, 1993). Elektrostatske interakcije između nabijenih vrsta u otopini su prije svega entropijskog porijekla i zbog toga se povećava njihova jačina povišenjem temperature (Evans i Wennerstrom, 1994).

**Ionsko povezivanje** uključuje elektrostatske interakcije (Dickinson, 1992). Pojavljuje se prilikom simultanog vezanja polivalentnog iona na površine dviju molekula koje imaju suprotni naboj od iona. Ti polivalentni ioni mogu biti vrste male molekulske mase, kao što su  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , ili biopolimeri velike molekulske mase, kao što su polisaharidi ili proteini. Sposobnost polivalentnih iona za stvaranje ionskih mostova je određena njihovom sposobnošću slabljenja druge vrste interakcija koje su elektrostatske, te kroz elektrostatsko prikrivanje (Dickinson, 1992).

**Vodikove veze** stvaraju se između ionskog para elektrona na elektronegativnom atomu (npr. kisik) i vodikovog atoma na susjednoj grupi, npr.  $\text{O}-\text{H}^{\delta+}-\text{O}^{\delta-}$  (Baianu, 1990). Najveći doprinos vodikovim vezama daju elektrostatske veze (dipol – dipol), ali i van der Waals-ove sile i sterička odbijanja imaju značajan doprinos. Jačina veza varira između 10 i 40  $\text{kJmol}^{-1}$  i duljina je oko 0,18 nm. Stvarna jačina pojedine vodikove veze ovisi o elektronegativnosti i orijentaciji grupa donora i akceptora (Israelachvili, 1992). Vodikove veze su jače od većine drugih dipol – dipol interakcija zbog toga što vodikovi atomi imaju snažnu tendenciju da postanu pozitivno nabijeni i imaju mali radijus. Vodikove veze su toliko jake da mogu uzrokovati značajne promjene u konformaciji proteina. Jačina i karakter usmjerenja vodikovih veza odgovorni su za mnoga jedinstvena svojstva vode kao medija u kojem se najčešće nalaze otopljeni proteini sirutke (Fennema, 1996). Vodikove veze nisu glavna pokretačka sila u određivanju konformacije i agregacije globularnih proteina, međutim imaju značajnu ulogu u stabiliziranju jednom stvorene strukture (Kinsella i Whitehead, 1989).

**Hidratacijske interakcije** su odbojne interakcije kratkog raspona koje proizlaze iz međusobne blizine dviju hidratiziranih molekula (Israelachvili, 1992). Rezultat su energije potrebne za narušavanje vodikovih veza između molekule i molekula vode u njenoj neposrednoj okolini (Besseling, 1997). Jačina ove vrste interakcije ovisi o stupnju hidratacije

molekule. Što je veća hidratacija, jače je odbijanje i dulji je raspon interakcija. Ova vrsta interakcije može igrati važnu ulogu u sprječavanju agregiranja molekula proteina u otopini, naročito kod visokih koncentracija soli kada je vezanje iona na proteine najveće (Israelachvili, 1992).

Aminokiselina cistein, koja se nalazi u molekulama proteina sirutke posjeduje tiolnu grupu (-SH), koja je sposobna stvoriti **disulfidne mostove** (-S-S-) sa drugim tiolnim grupama reakcijom oksidacije (Kinsella, 1982). Slobodne tiolne grupe mogu sudjelovati u tio-disulfidnim razmjenama sa disulfidnim mostovima. Te reakcije obično se pojavljuju u alkalnim uvjetima. Proteini su sposobni stvarati intramolekularne i intermolekularne disulfidne mostove pod prikladnim uvjetima. Intramolekularni mostovi se stvaraju kada se par cisteinskih ostataka nađe u neposrednoj blizini zamatanjem proteinske molekule, dok se intermolekularni disulfidni mostovi stvaraju kada se cisteinski ostaci na različitim molekulama nađu u neposrednoj blizini (Howell, 1992). Slobodne tiolne i disulfidne grupe u nativnim proteinima sirutke nalaze se u unutrašnjosti zamotane molekule i stoga su nedostupne za interakciju, čak i pod uvjetima koji bi mogli pogodovati tiol/disulfidnoj razmjeni. Da bi došlo do stvaranja veza potrebno je da se proteini razmotaju kako bi se reaktivne sulfhidrilne grupe bile izložile vodenj fazi (Shimada i Cheftel, 1989).

Glavna sila koja se suprotstavlja zamatanju globularnih proteina je entropija povezana sa većim brojem konfiguracijskih položaja koje nezamotan protein relativno može zauzeti u odnosu na zamotan protein (Alber, 1989). Lokalna entropija ovisi o broju konformacija koje se mogu stvoriti povezivanjem aminokiselina duž polipeptida. Formiranje sekundarne strukture, kao što je  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča, primjer je smanjivanja lokalne entropije. Ne-lokalna entropija ovisi o mogućim konfiguracijama koje se mogu stvoriti kroz cijeli polipeptidni lanac (Alber, 1989). Lanac koji zauzima veliki volumen u prostoru može zauzeti veliki broj mogućih konformacija. Ako je volumen smanjen, broj mogućih konformacija se smanjuje. Hidrofobni učinak pogoduje zamotanom stanju biopolimera (Hvidt i Westh, 1992; McSwiney i sur., 1994). Važna posljedica ne-lokalne entropije je učinak kovalentno umreženih proteinskih lanaca. Uvođenje kovalentnog umrežavanja (npr. disulfidne veze) uvelike ograničava broj konformacija koje nezamotan tj. razmotan protein može zauzeti. Tako se smanjuje entropijska sila kojoj pogoduje razmatanje proteina. Stabilnost proteina se tako može modificirati uvođenjem ili uklanjanjem disulfidnih veza (mostova) (Kinsella, 1982).

Povećanje viskoznosti i stvaranje gelova jedno je od glavnih funkcionalnih svojstva proteina sirutke. Ona ovise o proteinskoj sposobnosti da tvore nakupine (agregate), a nastajanje istih posljedica je prethodno prikazanih molekularnih interakcija. U nativnom

stanju, privlačne sile (uglavnom van der Waalsove i hidrofobne) između molekula proteina nisu dovoljno jake kako bi prevladale odbojne sile (uglavnom elektrostatske, hidratacijske i entropijske). Stoga, molekule teže postojati kao individualni subjekti ili kao mali agregati. Mnoge od reaktivnih aminokiselina (nepolarne ili ostaci cisteina) smještene su u unutrašnjosti globularnih proteina, tako da je obično potrebno potaknuti neki stupanj razmatanja proteina prije nego što agregacija počne (Kinsella i Whitehead, 1989).

U vodenim otopinama, proteini sirutke postoje u dva ravnotežna stanja: nativno i denaturirano (Kilara i Harwalker, 1996). Nativno stanje je kompaktna, organizirana globularna konformacija, dok je denaturirano stanje više slučajno orijentirano, neorganizirano stanje. Konformacija koju protein poprima pod određenim uvjetima okoline (pH, ionska jakost temperatura, sastav otapala) ovisi o ravnoteži između međumolekulskih sila (Kilara i Harwalker, 1996).

Na zadržavanje zamotanog stanja proteina sirutke najvećeg utjecaja u otopini ima hidrofobni učinak, dok je glavna sila koja pogoduje razmotanom stanju konfiguraciona entropija. Kod relativno niskih temperatura ( $< 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) dominira hidrofobni učinak koji proteine zadržava u globularnom stanju, dok kod viših temperatura dominira konfiguraciona entropija što pogoduje razmotanom stanju (Hvidt i Westh, 1992; McSwiney i sur., 1994).

### **2.3.1. INTERAKCIJE HIDROKOLOIDA SA SASTOJCIIMA HRANE**

Hidrokoloidi su hidrofilni biopolimeri velike molekulske mase koji se upotrebljavaju kao funkcionalni dodaci u prehrambenoj industriji za kontrolu mikrostrukture, teksture, okusa, viskoznosti, sinereze itd. Hidrokoloidi su uglavnom polisaharidi ekstrahirani iz raznih biljaka ili morskih algi (Dickinson i sur., 1994).

Postoji velika razlika u funkcionalnim svojstvima između različitih biopolimera ovisno o kemijskoj strukturi i uvjetima okoline (pH, ionska jakost, specifični ioni). Funkcionalnost pojedinih biopolimera je također pod utjecajem međudjelovanja sa drugim komponentama hrane; proteinima, polisaharidima, lipidima, šećerima, solima i dr. Proteini i polisaharidi doprinose strukturalnim i teksturalnim svojstvima hrane zahvaljujući svojstvu agregacije i želiranja. Nadalje, proteini su vrijedni zbog svojstva pjenjenja i emulgiranja dok su za polisaharide značajna svojstva vezanja vode i bubrenja. Pojednostavljena usporedba funkcionalnih i molekularnih svojstava proteina i polisaharida je prikazana u tablici 9.



Tablica 9. Sličnosti i razlike u fizičkim i funkcionalnim značajkama proteina i polisaharida (Dickinson, 2003)

<i>Sličnosti</i>	
• Polimeri prirodnog porijekla	
• Široko rasprostranjeni u koloidima hrane	
• Upotreba u farmaceutske, kozmetičke i druge svrhe	
• Složena struktura	
• Ekološki prihvatljivi polimeri	
• Kompleksno agregacijsko ponašanje	
• Želirajuće/stabilizirajuće komponente	
<i>Razlike</i>	
<i>Proteini</i>	<i>Polisaharidi</i>
• Velik broj različitih struktura	• Slična struktura
• Reaktivni	• Nereaktivni
• Monodisperzni	• Polidisperzni
• Ravnolančani	• Ravnolančani ili razgranati
• Fleksibilan lanac	• Čvrsti lanac
• Srednja molekulska masa	• Velika molekulska masa
• Mali volumen molekule	• Veliki volumen molekule
• Amfoterni	• Hidrofilni
• Površinski-aktivni	• Površinski inaktivni
• Polielektroliti	• Ne-ionski ili nabijeni
• Svojstvo emulgiranja/pjenjenja	• Svojstvo bubrenja/vezanja vode
• Temperaturno labilni	• Temperaturno neosjetljivi
• Sposobnost jakog površinskog vezanja	• Slabo površinsko vezanje

**Međudjelovanje hidrokoloida i proteina :**

Priroda i jakost interakcija protein-hidrokoloid u otopini i na granici faza ima važan utjecaj na stabilizaciju disperznih sustava (Dickinson, 1992). Velik broj mliječnih proizvoda sadrži veliku količinu koloidnih čestica čija površina je proteinske prirode. Učinak adsorpcije ili ne-adsorpcije polisaharida na ovu površinu se mora uzeti u obzir pri razumijevanju sustava: mliječni proteini-hidrokoloidi. Proteini sirutke djeluju kao otopljeni polimeri male molekularne mase sve dok pod djelovanjem topline ili visokog tlaka ne dođe do odmotavanja strukture ili nastajanja agregata.

Trojni polimerni sustav (otapalo i dva polimera) predstavlja složeni sustav; prirodni proteini i polisaharidi su višekomponentni sustav već sami za sebe, koji čini mješavina polimernih dijelova od kojih svaki ima različite monomerne jedinice u različitom slijedu i često polidisperzne. Miješanje unutar trojnog polimernog sustava je prvenstveno kontrolirano entalpijom tj. određeno je relativnom snagom interakcija između polimera međusobno te između polimera i otapala, uz dodatnu entropiju zbog oslobađanja vezane vode (Syrbe i sur., 1998).

Razlikuju se tri moguća stanja ravnoteže (Albertsson, 1971):

- ☉ *Inkompatibilnost*: međudjelovanje između različitih biopolimera je više odbojno u usporedbi sa prosječnim interakcijama među polimerima koji se privlače. U ovom slučaju dešava se segregacija biopolimera te se stvaraju dvije odijeljene vodene faze; jedna bogata sa proteinom a druga sa hidrokoloidom.
  
- ☉ *Kompleksna koacervacija*: privlačne sile između različitih biopolimera uzrokuju nastajanje polimernog kompleksa. Ponovno se odvajaju dvije vodene faze, uz razliku da se sada oba biopolimera nalaze u istoj fazi, dok je druga faza bez biopolimera. Ovo stanje je karakteristično za otopine suprotno nabijenih polielektrolita. Dodatan doprinos entalpiji u ovom slučaju daje oslobađanje protu-iona iz ioniziranih ostataka makromolekula. Koacervacija zahtjeva ne-specifične elektrostatske interakcije koje ostavljaju polimerne molekule sa određenom pokretljivošću. U protivnom, dinamička ravnoteža je narušena i dolazi do ireverzibilne precipitacije. Visoka koncentracija polimera potiskuje kompleksnu koacervaciju: kada koncentracija sustava dostigne onu koacervata nestaje pokretačka sila za faznu separaciju (Burgess, 1994).

- ☉ *Mješivost:* ako je kontakt između različitih biopolimera sličan kontaktu između istovrsnih polimera dešava se spontano miješanje. Takav sustav ostaje homogen i kod visokih koncentracija polimera. Porastom molekularne mase biopolimera, ravnoteža između ne previše odbojnih i ne previše privlačnih sila postaje narušena, tako da su polimeri velike molekularne mase skloni kompleksnoj koacervaciji ili inkompatibilnosti prije nego miješanju.

### ***Utjecaj pH i ionske jakosti na stvaranje kompleksa protein-hidrokoloid***

*Protein- neionski hidrokoloidi:* ionska jakost i pH utječu na samoudruživanje proteina zbog odbijanja između proteinskih molekula. Samoudruživanje hidrokoloida te vezanje hidrokoloida i proteina je u ovom slučaju od manje važnosti. Inkompatibilnost je u direktnoj vezi sa samoudruživanjem proteina, koje je najjače u blizini izoelektrične točke zbog privlačnih dipolskih interakcija, a smanjuje se prema kiselom odnosno alkalnom području zbog porasta naboja proteina.

*Protein- anionski hidrokoloidi:* anionski hidrokoloidi su općenito karboksilirani ili sulfatirani i imaju izoelektričnu točku oko ili ispod pH 3. U pH području uobičajenom za namirnice imaju malu tendenciju za samoudruživanjem. Za razliku od neionskih hidrokoloida, za ovu skupinu su važne Columbove interakcije sa proteinima. Kompleksna koacervacija se dešava pri  $pI_{\text{hidrokoloid}} < \text{pH} < pI_{\text{protein}}$ , jer tada polimeri imaju različit naboj. Uzimajući u obzir ovisnost o pH pri  $\text{pH} > pI_{\text{protein}}$  razliku treba napraviti između sulfatiranih i karboksiliranih hidrokoloida. Povećavanje negativnog naboja na proteinima ima dva suprotna učinka: smanjeno je umrežavanje protein-hidrokoloid (zbog manjeg broja pozitivno nabijenih mjesta za anionski hidrokoloid), kao i samoudruživanje proteina (razlog je jače obijanje među proteinima). Prvi učinak pospješuje, a drugi smanjuje segregaciju (odjeljivanje) protein-hidrokoloid kompleksa (Tolstoguzov, 2002).

**Galaktomanani** imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji kao sredstva za zgušnjavanje, sredstva za vezanje vode i stabilizirajuće tvari. Kemijsku strukturu galaktomanana čini osnovni lanac 1,4-β-D-manoza na kojeg su vezani bočni lanci 1,6-α-D-galaktoze. Guar ima veću relativnu veliku molekularnu masu (oko  $10^6$  g mol<sup>-1</sup>) u usporedbi sa caruba gumom ( $3 \times 10^5$  g mol<sup>-1</sup>) (Schorsch i sur., 1997), a karakterizira ga i veći stupanj supstitucije galaktoze (oko 40%) vezane na bočni lanac (Maier i sur., 1992). Upravo količina prisutne galaktoze u značajnoj mjeri određuje fizikalna svojstva ovih galaktomanana. Niži udio galaktoze pospješuje sinergističke interakcije sa drugim biopolimerima te određuje sposobnost želiranja. Osim galaktoze vezane u bočnim lancima, na funkcionalnost značajno utječe i količina i raspored galaktoze u odnosu na manozu unutar glavnog lanca (Morris i sur., 1981).

**Guar guma** koja se najčešće ekstrahira iz sjemenki *Cyamopsis tetragonolobus*, posjeduje značajan udio galaktoze te je karakterizirana vrlo dobrom topljivošću i sposobnošću bubrenja u toploj i u hladnoj vodi (Wang, 1975).

**Metilceluloza** se sastoji od lanca celuloze (prirodnog ugljikohidrata) koji sadrži osnovne jedinice anhidroglukoze koje se ponavljaju. Tijekom proizvodnje celuloza etera, celulozna vlakna se tretiraju sa otopinom lužine, koja je prethodno tretirana s metil kloridom. Dodali do supstitucije anhidroglukoznih jedinica sa glukozom. Nastali produkti mogu se razlikovati prema stupnju zasićenja s metilnim jedinicama. Reakcijski produkt se pročišćava i melje u fini prah. Koncentracija, molekularna masa i stupanj supstitucije značajno utječu na reološka svojstva ovog hidrokoloida. Tečenje se uglavnom opisuje kao dilatantno, premda preparati sa niskim stupnjem supstitucije pokazuju pseudoplastična obilježja. Ovisno o molekularnoj masi i stupnju supstitucije, komercijalni preparati uglavnom imaju viskoznost od 100 mPa·(2%) (METHOCEL Cellulose Ethers, DOW, [www.dow.com](http://www.dow.com)).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. MATERIJALI

Ispitivanja su provedena sa 10%-tnim (g/g suhe tvari) suspenzijama pripremljenim miješanjem vode i izolata proteina sirutke, koncentrata proteina sirutke, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina, te modelnim sustavima navedenih proteinskih pripravaka s dodatkom guar gume, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu.

Za pripremu modelnih sustava bilo je potrebno preračunati udio proteina s obzirom na udio suhe tvari (odnosno vode). Uzorci su pripremljeni na slijedeći način: odvagana je masa proteinskog pripravka tako da je postignuta korekcija s obzirom na udio suhe tvari (10 g/g suhe tvari). Odvagana masa proteinskog pripravka prebačena je u tikvicu koja je nadopunjena vodom do 300 mL. Uzorci su homogenizirani na magnetskoj miješalici kroz 30 minuta. U drugom djelu eksperimentalnog rada, koji je rađen s dodacima guar gume, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu, ukupni udio suhe tvari u sustavima sa guar gumom i metil celulozom bio je 10 %, sa mlijekom u prahu 15 %, odnosno sa saharozom 20 %. Kod modelnih suspenzija koji su pripremljeni s guar gumom ili metil celulozom (suspenzije izolata proteina sirutke i koncentrata proteina sirutke) 0,5% udjela je guar gume ili metil celuloze, a 9,5 % suhe tvari je proteinskog pripravka. Kod modelnih suspenzija koji su pripremljeni sa saharozom (suspenzije izolata proteina sirutke i koncentrata proteina sirutke) 10 % suhe tvari je proteinskog pripravka, a udio saharoze je 10%, dok je kod modelnih suspenzija koji su pripremljeni sa dodatkom mlijeka u prahu 10 % suhe tvari proteinskog pripravka, 5% udjela je mlijeko u prahu.

Za ispitivanja su upotrijebljeni slijedeći pripravci, čiji kemijski sastav je deklarirao proizvođač:

➡ **Izolat proteina sirutke u prahu** BiPRO (Davisco Food International, Inc.,  
Le Sueur, Minnesota, USA)

Sastav :	Proteini *	: 92,8 %
	Voda	: 5,0 %
	Masti	: 0,5 %
	Pepeo	: 1,7 %

\* izraženo na suhu tvar (N x 6,38)

➡ **Koncentrat proteina sirutke u prahu** ("Meggle" GmbH, Wasserburg, Germany)

Sastav : Proteini : 60 %  
Voda : 3,0 %  
Pepeo : 6,0 %  
Laktoza : 25,0 %  
Masti : 6,0 %

➡ **Hidrolizat proteina sirutke u prahu** BioZate 5 (Davisco Food International, Inc., Le Sueur, Minnesota, USA)

Sastav : Proteini \* : 94,0 %  
Voda : 2,0 %  
Pepeo : 2,0 %  
Laktoza : max 1,0 %  
Masti : max 1,0 %

\* izraženo na suhu tvar (N x 6,38)

➡ **α – laktalbumin** BioPURE (Davisco Food International, Inc., Le Sueur, Minnesota, USA)

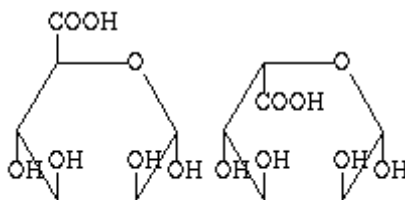
Sastav : α – laktalbumin\* : 95,0 %  
Voda : 3,0 %  
Masti : 0,5 %  
Pepeo : 1,5 %

\* izraženo na suhu tvar (N x 6,38)

- ➔ **Guar guma** E 412, Supreme Gums Pvt. Ltd., Jaipur, India (dobavljač: IREKS AROMA d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

Galaktomanan (Manoza (1-4) + Galaktoza (1-6) svaka druga jedinica je manoza)

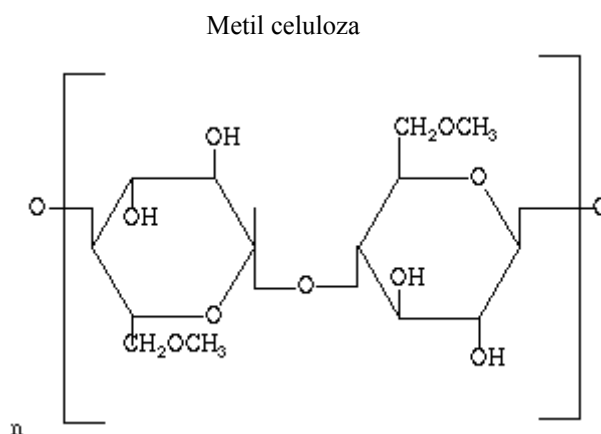
$M_w = 220,000 \pm 20,000$  Da



Slika 19. Sastavne jedinice guar gume: manuronska kiselina i guluronska kiselina ([www.npguar.com/aboutguar.htm](http://www.npguar.com/aboutguar.htm))

- ➔ **Metil celuloza** METHOCEL® FOOD GRADE E461, The Dow Chemical Company, Dow Europe GmbH, Horgen, Switzerland (dobavljač: IREKS AROMA d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

$M_w = 41,000$  do  $63,000$  Da



Slika 20. Prikaz osnovne jedinice metil-celuloze (Methocel™) (<http://class.fst.ohio-state.edu>)



Komercijalni naziv	Methocel
Stupanj zasićenja	1,6-1,9
Probavljivost	Ne
Formiranje gela	Termalni gel na 55-60° C
Reakcije s kationima	Ne
Interakcije s proteinima	Ne

➡ **Saharoza** p.a., Kemika d.d., Heinzelova 53, Zagreb, Hrvatska

➡ **Punomasno mlijeko u prahu** (DUKAT, Zagreb)

Sastav:	Masti	26,1%
	Laktoza	39,8%
	Pepeo	3,0%
	Voda	4,8%
	Proteini	26,3%

Tablica 10. Oznake uzoraka

OZNAKA UZORKA	OPIS UZORKA
IP	izolat proteina sirutke (netretirani)
WPC	koncentrat proteina sirutke (netretirani)
$\alpha$ -LA	$\alpha$ – laktalbumin (netretirani)
HP	hidrolizat proteina sirutke (netretirani)
WPC + S	koncentrat proteina sirutke (netretiran) s dodatkom 10 % saharoze
WPC + MP	koncentrat proteina sirutke (netretiran) s dodatkom 5 % mlijeka u prahu
IP + S	izolat proteina sirutke (netretiran) s dodatkom 10 % saharoze
IP + MP	izolat proteina sirutke (netretiran) s dodatkom 5 % mlijeka u prahu
20UZ15	Tretirano ultrazvukom od 20 kHz, intenziteta 43–48 W/cm <sup>2</sup> kroz 15 minuta
20UZ30	Tretirano ultrazvukom od 20 kHz, intenziteta 43–48 W/cm <sup>2</sup> kroz 30 minuta
40UZ15	Tretirano ultrazvukom od 40 kHz, intenziteta 5 W/cm <sup>2</sup> kroz 15 minuta
40UZ30	Tretirano ultrazvukom od 40 kHz, intenziteta 5 W/cm <sup>2</sup> kroz 30 minuta
500UZ15	Tretirano ultrazvukom od 500 kHz, intenziteta 2 W/cm <sup>2</sup> kroz 15 minuta
500UZ30	Tretirano ultrazvukom od 500 kHz, intenziteta 2 W/cm <sup>2</sup> kroz 30 minuta
30UZ3	Tretirano ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 3 minute
30UZ5	Tretirano ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minuta
30UZ10	Tretirano ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minuta

OZNAKA UZORKA	OPIS UZORKA
IP30UZ5+S	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minute i dodatkom 10 % saharoze
IP30UZ10+S	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minute i dodatkom 10 % saharoze
IP30UZ5+MP	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minute i dodatkom 5 % mlijeka u prahu
IP30UZ10+MP	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minute i dodatkom 5 % mlijeka u prahu
IP30UZ3 + G	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % guar gume
IP30UZ5 + G	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume
IP30UZ10 + G	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume
IP30UZ3 + C	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % metil celuloze
IP30UZ5 + C	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze
IP30UZ10 + C	izolat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze
WPC30UZ5+S	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minute i dodatkom 10 % saharoze
WPC30UZ10+S	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minute i dodatkom 10 % saharoze
WPC30UZ5+MP	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minute i dodatkom 5 % mlijeka u prahu
WPC30UZ10+MP	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minute i dodatkom 5 % mlijeka u prahu
WPC30UZ3 + G	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % guar gume
WPC30UZ5 + G	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume
WPC30UZ10 + G	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % guar gume
WPC30UZ3 + C	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 3 minute i dodatkom 0,5 % metil celuloze
WPC30UZ5 + C	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 5 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze
WPC30UZ10 + C	koncentrat proteina sirutke tretiran ultrazvukom od 30 kHz, intenziteta 73–78 W/cm <sup>2</sup> kroz 10 minuta i dodatkom 0,5 % metil celuloze

## 3.2. METODE RADA

### 3.2.1. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM SONDOM OD 20 kHz

Suspenzije proteina sirutke stavljene su u tikvicu s ravnim dnom, volumena 400 mL. Uzorci su tretirani kroz 15 i 30 min sa ultrazvukom visoke snage i visokog intenziteta. Korištena je ultrazvučna sonda promjera 12 mm, te nazivne frekvencije od 20 kHz\* (Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA, Model: V1A, maksimalne snage 600 W) te je spojena na pretvarač snage kako bi se osigurao visoki intenzitet (slika 21). Sonda ima vibrirajući titanski vrh koji je uronjen u tekućinu, te je tekućina tretirana s ultrazvučnim valom direktno s vrha sonde. Intenzitet ultrazvuka izmjeren je kalorimetrijski sa termočlankom (model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd., Leighton Buzzard LU7 4AD, UK) i izražen u  $W/cm^2$ .



Slika 21. Ultrazvučni postav sa sondom od 20 kHz

\* u daljnjem tekstu ultrazvuk od 20 kHz

### 3.2.2. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM SONDOM OD 30 kHz

Suspenzije proteina sirutke stavljene su u čašu, volumena 600 mL. Uzorci su tretirani kroz 3, 5 i 10 min sa ultrazvukom visoke snage i visokog intenziteta, te niske frekvencije. Korištena je ultrazvučna sonda promjera 10 mm, te nazivne frekvencije od 30 kHz\* (Hielscher-Ultrasound Technology, Hielscher Ultrasonics, GmbH, Warthestrasse 21D-14513, Teltow, Germany, UP100H (100W, 30 kHz)) koja je bila spojena na pretvarač snage kako bi se osigurao visoki intenzitet (slika 22). Sonda ima vibrirajući titanski vrh koji je uronjen u tekućinu, te je tekućina tretirana s ultrazvučnim valom direktno s vrha sonde. Intenzitet ultrazvuka izmjeren je kalorimetrijski i izražen u  $W/cm^2$ . Temperatura je mjerena laserskim termometrom (RAYTEK, Minitemp FS, European Headquarters Raytek GmbH, Berlin, Germany).



Slika 22. Ultrazvučna sonda od 30 kHz

\* u daljnjem tekstu ultrazvuk od 30 kHz

### 3.2.3. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM KUPELJI OD 40 kHz

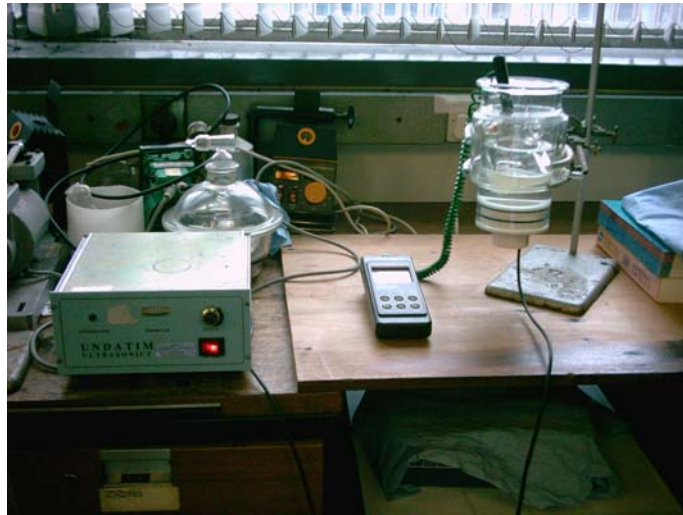
Suspenzije proteina sirutke stavljene su u Erlenmeyer tikvicu, volumena 400 mL te uronjene u kupelj od 40 kHz (Sonomatic, Model SO375T, HF-Pk-300 W – dimenzija: 370 x 175 x 250 mm; unutarnjih dimenzija: 300 x 150 x 150 mm). Ultrazvučni pretvarač spojen je na vanjski plašt kupelji, te je tekućina tretirana sa površine spremnika za tekućinu. Konstantan ultrazvučni val formiran je unutar tekućine. Tipična akustična amplituda u takvom sonokemijskom reaktoru je puno manja nego u reaktoru tipa sonde. Intenzitet ultrazvuka izmjeren je kalorimetrijski sa termočlankom model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd., Leighton Buzzard LU7 4AD, UK) i izražen u  $W/cm^2$ . Tretiranje je trajalo 15 i 30 minuta.



Slika 23. Ultrazvučna kupelj od 40 kHz

### 3.2.4. TRETIRANJE ULTRAZVUČNOM KUPELJI OD 500 kHz

Suspencije proteina sirutke stavljene su u Erlenmeyer tikvicu, volumena 400 mL koja je uronjena u kupelj od 500 kHz (Undatim Ultrasonics, Model ES01/06/92, snaga 100 W). Intenzitet ultrazvuka izmjeren je kalorimetrijski sa termočlankom model: HI 9063, Hanna Instruments Ltd., Leighton Buzzard LU7 4AD, UK) i izražen u  $W/cm^2$ . Tretiranje je trajalo 15 i 30 minuta.



Slika 24. Ultrazvučna kupelj od 500 kHz

### 3.2.5. ODREĐIVANJE SNAGE I INTENZITETA ULTRAZVUKA

Kako ultrazvučni tretman tekućine stvara toplinu, praćenje temperature u funkciji vremena vodi do izračunavanja akustične snage (u W) prema izrazu Margulis i Maltsev, 1969; i Margulis i Margulis, 2003.

$$P = m \cdot c_p \cdot \frac{dT}{dt} \quad (2)$$

gdje je:  $m$  – masa tretirane tekućine (g)

$c_p$  – specifični toplinski kapacitet kod konstantnog tlaka (J/gK)

$dT/dt$  – nagib krivulje

Intenzitet se izražava kao  $W$  po jedinici emitirajuće površine ( $W/cm^2$ ) ili u  $W$  po jedinici volumena tekućine koja se tretira ( $W/cm^3$ ).

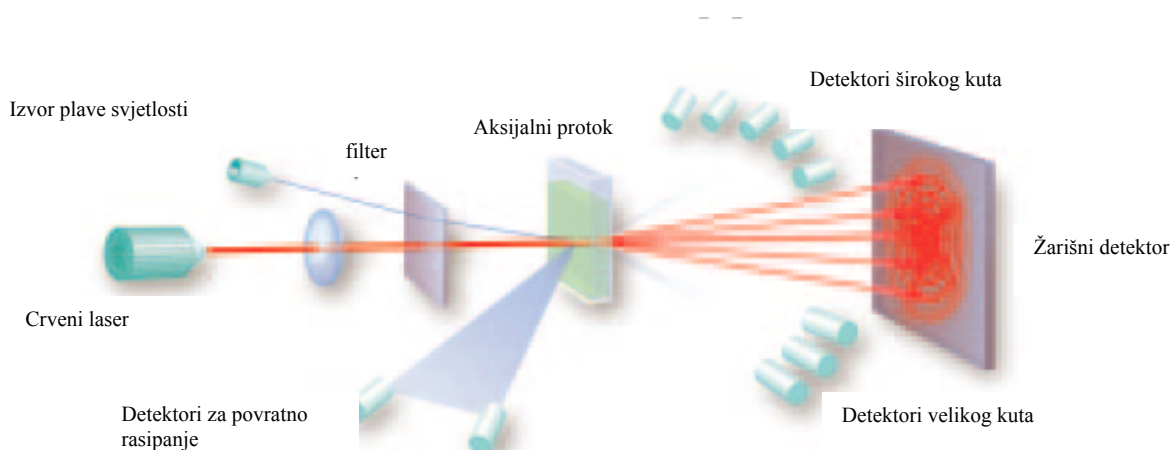
### 3.2.6. ODREĐIVANJE RASPODJELE VELIČINE ČESTICA

Mjerenje raspodjele veličine čestica proteina sirutke i obranog mlijeka u prahu provedeno je na instrumentu Malvern Instruments Limited (Malvern, Worcestershire, UK, Hydro MU sample dispersion unit), te obradom rezultata na Mastersizer 2000 software-u. Prilikom mjerenja upotrijebljena je leća ranga 100 mm. Princip rada uređaja za određivanje raspodjele veličine čestica bazira se na odstupanju laserske zrake tijekom prolaza kroz vodenu suspenziju čestica ispitivanog materijala. Neposredno prije mjerenja, ultrazvukom je tretirana suspenzija čestica ispitivanog materijala sa svrhom razbijanja aglomerata čestica nastalih zbog primanja vlage iz okoline. Za analizu dobivenih rezultata upotrijebljena je MIE-ova teorija pri čemu je odstupanje od modela iznosilo 1-2%.

Određivanje raspodjele veličine čestica provedeno je na osnovu volumena čestica.

$$V = \frac{4}{3} \cdot r^3 \cdot \Pi \quad (3)$$

gdje je:  $V$  = volumen kugle ( $\text{m}^3$ )  
 $r$  = polumjer kugle (m)



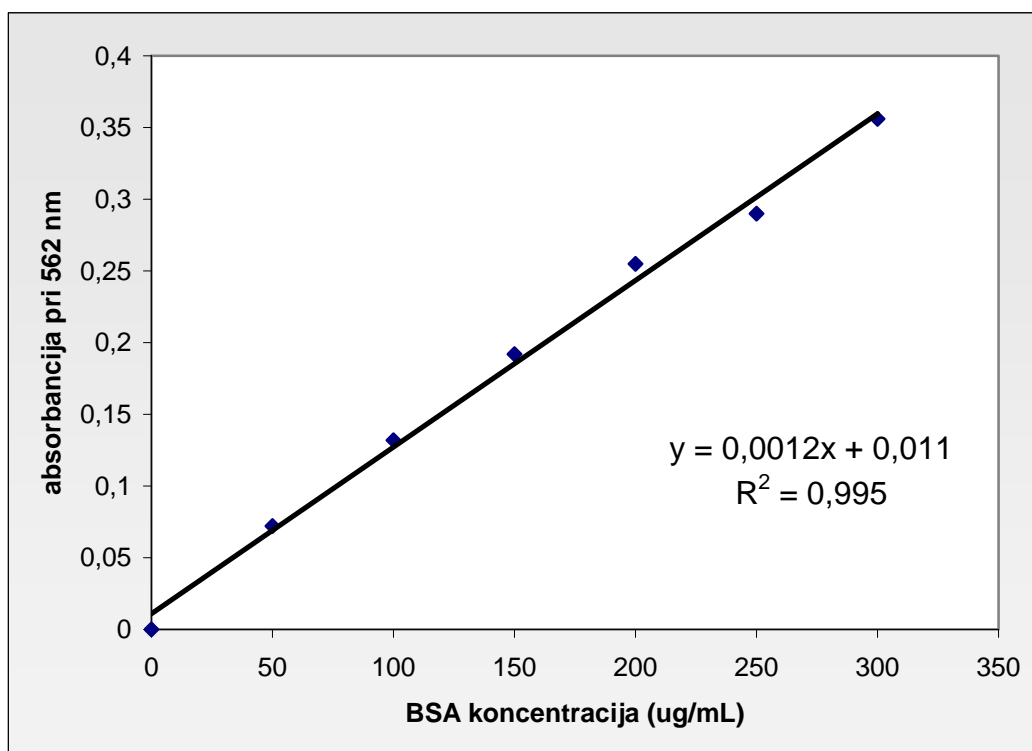
**Slika 25.** Shematski prikaz rada uređaja za određivanja veličine čestica difrakcijom laserske zrake  
 ([www.malvern.com/LabEng/products/Mastersizer/MS2000/mastersizer2000.htm](http://www.malvern.com/LabEng/products/Mastersizer/MS2000/mastersizer2000.htm))



### 3.2.7. ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI

Topljivost proteina određena je spektrofotometrijski pomoću BCA seta za određivanje proteina (Smith i sur., 1985). Reakcija se odvija u dvije faze. Alikvot otopine proteina (1 mL) se centrifugira pri 12 500 o/min 25 minuta pri 20°C. 100 µL supernatanta doda se u 2 mL BCA reagensa. Nakon inkubiranja pri 37°C 30 minuta uzorak se ohladi na 20°C te se spektrofotometrijski izmjeri apsorbancija pri 562 nm.

Na osnovu baždarnog krivulje (standard albumin krvnog seruma) odredi se udio proteina u uzorku. Topljivost proteina se izražava kao postotak proteina u supernatantu u odnosu na ukupni udio proteina u uzorku.



Slika 26. Standardni oblik baždarnog pravca za određivanje udjela proteina

### 3.2.8. ODREĐIVANJE ZNAČAJKI PJENJENJA

**Povećanje volumena pjene** mjeri se nakon miješanja mikserom kod najveće brzine ukupno 15 minuta. Sto mililitara 10%-tne suspenzije miješa se u mikseru (PHILIPS, HR 1565, 350 W) te se u intervalima od po 5 minuta uzima po 100 mL pjene koja se potom izvaže. Nakon vaganja pjena se vraća u posudu miksera i miješanje se nastavlja dalje, dok se ne izvrše sva tri mjerenja (nakon 5, 10 i 15 minuta).

Nakon 15 minuta izračuna se postotak povećanja volumena na slijedeći način (Weeb i sur., 2002):

$$\% \text{ povećanja} = \frac{(\text{masa } 100 \text{ mL suspenzije proteina} - \text{masa } 100 \text{ mL pjene}) \times 100}{\text{masa } 100 \text{ mL pjene}} \quad (4)$$

**Stabilnost pjene** se mjeri nakon miješanja mikserom pri najvećoj brzini, a miješanje traje 30 minuta. Odmjeri se 100 mL 10%-tne suspenzije, te miješa u mikseru 30 minuta pri maksimalnoj brzini. Zatim se u čašu stavi 100 mL pjene koja se izvrne u stakleni lijevak koji je uronjen u menzuru od 100 mL i sve stoji kod sobne temperature 15 minuta. Nakon 15 minuta odredi se količina izdvojene tekućine na slijedeći način (Weeb i sur., 2002):

$$M_t = (m_{li} + m_{mt}) - (m_m + m_{li}) \quad (5)$$

gdje je:  $M_t$  – masa ocijedene tekućine iz pjene (g)

$m_{li}$  – masa lijevka (g)

$m_{mt}$  – masa menzure s ocijedenom tekućinom (g)

$m_m$  – masa menzure (g)

Ovom metodom se može odrediti i:

Indeks stabilnosti pjene: vrijeme kad je pala prva kap tekućine.

Minimalna stabilnost pjene: vrijeme potrebno da se ocijedi sva pjena (Morr i sur., 1985).

### 3.2.9. ODREĐIVANJE EMULGIRAJUĆIH SVOJSTAVA

**Mutnoća** emulzije se određuje mjerenjem apsorbancije emulzije na spektrofotometru (Helios-b, Pye Unicam Ltd, Cambridge, UK), te se na osnovu nje izračuna vrijednost mutnoće. Priprema emulzije: emulzija se pripremi tako da se 3%-tna suspenzija pomiješa sa suncokretovim uljem u omjeru 2:1, te miješa mikserom 90 sekundi. Pripremljenoj emulziji mjeri se apsorbancija pri 500 nm u kiveti debljine 1 cm.

Mutnoća se računa kao:

$$T = 2,303 \cdot \frac{A}{I} \quad (6)$$

gdje je: T - mutnoća

A – apsorbancija kod 500 nm

I – debljina kivete (m)

**Indeks aktiviteta emulzije** računa se iz izraza (7):

$$IAE = 2 \cdot T \cdot \left( \frac{A \cdot r}{C \cdot \Theta \cdot 1000} \right) \quad (\text{m}^2 / \text{g}) \quad (7)$$

gdje je: T – mutnoća (izračunata iz gornjeg izraza)

$\Theta$  – volumni udio uljne faze (mL)

r – faktor razrijeđenja

C – masa proteina u jedinici volumena vodene faze prije pripreme emulzije (g)

(Weeb i sur., 2002)

**Stabilnost emulzije** određuje se tako da se pripremljena emulzija drži se kod 4°C (u hladnjaku) 24 h sata i tada se ponovno mjeri apsorbancija kod 500 nm, te računa mutnoća.

**Indeks stabilnosti emulzije** računa se na slijedeći način:

$$ISE = \left( \frac{T \cdot \Delta t}{\Delta T} \right) \quad (h) \quad (8)$$

gdje je: T – mutnoća određena na početku (0 h)

$\Delta T$  - promjena mutnoće za vrijeme od 24 h

$\Delta t$  – vremenski interval (24 h)

(Weeb i sur., 2002)

### 3.2.10. ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI

Određivanje pH vrijednosti prije i nakon tretmana vrši se očitavanjem na pH – metru (pH METER, Pye Model 292, Pye Unicam) tako da se kalomel elektroda uroni u uzorak i u njoj drži 5 minuta nakon čega se očita pH - vrijednost.

### 3.2.11. ODREĐIVANJE ELEKTROPROVODLJIVOSTI

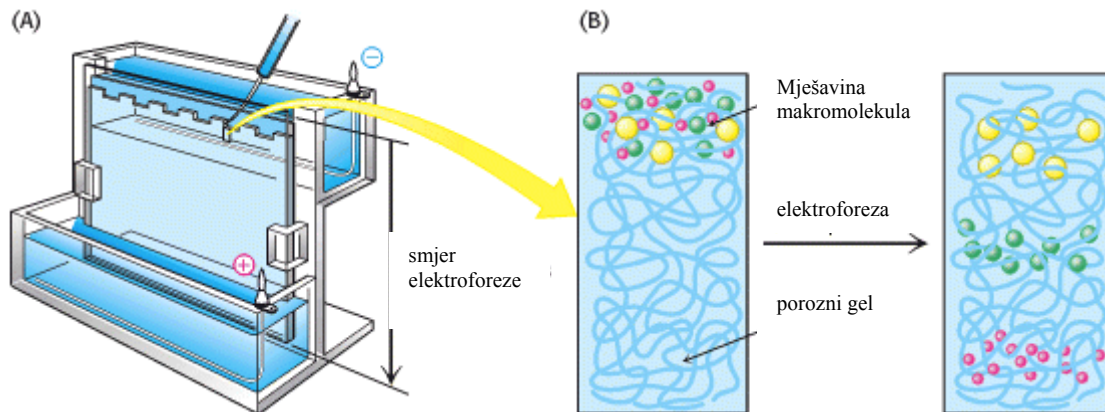
Određivanje elektroprovodljivosti prije i nakon tretmana vrši se očitavanjem na konduktometru (PTI-8 Digital Conductivity Meter, Scientific Industries International Inc., UK). Instrument je kalibriran prije mjerenja sa kemikalijama kojima je poznata elektroprovodljivost.

### 3.2.12. ODREĐIVANJE PROMJENA TEMPERATURE TIJEKOM TRETMANA

Promjene temperature suspenzija prije, za vrijeme i nakon tretmana ultrazvukom prate se očitavanjem vrijednosti na termočlanku (Thermocouple Hanna Instruments, model: HI 9063). Kod tretmana ultrazvučnom sondom od 30 kHz, promjene temperature prate se laserskim termometrom.

### 3.2.13. SDS-PAGE GEL ELEKTROFOREZA

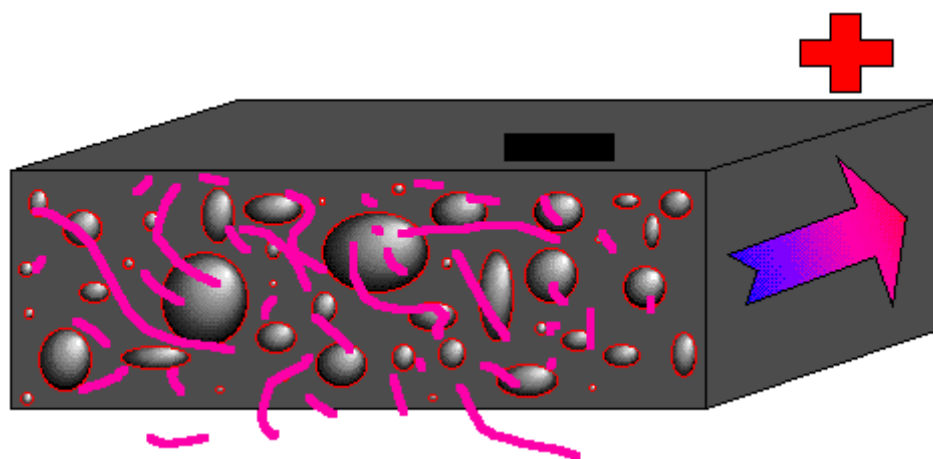
Elektroforeza proteina odvija se na tankoj, vertikalnoj ploči poliakrilamida. Tok struje je od vrha prema dnu gela. Poliakrilamid nastaje polimerizacijom akrilamida i umrežavanjem sa metilenbisakrilamidom. Poliakrilamid je dobar medij budući da je kemijski inertan i jednostavno nastaje (Slika 27).



**Slika 27. (A) Nanošenje uzoraka na gel. (B) Razdvajanje mješavine makromolekula (Berg i sur., 2001)**

Proteinske frakcije analizirane su putem SDS-PAGE (sodium dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza) Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresis System, (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), sustavom za elektroforezu sa modificiranom procedurom po Laemmli (1970). Proteinske modelne otopine (1  $\mu\text{L}$  / mL protein) volumena 10 mL dijalizirane su putem nekoliko promjena fosfatnog pufera 10 M (pH=7) i završne dijalize sa vodom. Nakon dijalize volumen otopina bio je < 10 mL, te je provedena elektroforeza (inače bi bilo potrebno liofilizirati uzorke i ponovno ih razrijediti). Tako pripremljeni uzorci pomješani su sa reducirajućim puferom (12,5 mL 1,5 M Tris pH=8, 10 mL glicerol, 0,5 g SDS, 0,25 mL 2-merkaptotanol, 0,5 % bromofenol plava otopina) u omjeru 1:1 u ependorfovoj epruveti, te su smještene u vrijuću vodenu kupelj kroz 3 minute kako bi se denaturirali. Nakon toga se vršila mikrocentrifuga kod visoke brzine kroz 2 min. 20  $\mu\text{L}$  uzorka (10  $\mu\text{L}$  + 10  $\mu\text{L}$  pufer) pripremljeno je za svaki tretman. Tako pripremljeni uzorci (20  $\mu\text{L}$ ) su zatim punjeni na Tris-akrilamidni gel (Biorad, Hercules CA; 12 % Tris-HCl, 10 jažica).

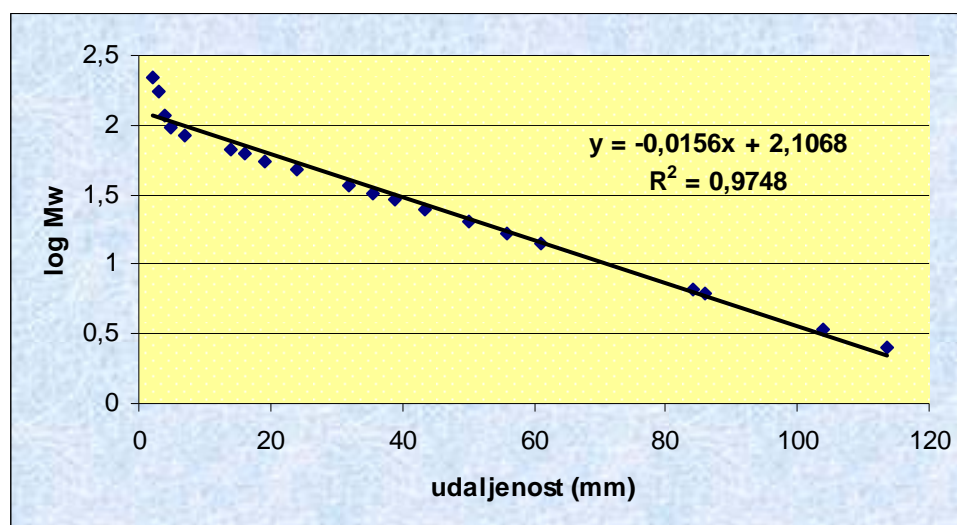
Standardi su ProteMix Protein Standard (Miozin 220 kDa,  $\beta$ -galaktozidaza 116 kDa, Glikogen-fosforilaza 97 kDa, Albumin 66 kDa, Glutamat Dehidrogenaza 55,6 kDa, Laktat Dehidrogenaza 36,5 kDa, Anhidraza 29 kDa, Tripsin inhibitor 20 kDa, Lizozim 14 kDa, Aprotinin 6,1 kDa, Inzulin a 3,4 kDa, Inzulin b 2,5 kDa), ANAMED (Anamed Elektrophorese GmbH, Darmstadt, Germany) i Prestained Protein Marker (MBP- $\beta$ -galaktozidaza 175 kDa, MBP-paramiozin 83 kDa, Glutaminska dehidrogenaza 62 kDa, Aldolaza 47,5 kDa, Triozafosfate izomeraza 32,5 kDa,  $\beta$ -laktoglobulin A 25 kDa, Lizozim 16,5 kDa, Aprotinin 6,5 kDa), Broad Range (BioLabs Inc., New England, UK). Po završetku elektroforeze nastale zone (bendove) u gelu općenito nije moguće vidjeti, nego ih je potrebno vizualizirati primjenom nekih od tehnika vizualizacije. Najčešće su to tehnike bojanja proteina različitim bojama. Svakako najraširenija tehnika bojanja proteinskih molekula, je tehnika bojanja Coomassie brilliant blue - Coomassie plavilom. Kod ove se metode gel uroni u kiselu, alkoholnu otopinu boje. Pri tome dolazi do fiksiranja proteina u gelu zbog njihove denaturacije i vezanja boje na proteinsku molekulu. Višak boje se potom ispere otopinom za odbojavanje. Ovom se metodom može detektirati količina proteina od  $1 \times 10^{-6}$  g. Bendovi na gelu koji sadrže manje količine proteina od navedene, potrebno je vizualizirati primjenom osjetljive tehnike bojanja – bojanjem srebrom, koja je oko 100 puta osjetljivija od Coomassie tehnike bojanja.



**Slika 28. Otopina denaturiranih proteina koji putuju kroz poliakrilamidni gel (Berg i sur., 2001)**

Gel elektroforeza provođena je kod 150 V,  $I > 20$  mA kroz 45 min u puferu (1,5 M, Tris-HCl, pH=8; Tris-Glycine SDS Buffer (0,025 M Tris; 0,192 M Glicine; 0,1 % SDS)). Nakon dodatka SDS-a proteini su denaturirani, te putuju kroz poliakrilamidni gel (slika 28). Gelovi su bojani sa Coomassie Blue R250 (0,15 g Coomassie brilliant blue, 60 mL metanol, 15 mL ledena octena kiselina, 75 mL destilirana voda) i odbojani sa (10 % metanol // 10 % octena kiselina). Gelovi su slikani sa ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), te analizirani sa software-om ImageJ 1,36 b, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA. Analizom sa software-om moguće je odrediti **molekularne mase** produkata.

Molekularne proteinske vrpce analizirane su prema intenzitetu piksela i njihovim udaljenostima. Na osnovu tih vrijednosti u odnosu na standarde izračunate su molekularne mase nepoznatih proteinskih vrpca na dobivenim gelovima, te udio pojedinih frakcija. Proteini pri denaturaciji vežu SDS u približno konstantnom masenom odnosu, te nastali SDS-proteinski kompleksi imaju ujednačenu gustoću naboja i migriraju na osnovu molekularnih masa u električnom polju. Utvrđeno je da je tada grafički odnos  $\log_{10}M_r$  i  $R_f$  vrijednosti (udaljenost koju prijeđe protein prema udaljenosti koju prijeđe boja) strogo linearan. Za kalibraciju gel sustava koriste se proteini poznatih molekularnih masa (standardi) koje se razdvoje, a zatim se obrađuje zajedno s uzorcima. Za izradu kalibracijskog pravca izračunaju se  $R_f$  vrijednosti markera i na semilogaritamskoj skali ucrtaju u odnosu na molekularne mase (Slika 29). Nakon toga se  $R_f$  vrijednosti proteina u uzorcima koriste kako bi se iz pravca očitala njihova molekularna masa. Navedeno je određeno putem software-a ImageJ, te korištenja seta macro naredbi koji izračunavaju navedeno iz poznatih vrijednosti.

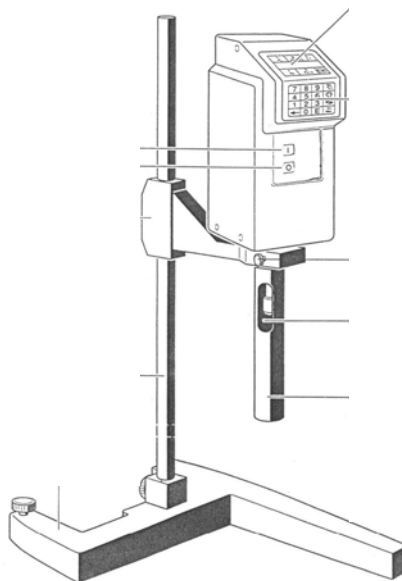


Slika 29. Standardni oblik baždarnog pravca za određivanje molekularnih masa

### 3.2.14. ODREĐIVANJE REOLOŠKIH SVOJSTAVA

Mjerenja se vrše na rotacionom reometru Rheometric Scientific RM-180 (Rheometric Scientific, Inc., Piscataway, USA) digitalnom instrumentu koji se odlikuje znanstveno utemeljenim principom mjerenja i širokim mjernim područjem napona smicanja, brzine smicanja i viskoznosti (slika 30).

Ovaj reometar sastoji se od dvije funkcionalne jedinice: mjernog sustava i mikrokontrolne jedinice.



Slika 30. Reometar Rheometric Scientific RM-180

I) Dijelovi mjerne jedinice:

- **cilindrično vreteno** - rotira konstantnom kutnom brzinom, a povezano je s cilindričnim perom pomoću vratila
- **vanjski nepomičan cilindar** (vodeni plašt) koji je spojen s protočnom termostatskom kupelji, a izveden je kao spremnik dvostrukih stijenki u koji se stavlja mjerna posuda sa uzorkom
- **mjerna posuda** u koju se stavlja uzorak određenog volumena



II) **Mikrokontrolna jedinica** - omogućava trenutno očitavanje dinamičke viskoznosti, torzije, brzine smicanja i napona smicanja.

Za mjerenje okretnog momenta koji se javlja na rotirajućem vretenu koristi se relativno okretanje mjerne osovine u odnosu na pogonsku osovinu. Potenciometar uređaja, koji je vezan sa dinamometrom, prima podatke o relativnom okretanju, pri čemu se okretni moment pretvara u električni signal, koji se prevodi u digitalnu vrijednost i očitava na displeju instrumenta.

Nakon što je mjerni sustav pravilno sastavljen i pričvršćen na reometar, a vodeni plašt (vanjski nepomičan cilindar) spojen s protočnom termostatskom kupelji, potrebno je mjernu posudu s uzorkom učvrstiti u vodeni plašt i uroniti vretenu u otopinu do oznake na posudi te vretenu spojiti preko produžne spojke i matice i učvrstiti na reometar. Početna kutna brzina vrtnje vretena bila je  $10 \text{ s}^{-1}$ , te se postepeno povećavala do maksimalne brzine od  $1290 \text{ s}^{-1}$ , a potom smanjivala do  $10 \text{ s}^{-1}$ . Vrijednosti napona smicanja i prividne viskoznosti očitani su na displeju instrumenta.

Na osnovi izmjerenih podataka (brzina i napon smicanja) izračunati su reološki parametri (koeficijent konzistencije i indeks tečenja) primjenom metode linearne regresije. Koeficijent konzistencije  $k$  ( $\text{Pa s}^n$ ) jednak je antilogaritamskoj vrijednosti konstante linearne regresije vrijednosti smičnog naprezanja i brzine smicanja, a indeks tečenja ( $n$ ) odgovara koeficijentu linearne regresije.

**Prividna viskoznost** (mPa s) pri  $1290 \text{ s}^{-1}$  izračunat je primjenom Newtonovog zakona:

$$\tau = \mu \cdot \gamma \quad (9)$$

gdje je:  $\tau$  - napon smicanja (Pa)

$\mu$  - viskoznost (Pa s)

$\gamma$  - brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ )

Za izračunavanje reoloških parametara upotrijebljen je **Ostwald-Reinerov zakon**:

$$\tau = k \cdot \gamma^n \quad (10)$$

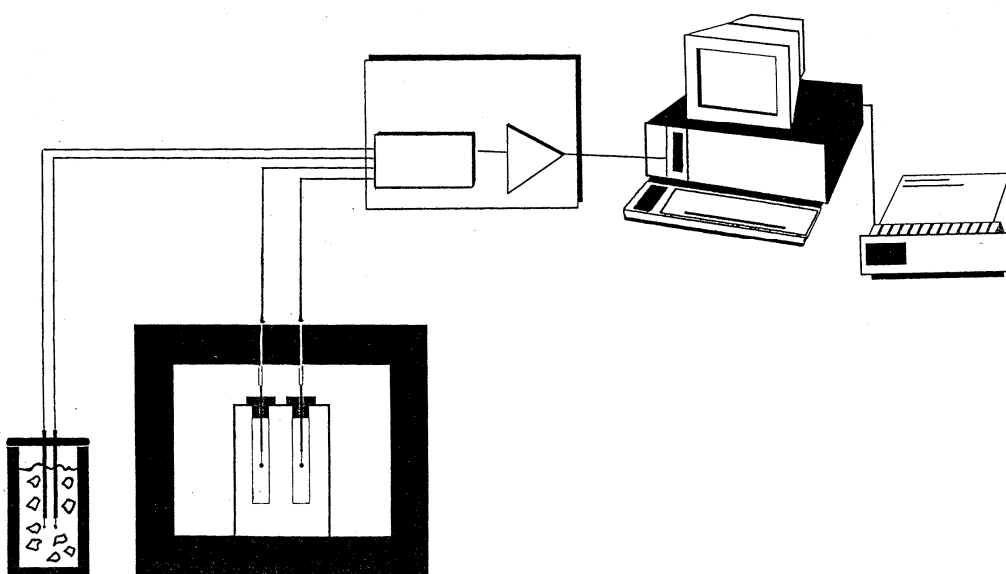
gdje je:  $\tau$  - napon smicanja (Pa)

$k$  - koeficijent konzistencije ( $\text{Pa s}^n$ )

$\gamma$  - brzina smicanja ( $\text{s}^{-1}$ )

### 3.2.15. ODREĐIVANJE TEMPERATURA FAZNIH PROMJENA POMOĆU DIFERENCIJALNE TERMIČKE ANALIZE (DTA)

Aparatura za DTA se sastoji od metalnog valjka, mjernog pretvarača otpora (za područje  $-100$  do  $+100$  °C, raspona od 0 do 5 V; proizvođač Elektron, Stubičke toplice), analogno – digitalnog pretvornika, računala, pisača i termos boce (Slika 31). Za praćenje procesa koristi se software Siemens (STEP 7 / WIN 32), Siemens, Energy and Automatisation, Inc.



Slika 31. Shematski prikaz mjernog sustava za DTA (Kovačević, 1997)

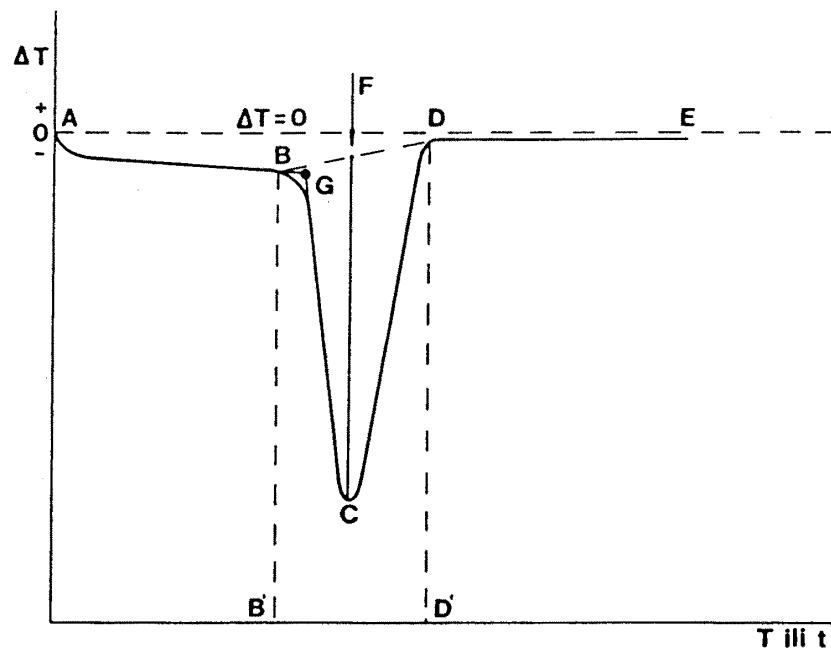
Metalni valjak ima dva udubljenja. U jedno se stavlja uzorak, a u drugo referentni materijal (bezvodni kvarcni pijesak). Kroz poklopac prolaze sonde s platinskim otpornicima (Pt – 100) za mjerenje temperature. Metalni valjak ima promjer 60 mm i visinu 105 mm, a promjer udubljenja iznosi 15 mm i visine je 70 mm. S unutarnje strane boce se nalazi izolacija od stiropora koja stvara prostor u koji se stavlja koncentrirani etanol, koji omogućuje bolju izmjenu topline. Uzorak, ohlađen na sobnu temperaturu, stavlja se u udubljenje na valjku i poklopi metalnim poklopcem. Pijesak mora ostati potpuno suh. Zatim se valjak stavlja u sredinu termos boce gdje se nalazi etanol. Kao sredstvo za hlađenje koristi se tekući dušik (temperatura vrenja  $-196$  °C ) koji se polagano ulije u etanol neposredno prije stavljanja valjka.

Nakon toga se termos boca zatvori. Tijekom smrzavanja računalo kontinuirano očitava temperaturu (brzinom od 5 mjerenja u sekundi) u uzorku i referentnom materijalu, a pisač ispisuje podatke. Kad je temperatura u uzorku pala do  $-35$ , pristupa se odmrzavanju uzorka te se metalni valjak izvadi iz termos boce i ostavi na sobnoj temperaturi pri čemu se postepeno zagrijava okolnim zrakom. Temperatura i razlika temperature se i dalje nastavljaju očitavati.

Kao rezultat mjerenja dobivene su DTA krivulje hlađenja (smrzavanja) i grijanja (taljenja) iz kojih su određene temperature faznih promjena, tj. smrzavanja i odmrzavanja.

Početne temperature smrzavanja odnosno odmrzavanja predstavljaju prvo primjetno odvajanje krivulje od bazne krivulje, a završetak procesa predstavlja vrh pika.

Na slici 32 prikazana je DTA krivulja s označenim važnim dijelovima. Na ordinati se nalazi  $dT$  vrijednost, a na apcisi temperatura ( $T$ ).



Slika 32. Prikaz DTA krivulje

Pojedini dijelovi DTA krivulje imaju svoje nazive kao što su:

- BAZNA LINIJA – dio DTA krivulje označen s AB i DE gdje se ne odvija transformacija
- NULTA LINIJA – zamišljena horizontalna linija gdje je  $DT = 0$ , a po kojoj bi morao ići tok DTA krivulje prije i poslije transformacije
- PIK – dio krivulje (označene BCD) koji odstupa od pravca bazne linije
- ŠIRINA PIKA – odgovara B' D'
- POVRŠINA PIKA – površina ograničena pikom na DTA krivulji i interpolirana baznom linijom
- EKSTRAPOLIRANA TOČKA POČETKA PROCESA (G) – presjek pravaca povučenih kroz početni dio pika (BC) i ekstrapoliranog toka DTA krivulje prije početka pika

### **3.2.16. STATISTIČKA ANALIZA**

Analiza utjecaja ultrazvuka na testirane parametre provedena je statističkom analizom rezultata mjerenja primjenom programa SPSS - Windows verzija 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Analiza varijance je primjenjena (One-Way ANOVA) sa signifikantnim nivo-om od 5% ( $\alpha = 0,05$ ), kako bi se vidjelo da li su različiti tretmani doveli do statistički različitih rezultata za ispitivane veličine.

## **4. REZULTATI**

U tretmanu ultrazvukom od 20 kHz, ultrazvučni intenzitet bio je 43–48 W/cm<sup>2</sup>.

U tretmanu ultrazvukom od 30 kHz, ultrazvučni intenzitet bio je 73–78 W/cm<sup>2</sup>.

U tretmanu ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, ultrazvučni intenzitet bio je 5 W/cm<sup>2</sup>.

U tretmanu ultrazvučnom kupelji od 500 kHz, ultrazvučni intenzitet bio je maksimalno 2 W/cm<sup>2</sup>

**Tablica 11. Raspodjela veličine čestica i specifična slobodna površina modelnih suspenzija izolata proteina sirutke prije i nakon različitih ultrazvučnih tretmana**

IP	Specifična slobodna površina (m <sup>2</sup> /g)	Veličina čestica (μm)		
		10 % manje od *	50 % manje od **	90 % manje od ***
netretirani	0,037	126,75	192,74	508,20
20UZ15	0,126	22,03	148,48	264,18
20UZ30	0,195	90,29	165,01	285,56
40UZ15	0,041	116,60	226,58	334,59
40UZ30	0,027	1030,31	148,14	313,22
500UZ15	0,037	86,51	178,71	502,88
500UZ30	0,033	134,26	186,50	495,84

\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 10 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 50 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 90 % čestica ima manji promjer od navedenog



**Tablica 12. Raspodjela veličine čestica i specifična slobodna površina modelnih suspenzija koncentrata proteina sirutke prije i nakon različitih ultrazvučnih tretmana**

WPC	Specifična slobodna površina (m <sup>2</sup> /g)	Veličina čestica (μm)		
		10 % manje od *	50 % manje od **	90 % manje od ***
netretirani	2,24	0,74	103,68	324,08
20UZ15	13,5	0,20	0,44	6,98
20UZ30	20,1	0,17	0,31	1,04
40UZ15	14,7	0,19	0,55	4,76
40UZ30	15,3	0,18	0,48	1,68
500UZ15	5,42	0,48	1,48	63,09
500UZ30	5,76	0,46	1,40	13,12

\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 10 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 50 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 90 % čestica ima manji promjer od navedenog

**Tablica 13. Raspodjela veličine čestica i specifična slobodna površina modelnih suspenzija  $\alpha$ -laktalbumina prije i nakon različitih ultrazvučnih tretmana**

$\alpha$ -LA	Specifična slobodna površina (m <sup>2</sup> /g)	Veličina čestica ( $\mu$ m)		
		10 % manje od *	50 % manje od **	90 % manje od ***
netretirani	0,094	89,77	116,58	160,10
20UZ15	0,165	27,93	98,62	104,13
20UZ30	0,157	43,96	115,01	125,53
40UZ15	0,098	78,60	126,58	146,87
40UZ30	0,101	64,31	118,14	130,82
500UZ15	0,095	86,56	106,24	163,24
500UZ30	0,097	94,64	105,60	168,62

\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 10 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 50 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 90 % čestica ima manji promjer od navedenog

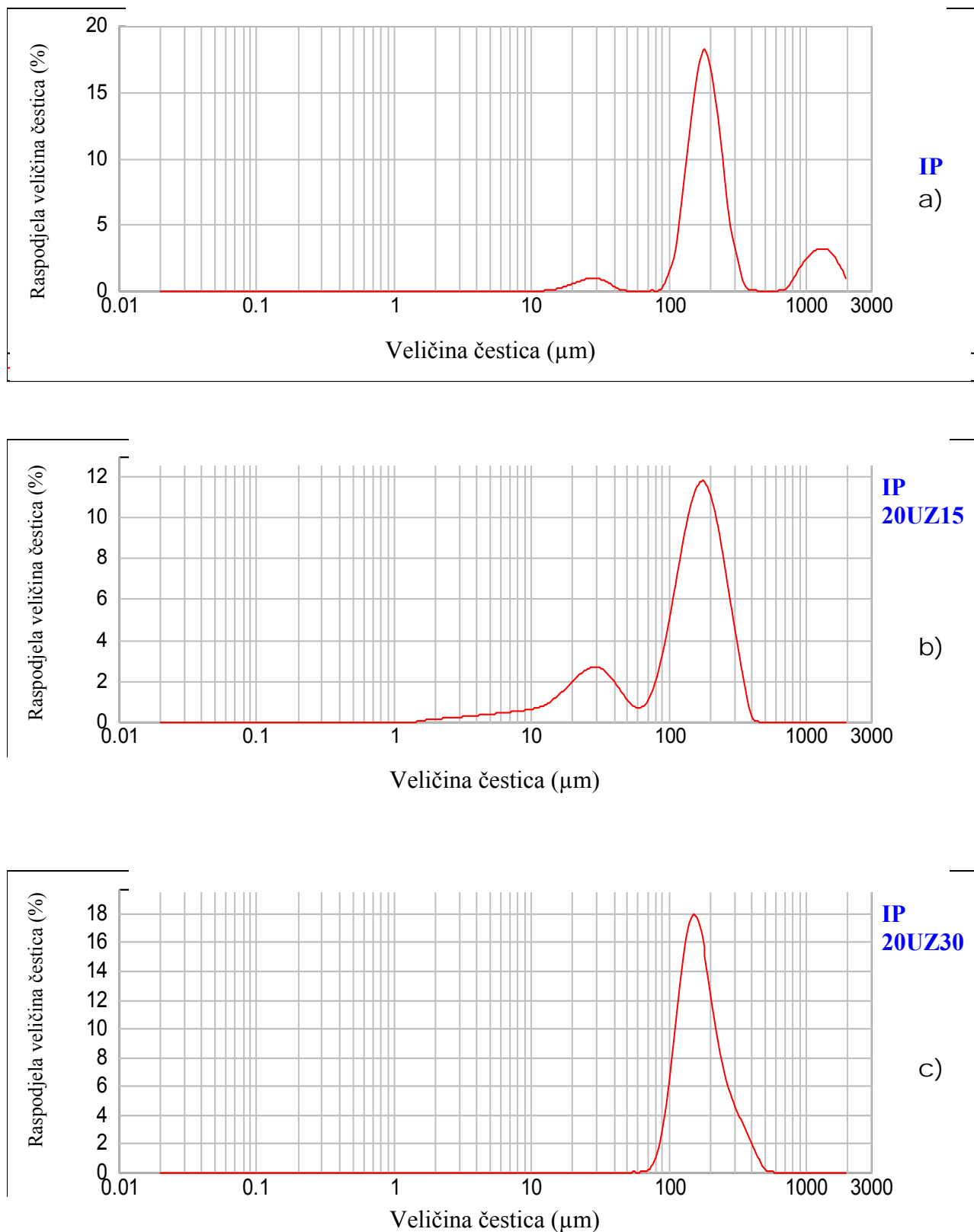
**Tablica 14. Raspodjela veličine čestica i specifična slobodna površina modelnih suspenzija hidrolizata proteina sirutke prije i nakon različitih ultrazvučnih tretmana**

HP	Specifična slobodna površina (m <sup>2</sup> /g)	Veličina čestica (μm)		
		10 % ispod *	50 % ispod **	90 % ispod ***
netretirani	0,096	44,58	73,08	107,89
20UZ15	0,097	34,86	69,08	97,56
20UZ30	0,115	41,51	71,08	101,65
40UZ15	0,093	41,23	72,08	106,23
40UZ30	0,102	40,12	74,12	104,22
500UZ15	0,096	44,69	73,60	109,72
500UZ30	0,096	44,45	72,30	108,12

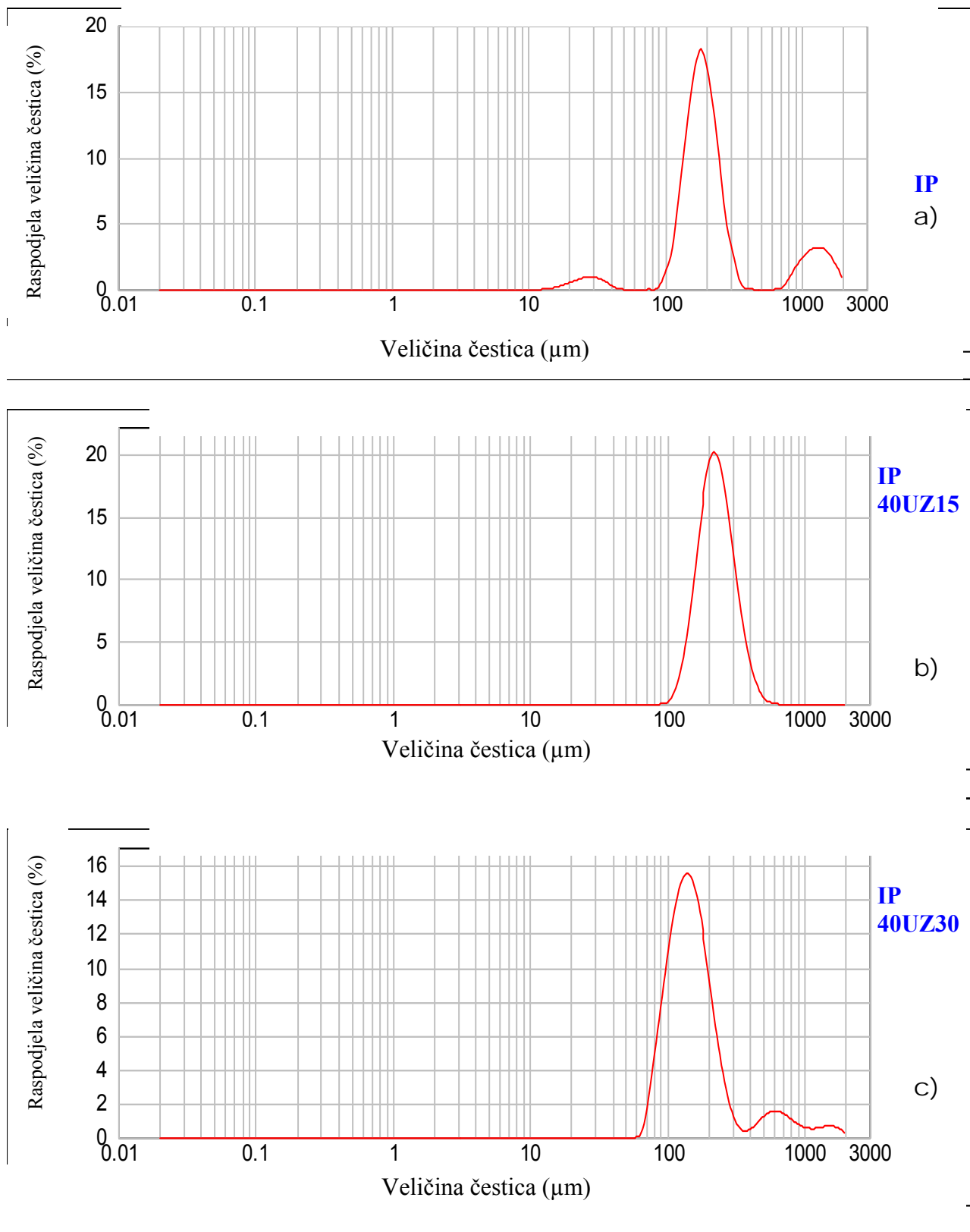
\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 10 % čestica ima manji promjer od navedenog

\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 50 % čestica ima manji promjer od navedenog

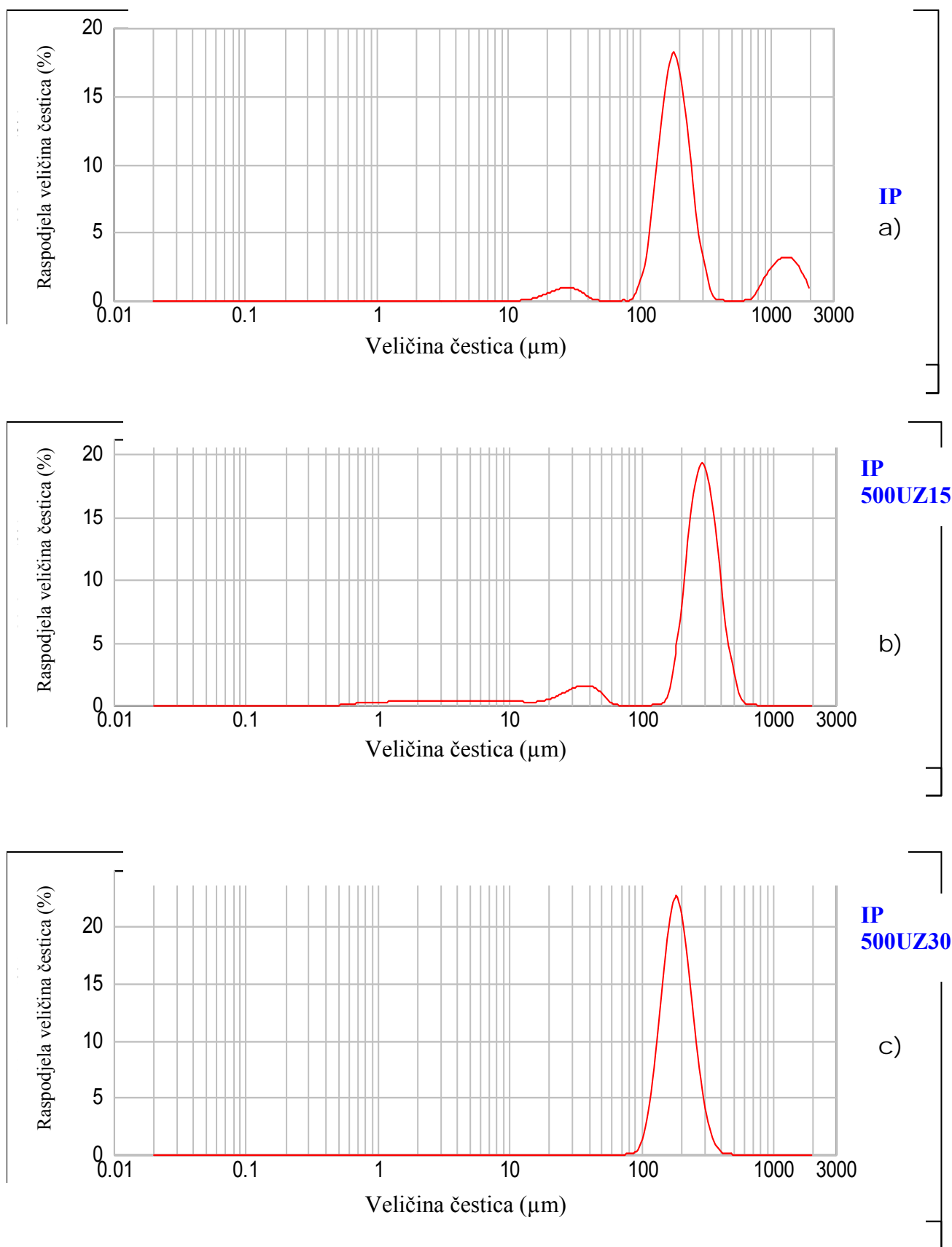
\*\*\* upotrebom MIE-ove teorije utvrđeno je da 90 % čestica ima manji promjer od navedenog



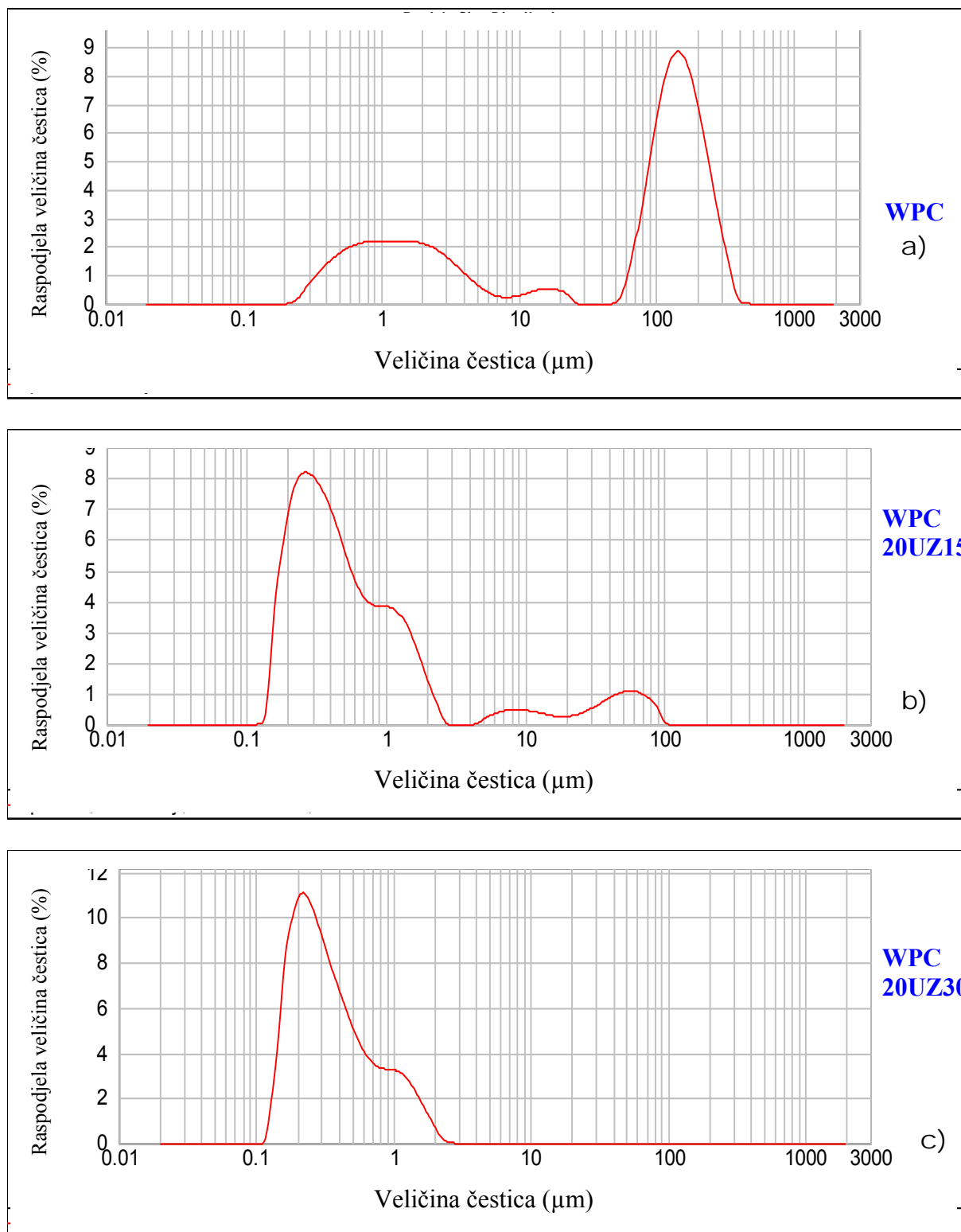
Slika 33. Raspodjela veličine čestica izolata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvukom od 20 kHz (b i c)



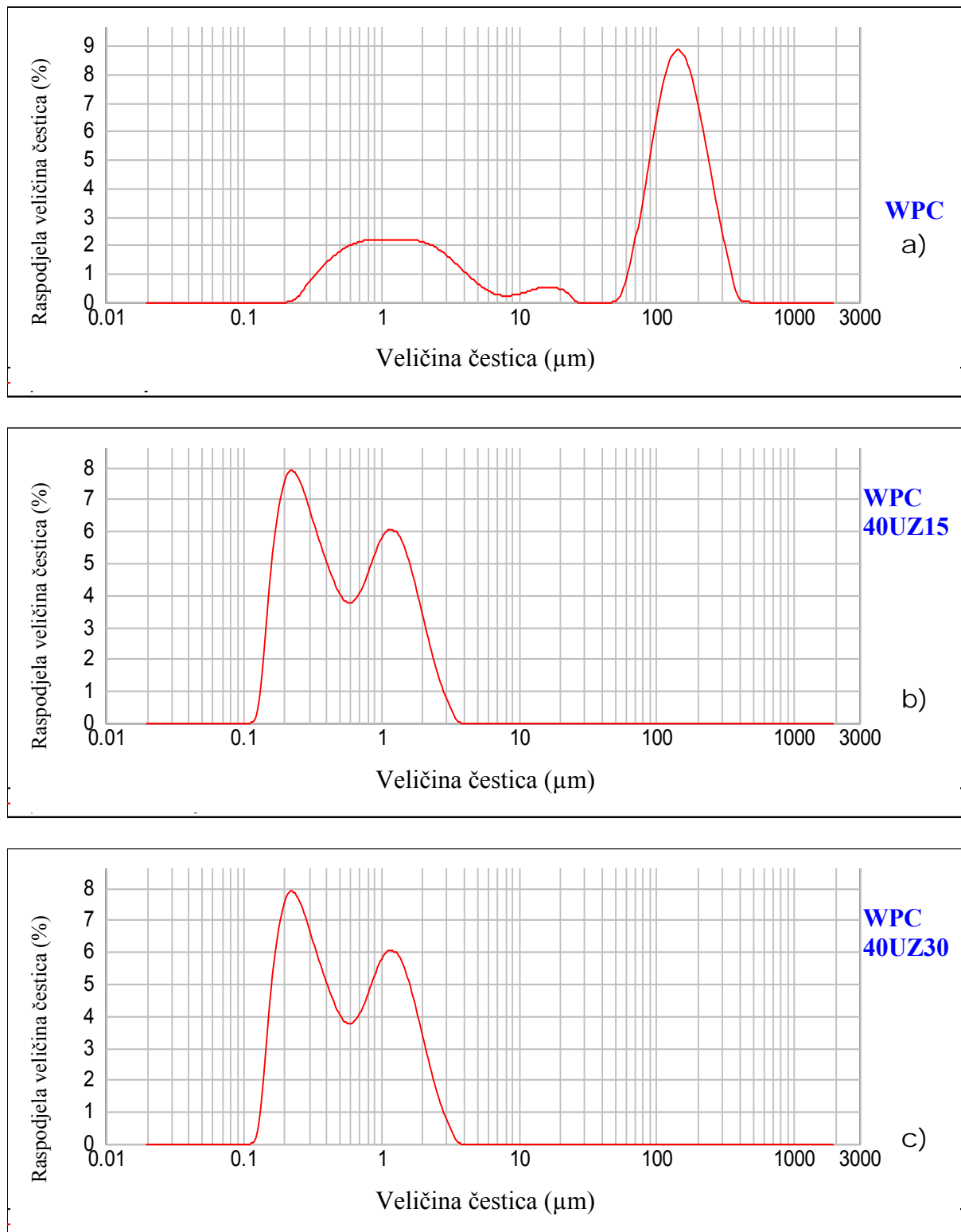
Slika 34. Raspodjela veličine čestica izolata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (b i c)



Slika 35. Raspodjela veličine čestica izolata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvukom od 500 kHz (b i c)

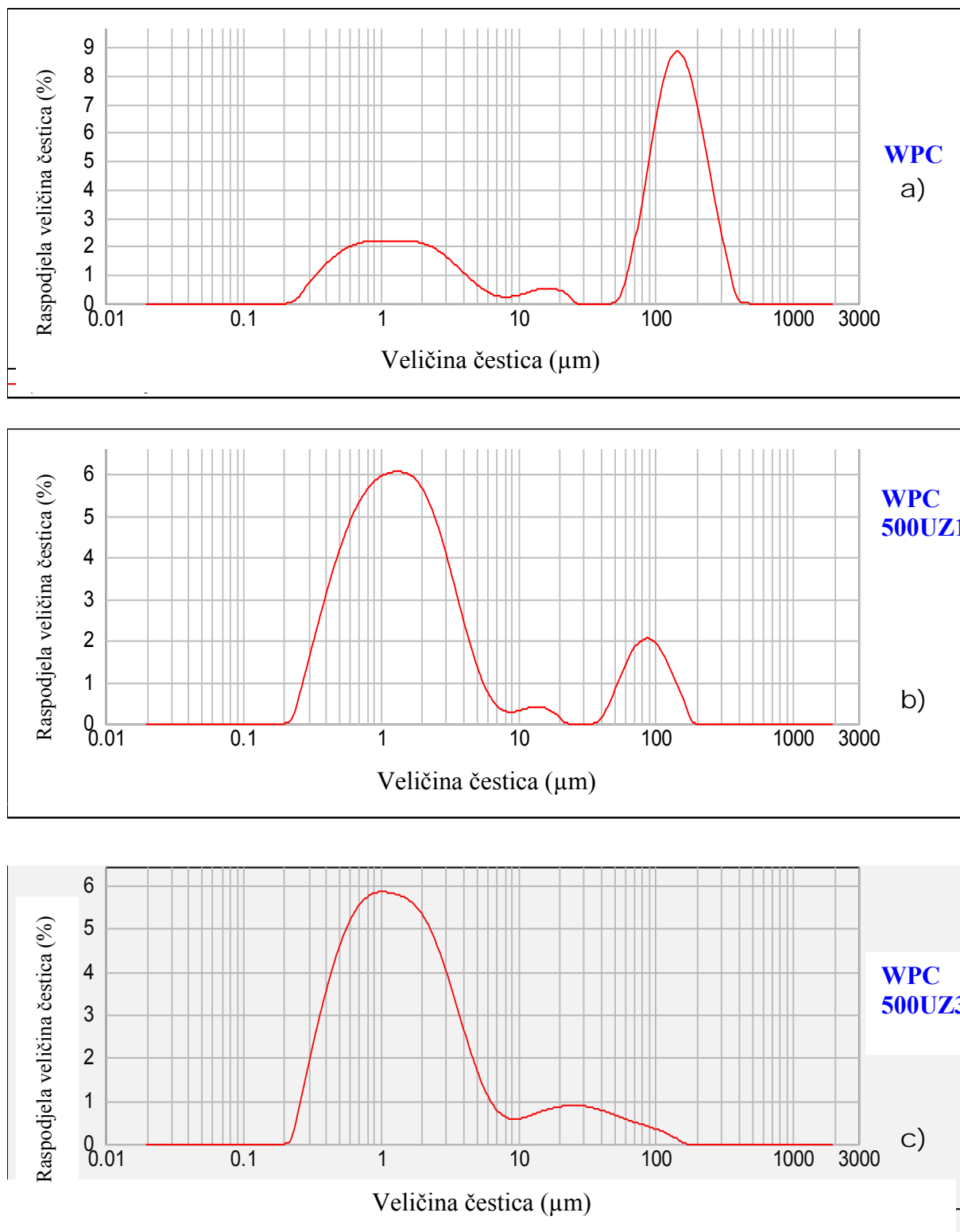


Slika 36. Raspodjela veličine čestica koncentrata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvukom od 20 kHz (b i c)

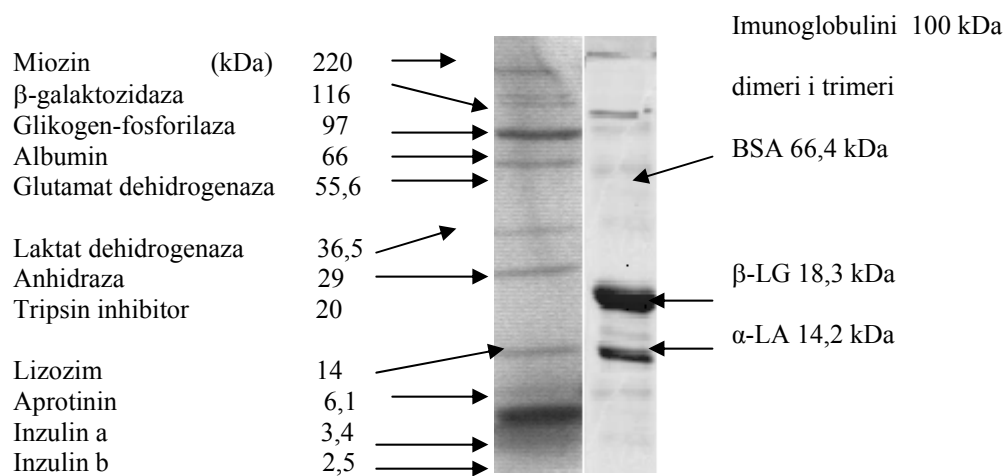


Slika 37. Raspodjela veličine čestica koncentrata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (b i c)

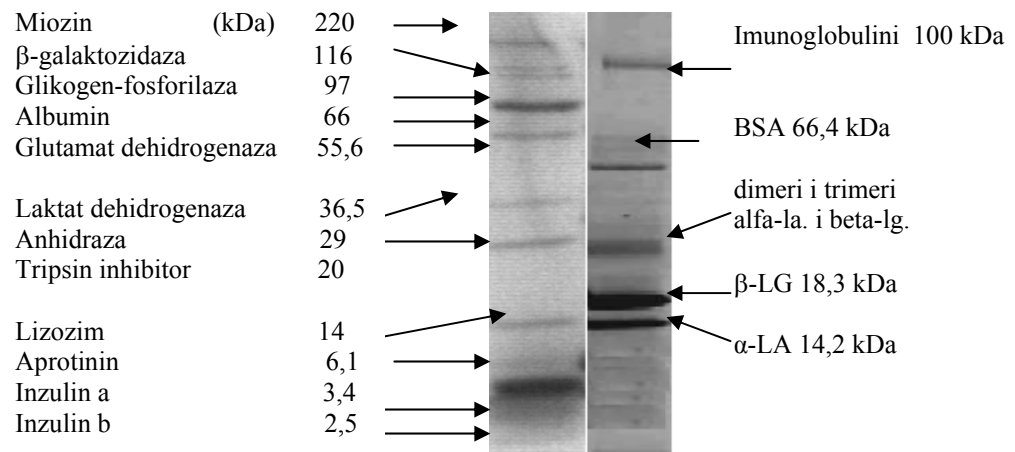




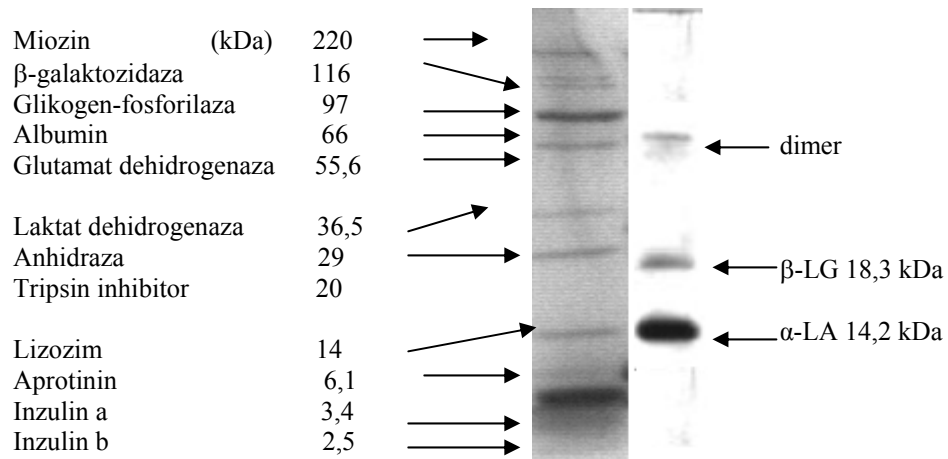
Slika 38. Raspodjela veličine čestica koncentrata proteina sirutke netretiranih (a) i tretiranih ultrazvukom od 500 kHz (b i c)



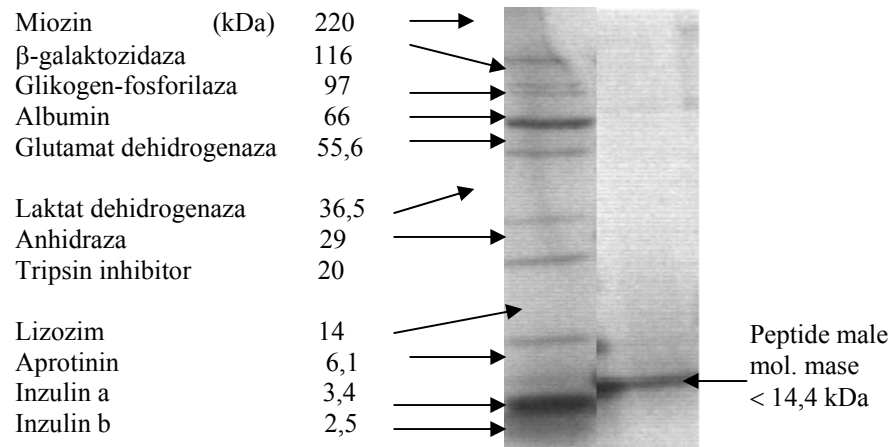
Slika 39. SDS-PAGE gel netretiranih izolata proteina sirutke



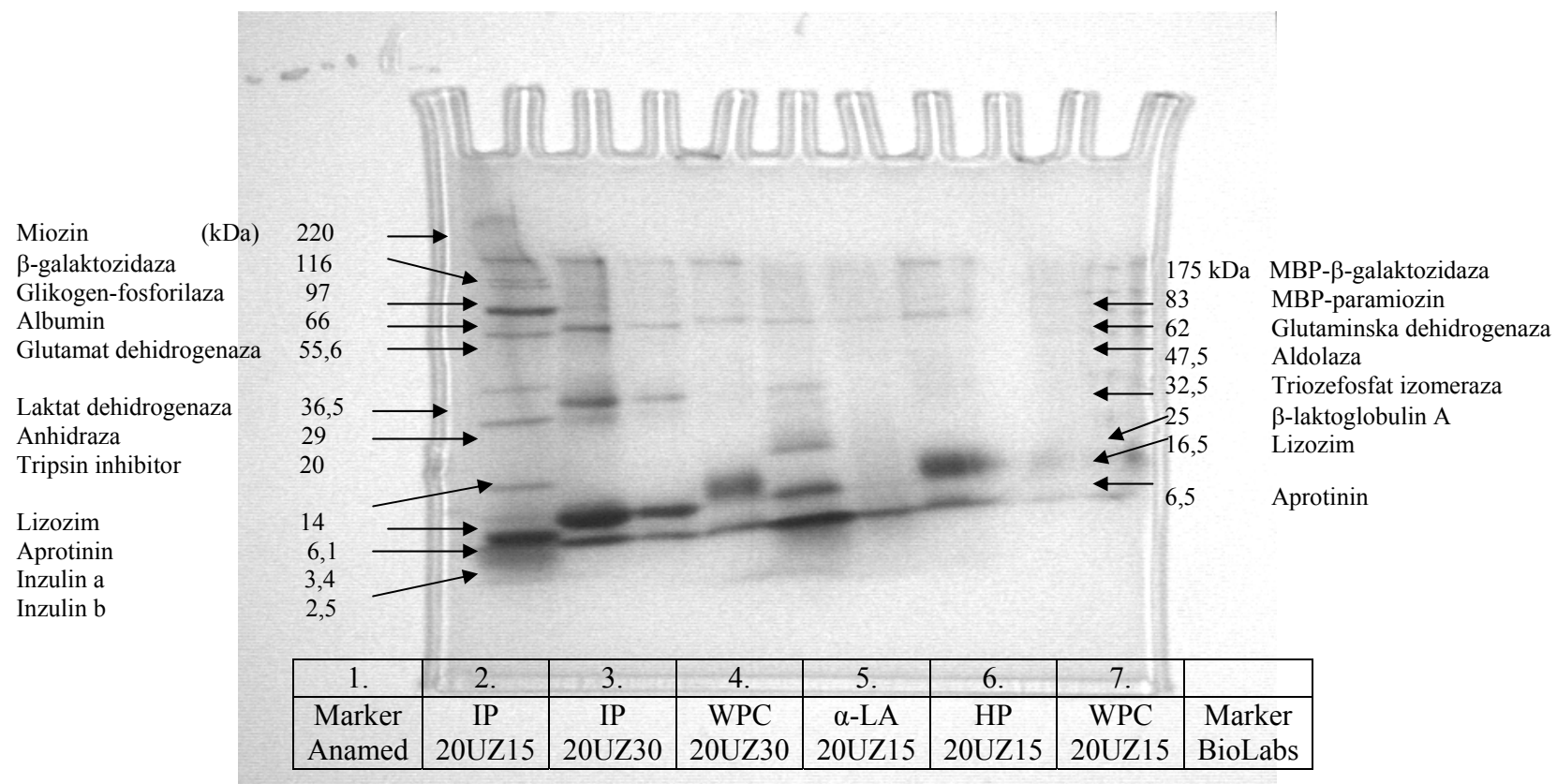
**Slika 40. SDS-PAGE gel netretiranih koncentrata proteina sirutke**



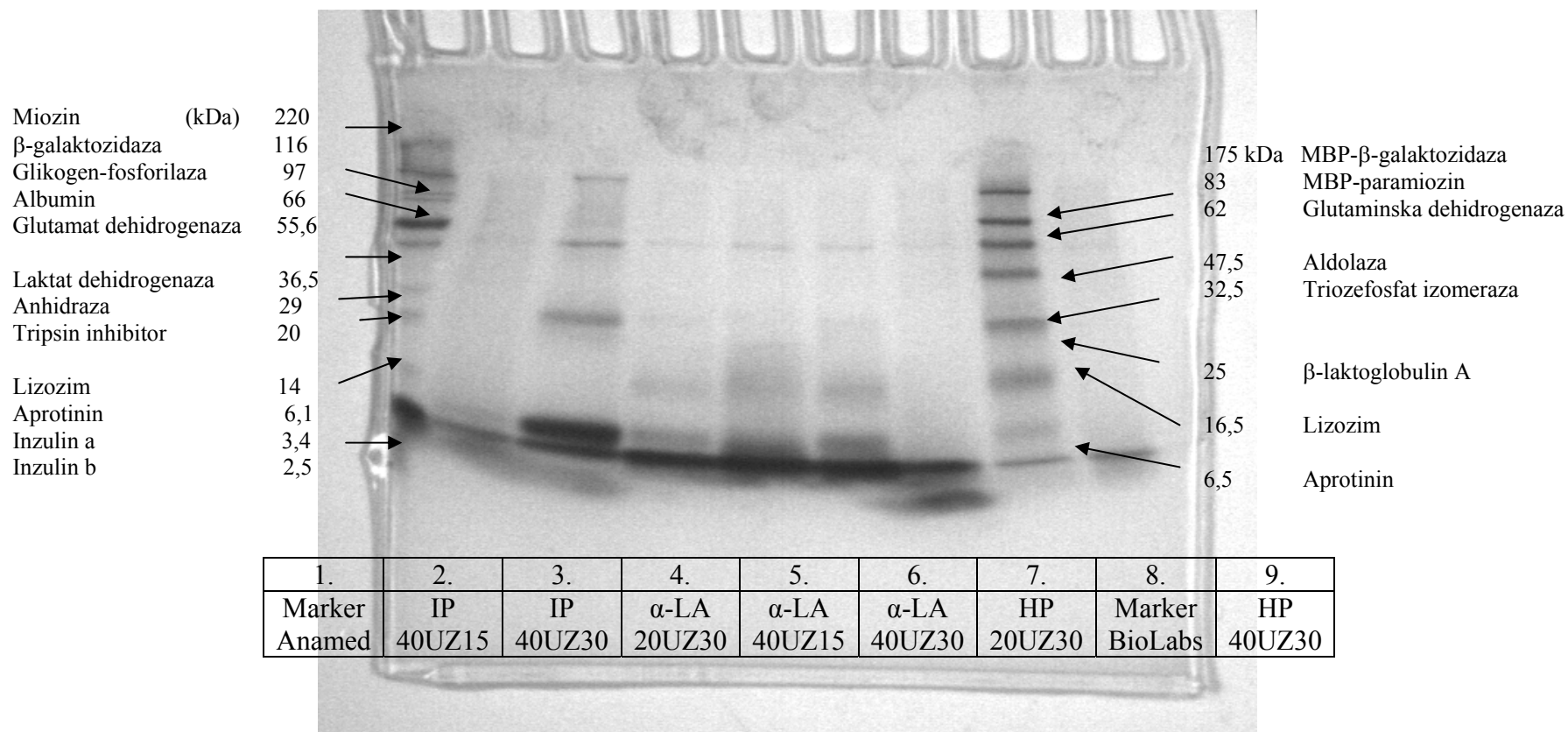
Slika 41. SDS-PAGE gel netretiranog α-laktalbumina



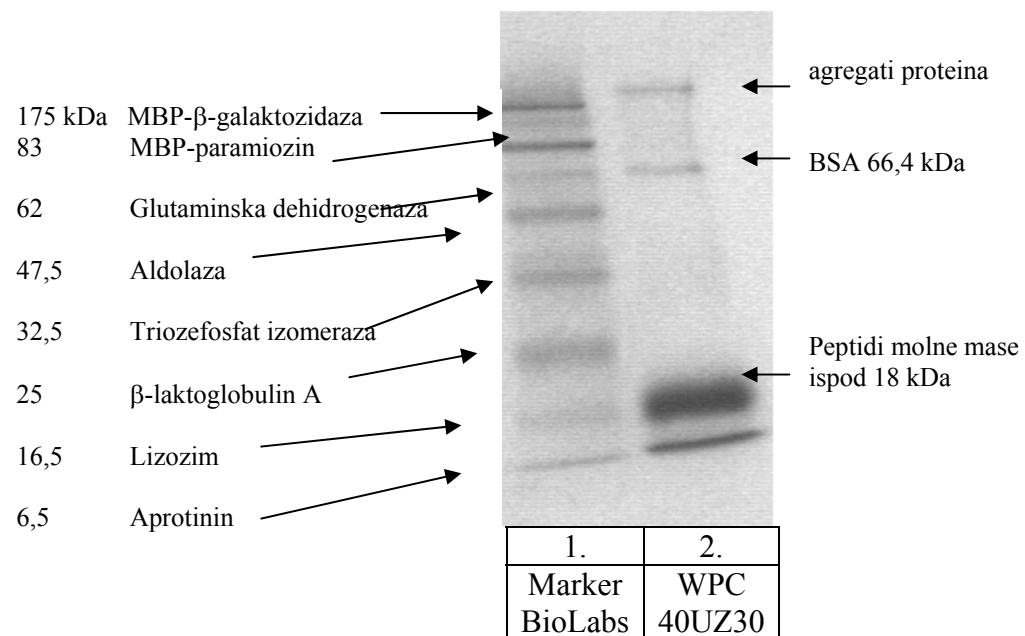
Slika 42. SDS-PAGE gel netretiranih hidrolizata proteina sirutke



Slika 43. SDS-PAGE gel tretiranih izolata, koncentrata, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina ultrazvukom od 20 kHz i standarda ANAMED i BioLabs

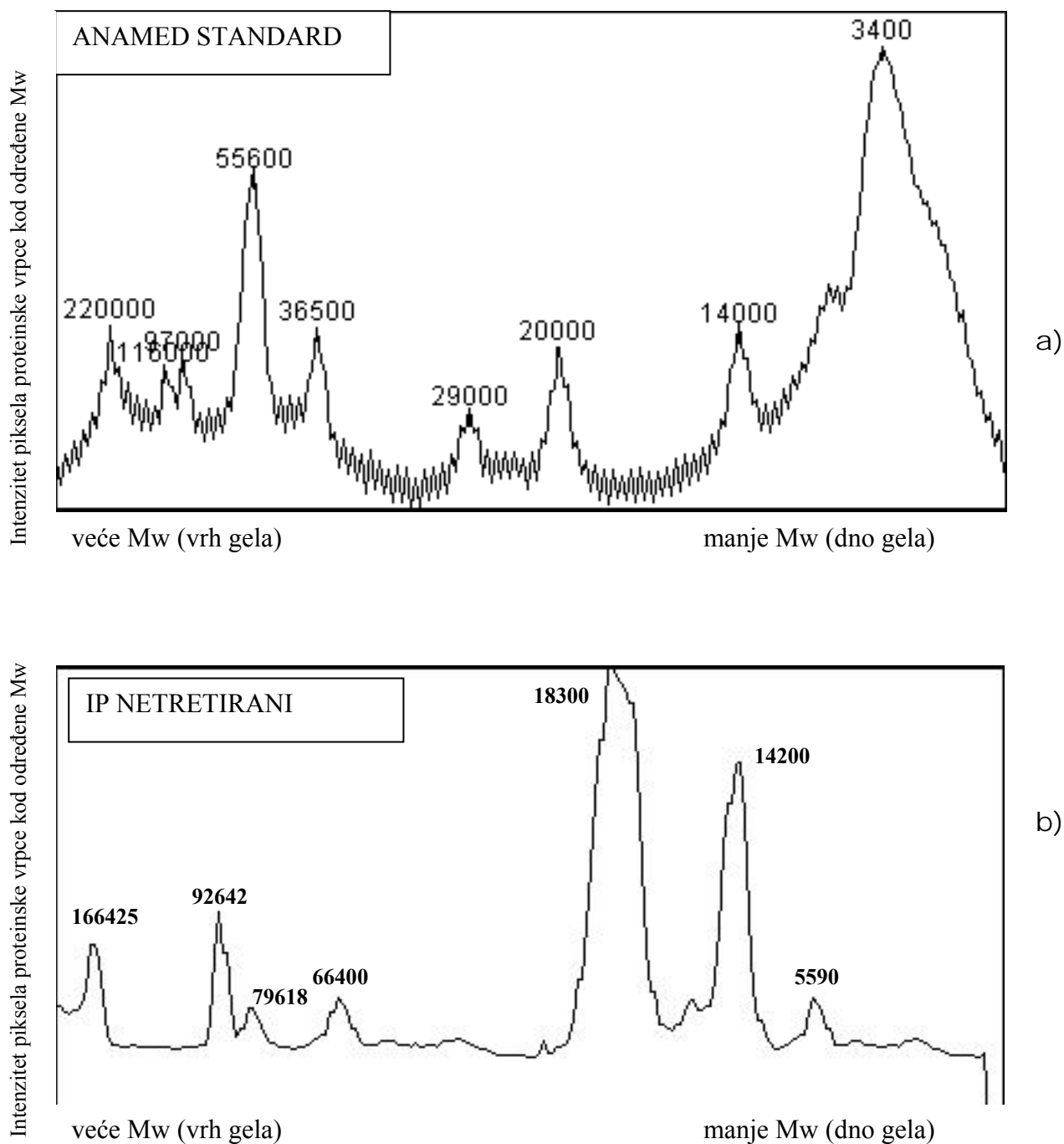


**Slika 44. SDS-PAGE gel tretiranih izolata, hidrolizata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina ultrazvukom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, i standarda ANAMED i BioLabs**

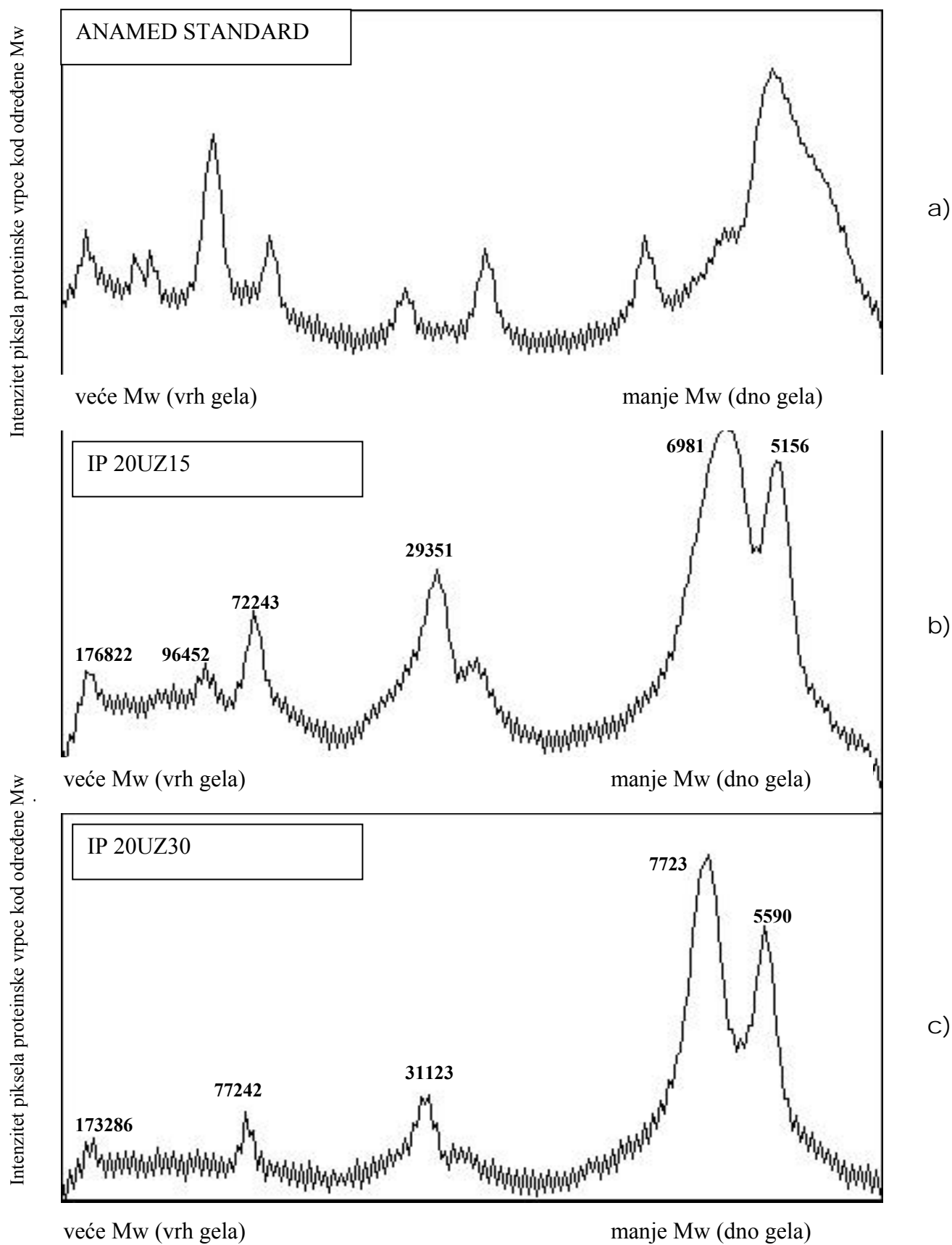


Slika 45. SDS-PAGE gel tretiranih koncentrata proteina sirutke tretiranih ultrazvučnom kupelji od 40 kHz

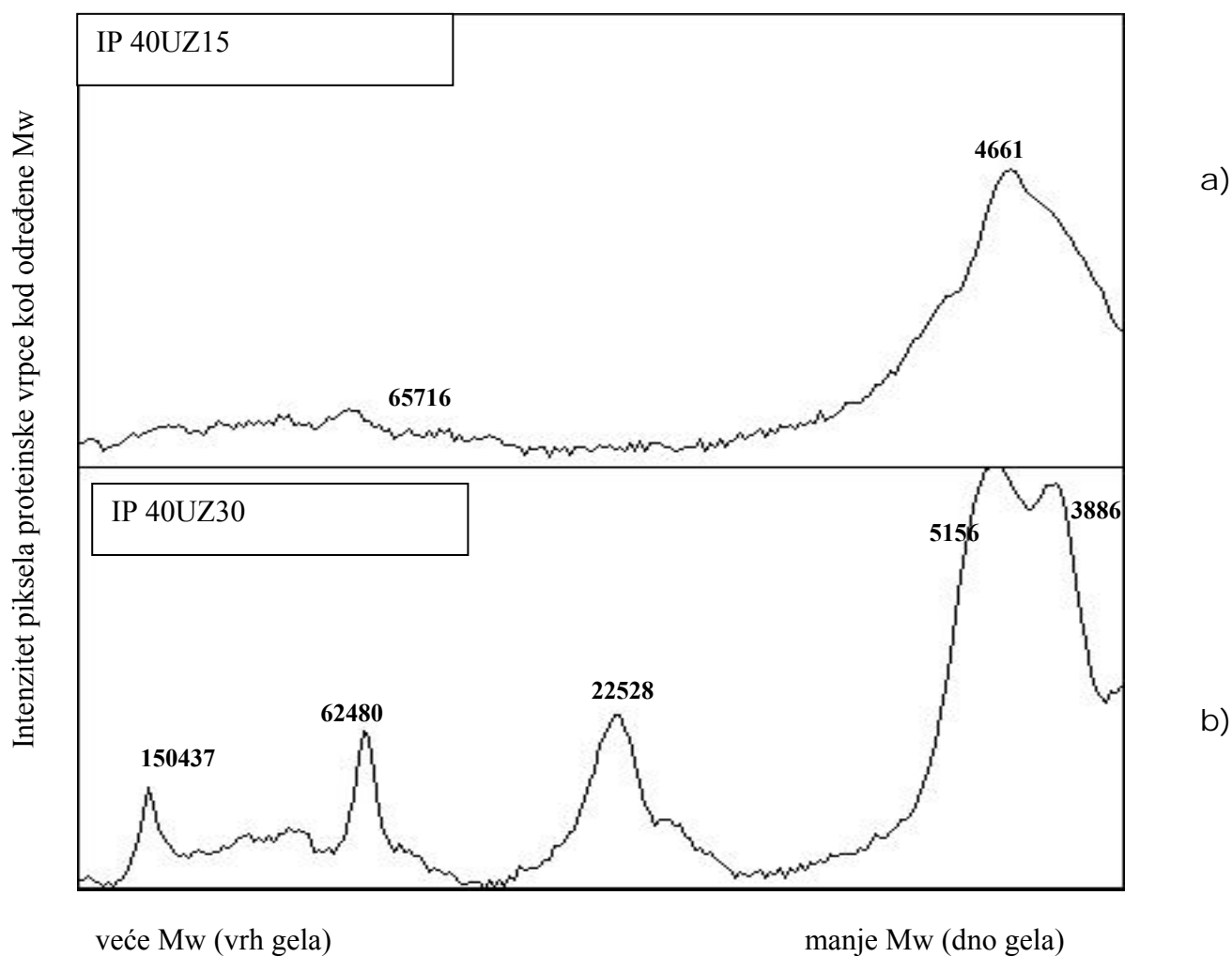




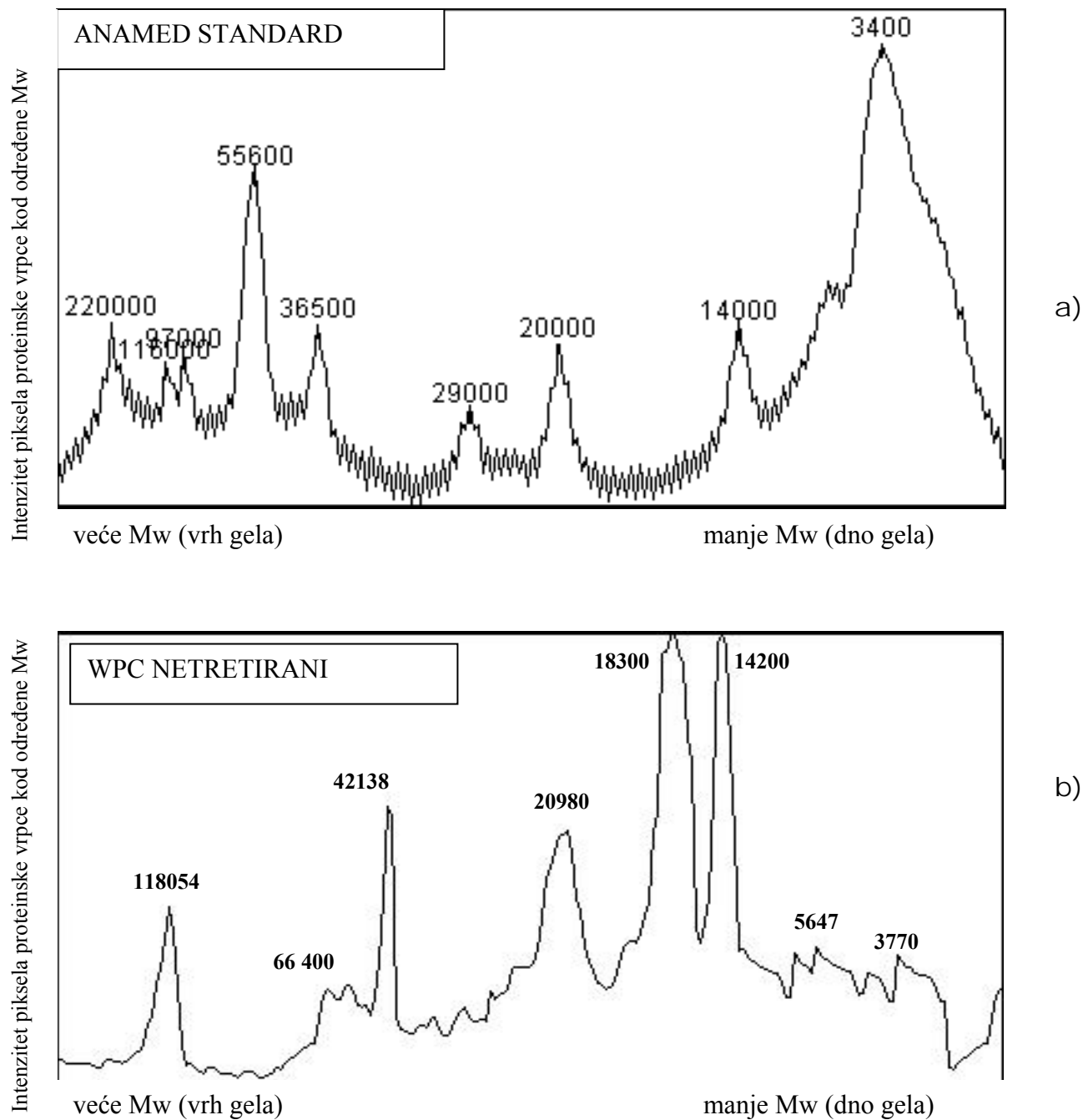
Slika 46. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) netretiranih (b) izolata proteina sirutke i standarda ANAMED (a)



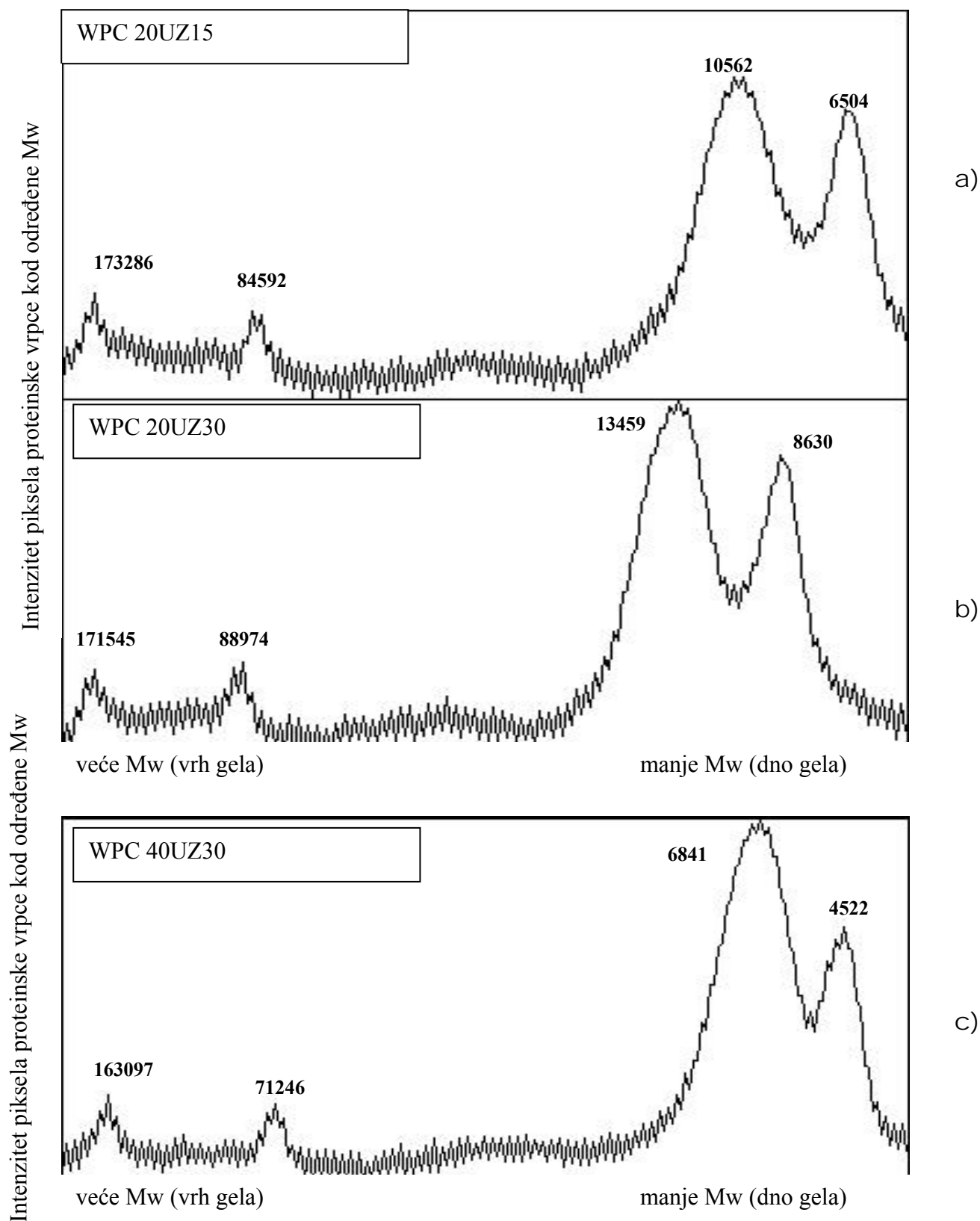
**Slika 47. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranih izolata proteina sirutke ultrazvukom od 20 kHz (b i c) i standarda ANAMED (a)**



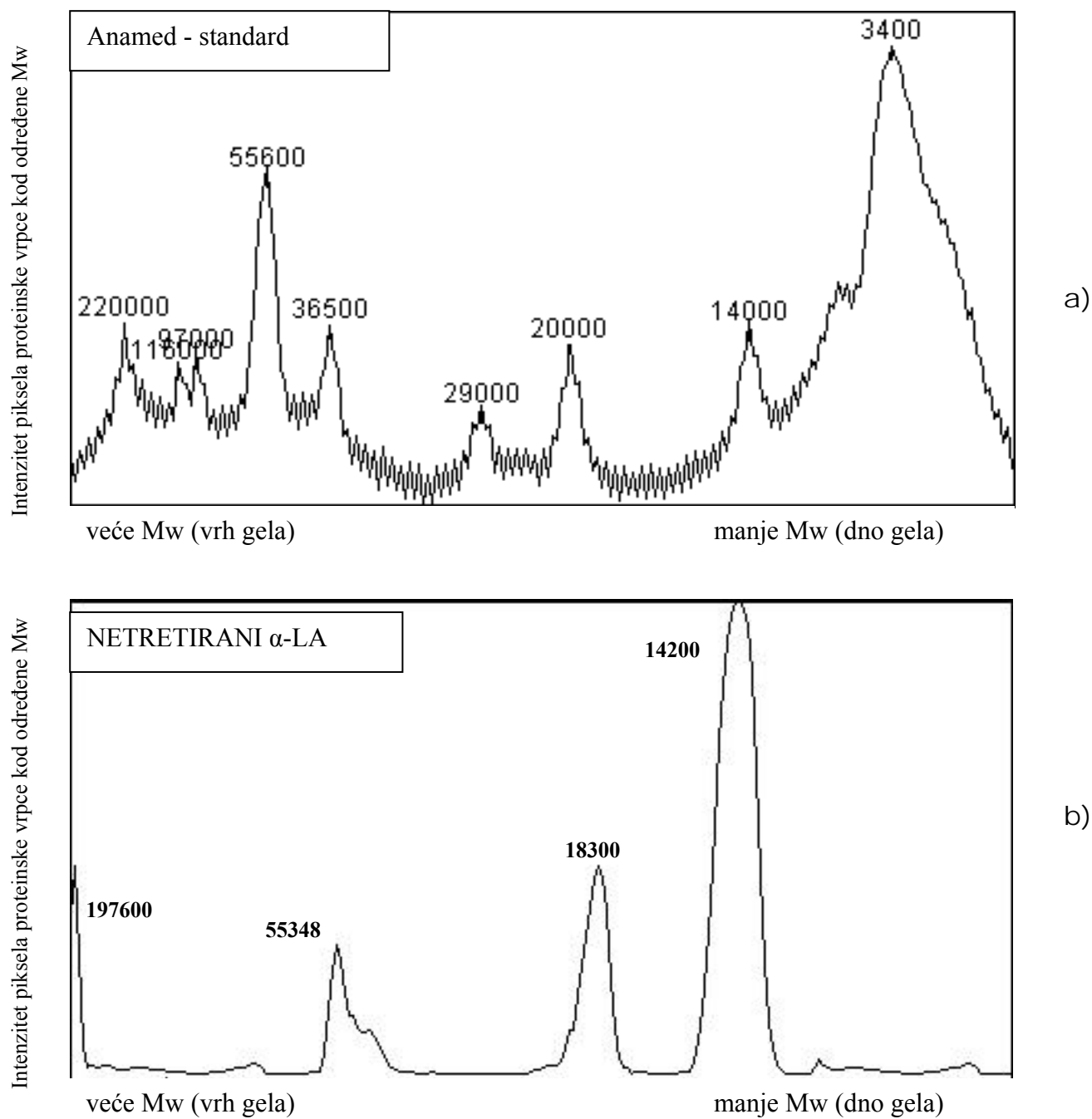
Slika 48. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranih izolata proteina sirutke ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (a i b)



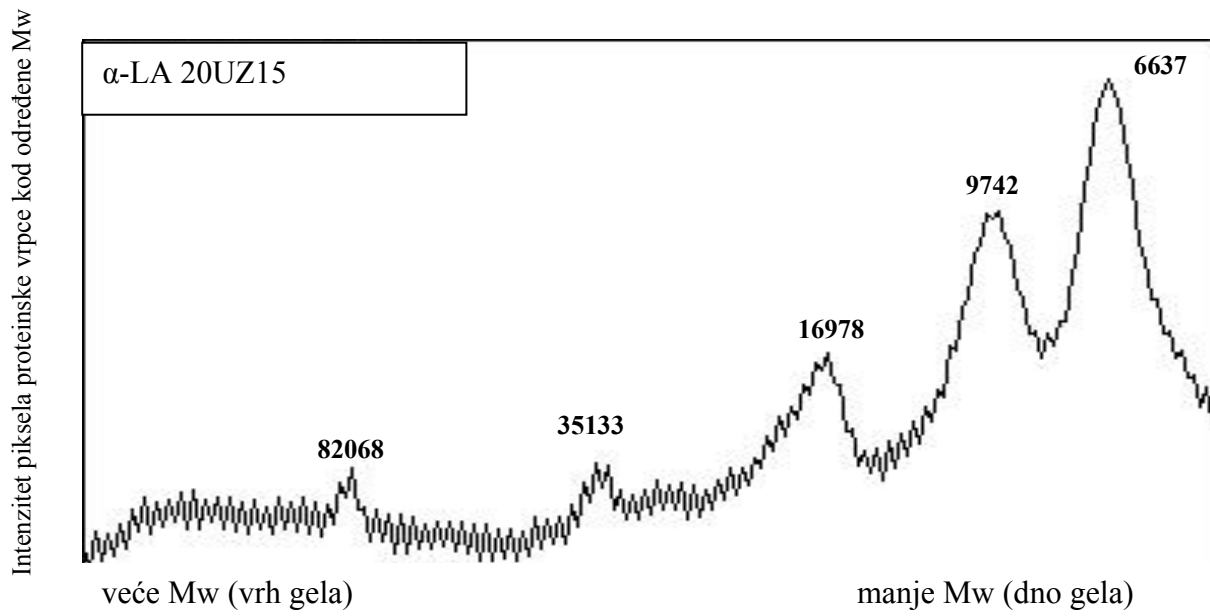
**Slika 49. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) netretiranih (b) koncentrata proteina sirutke i standarda ANAMED (a)**



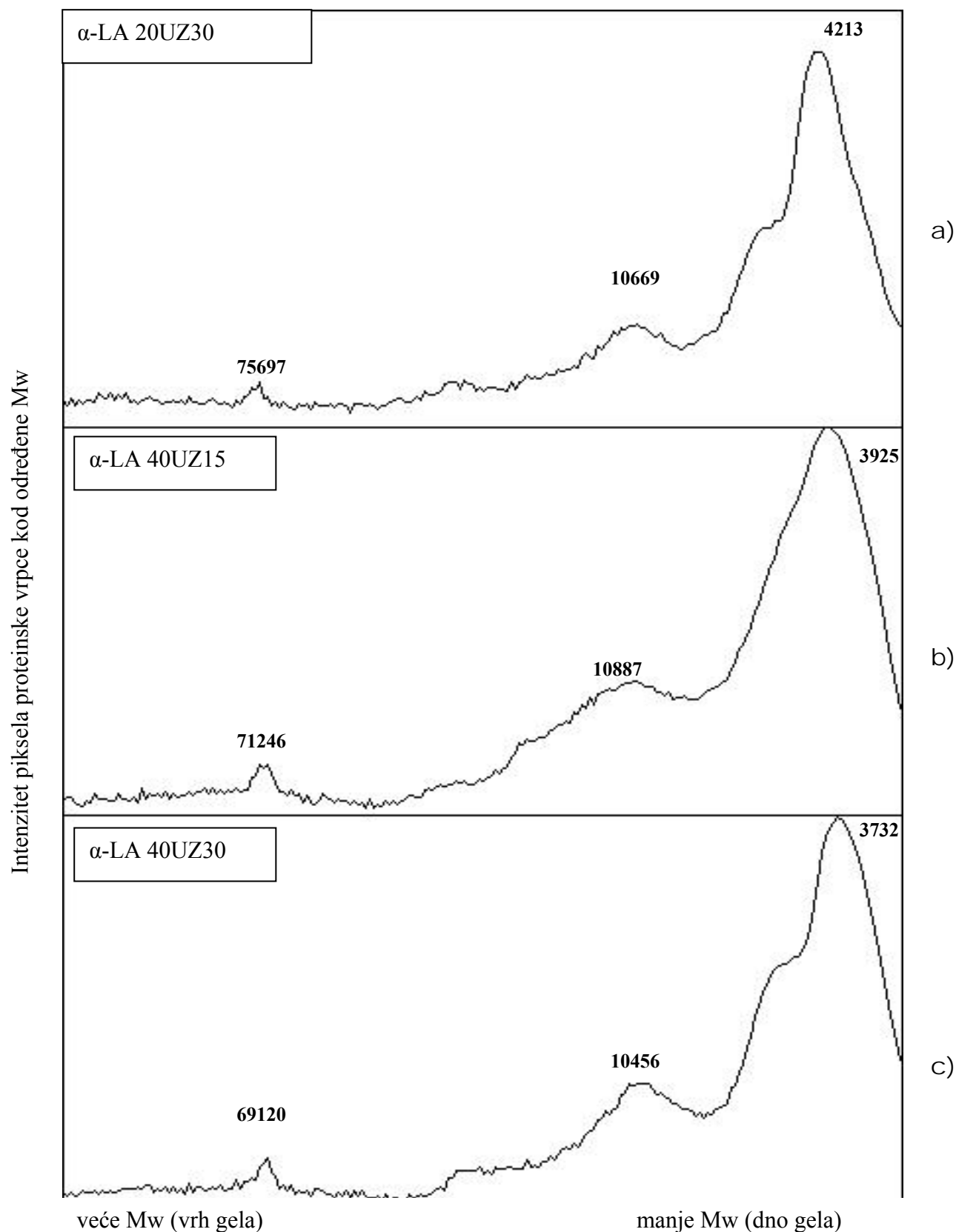
**Slika 50.** Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranih koncentrata proteina sirutke ultrazvukom od 20 kHz (a i b) i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (c)



**Slika 51. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) netretiranog (b)  $\alpha$ -laktalbumina i standarda ANAMED (a)**

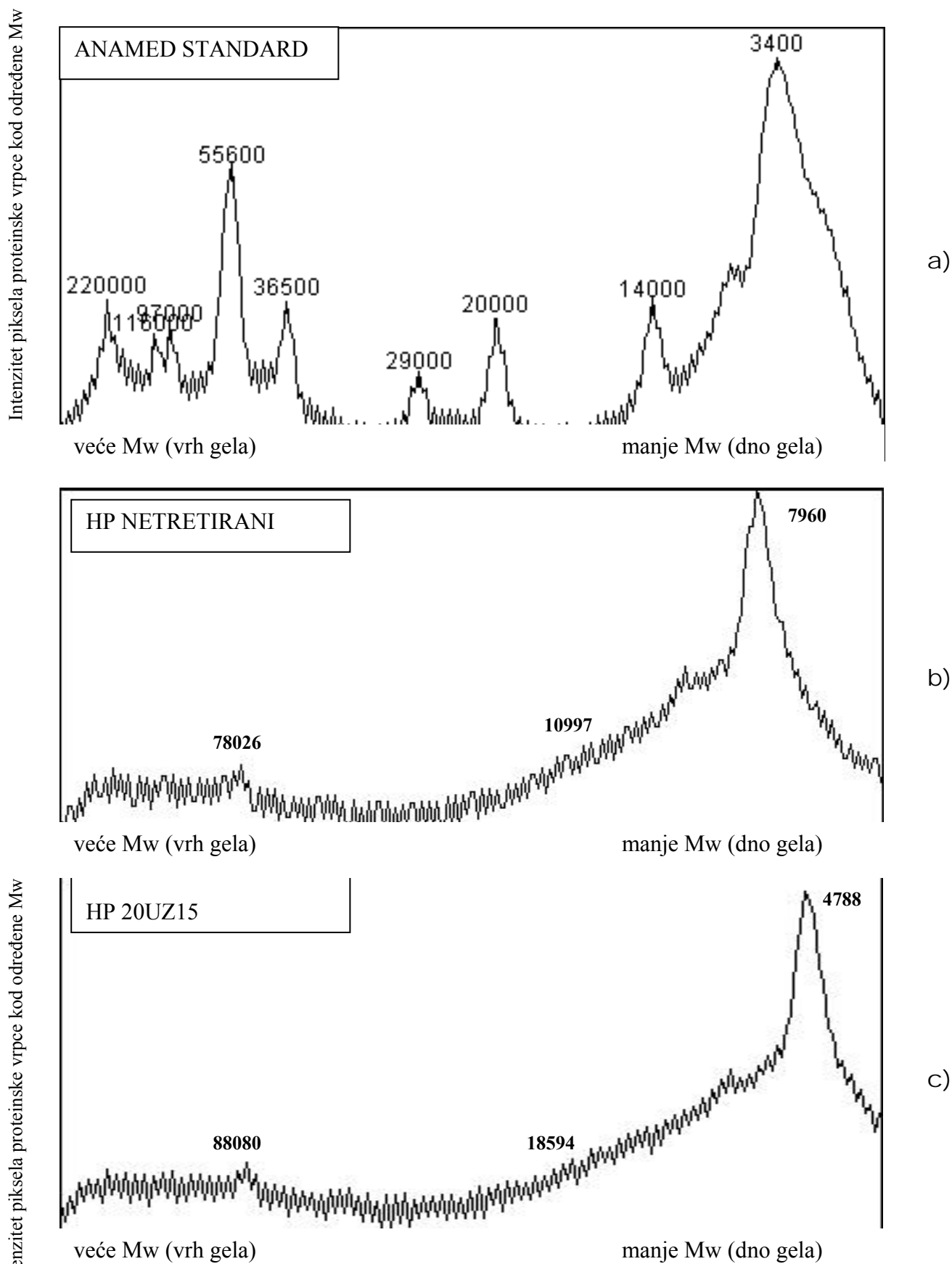


Slika 52. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranog  $\alpha$ -laktalbumina ultrazvukom od 20 kHz

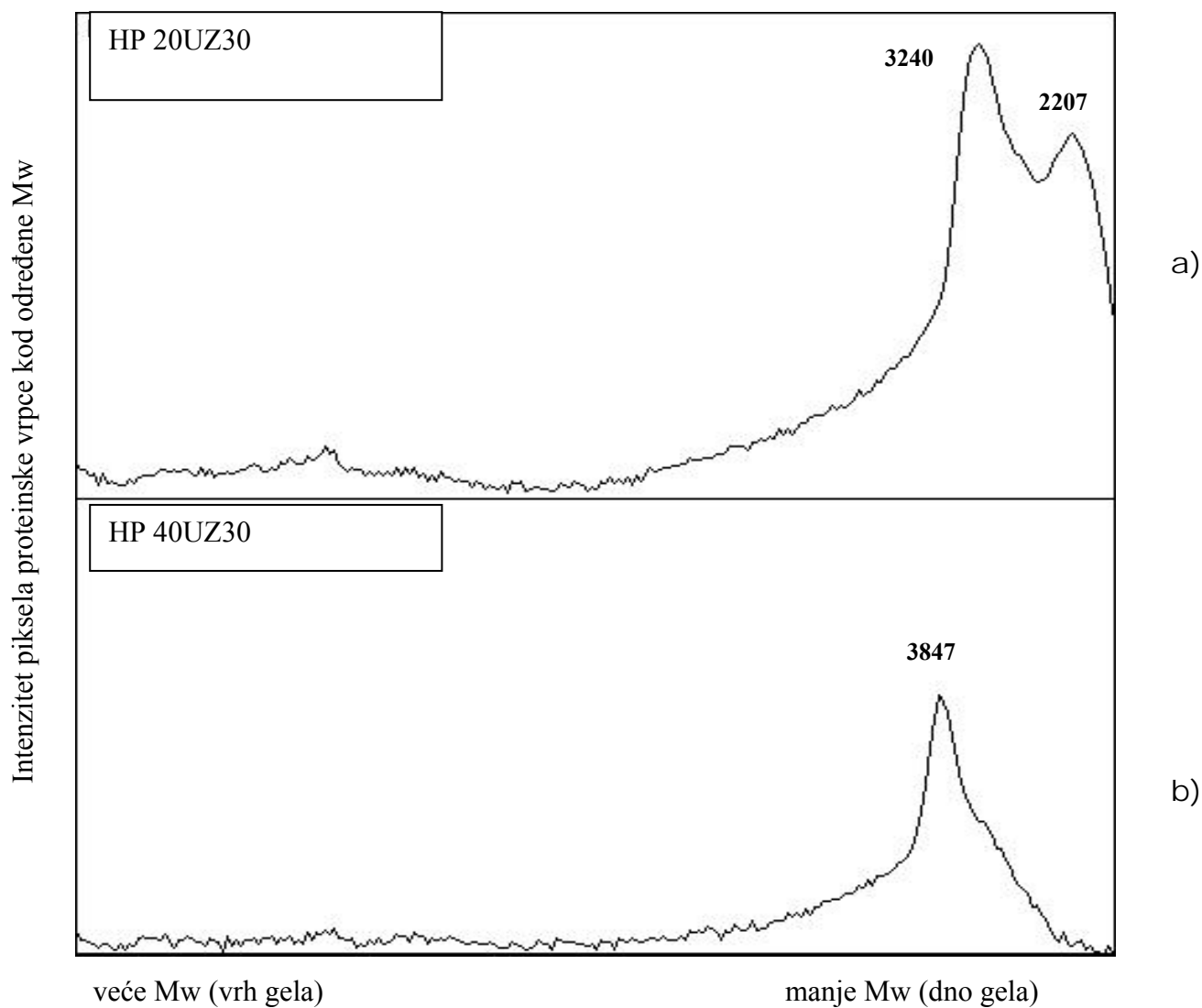


Slika 53. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranog  $\alpha$ -laktalbumina ultrazvukom od 20 kHz (a) i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (b i c)





Slika 54. Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) netretiranih (b) hidrolizata proteina sirutke, tretiranih ultrazvukom od 20 kHz (c) i standarda ANAMED (a)



**Slika 55** Intenzitet piksela proteinske vrpce SDS-PAGE gela kod određene molekularne mase (Mw) tretiranih hidrolizata proteina sirutke ultrazvukom od 20 kHz (a) i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (b)

Tablica 15. Udaljenosti boje i proteina, te odgovarajuće molekularne mase (Mw)

Udaljenost standarda ANAMED i BioLabs (mm)	log Mw standarda	Mw standarda ANAMED i BioLabs (kDa)	Udaljenost proteina (mm)	log Mw proteina	Mw proteina (kDa)
2	2,342	220			
3	2,243	175			
4	2,064	116	3,5	2,176	150
5	1,987	97	8,22	1,903	80
7	1,919	83	8,99	1,892	78
14	1,820	66	10,5	1,871	74,2
16	1,792	62	13	1,835	68,4
19	1,745	55,6	13,93	1,822	66,3
24	1,677	47,5			
32	1,562	36,5	20	1,734	54,3
35,5	1,512	32,5	25	1,663	46
39	1,462	29	30,5	1,584	38,4
43,5	1,398	25	43	1,405	25,5
50	1,301	20	53,5	1,256	18
56	1,217	16,5	52,5	1,316	14,4
61	1,146	14	78,15	0,903	8,0
84	0,813	6,5	84	0,813	6,5
86	0,785	6,1	86	0,785	6,1
104	0,531	3,4	99,2	0,602	4
113,5	0,398	2,5	113,5	0,398	2,5

**Tablica 16. Povećanje volumena pjene i stabilnost pjene netretiranih i tretiranih izolata, koncentrata, hidrolizata proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbumina nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz**

Tretman	<b><i>POVEĆANJE VOLUMENA PJENE (%)</i></b>			
	IP	WPC	$\alpha$ -LA	HP
netretirani	132	124	113	168
20UZ15	235	221	145	170
20UZ30	135	198	134	178
40UZ15	220	209	123	177
40UZ30	198	180	114	165
500UZ15	140	167	145	178
500UZ30	143	165	136	167
<b><i>MINIMALNA STABILNOST PJENE (min)</i></b>				
Tretman	IP	WPC	$\alpha$ -LA	HP
netretirani	68,3	55,6	49,7	65,7
20UZ15	98,4	89,5	56,5	78,6
20UZ30	79,5	79,6	58,7	76,5
40UZ15	84,6	86,7	65,6	85,6
40UZ30	79,6	75,4	67,3	75,5
500UZ15	67,8	57,6	53,2	67,4
500UZ30	63,6	56,7	52,3	64,5

**Tablica 17. Povećanje volumena pjene i stabilnost pjene netretiranih i tretiranih izolata proteina sirutke s ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

Tretman	POVEĆANJE VOLUMENA PJENE (%)			INDEKS STABILNOSTI PJENE  (sek)	MINIMALNA STABILNOST PJENE  (min)
	Vrijeme miješanja u mikseru				
	5 min	10 min	15 min		
IP	299,02	448,3	491,3	132	290
IP30UZ3	370,19	346,08	436,72	75	105
IP30UZ5	318,92	322,44	314,91	90	150
IP30UZ10	367,13	361,82	447,12	60	75
IP30UZ3 + G	197,29	253,38	342,17	420	450
IP30UZ5 + G	187,09	237,34	262,51	360	350
IP30UZ10 + G	147,42	193,49	246,98	300	300
IP30UZ3 + C	234,47	312,62	357,05	2	10
IP30UZ5 + C	271,70	332,48	422,93	60	75
IP30UZ10 + C	328,13	417,12	445,38	79	110
IP + S	326,59	461,86	513,21	156	320
IP + MP	320,78	380,33	412,03	102	250
IP30UZ5+S	877,35	824,01	906,86	300	1440
IP30UZ10+S	793,66	802,69	789,95	300	1440
IP30UZ5+MP	357,97	320,52	402,99	10	90
IP30UZ10+MP	790,85	856,93	876,43	240	1200

**Tablica 18. Povećanje volumena pjene i stabilnost pjene netretiranih i tretiranih koncentrata proteina sirutke s ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guaru, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

Tretman	POVEĆANJE VOLUMENA PJENE (%)			INDEKS STABILNOSTI PJENE  (sek)	MINIMALNA STABILNOST PJENE  (min)
	Vrijeme miješanja u mikseru				
	5 min	10 min	15 min		
WPC	334,88	356,62	370,28	30	210
WPC30UZ3	340,51	350,15	386,43	5	10
WPC30UZ5	321,56	325,55	316,13	42	23
WPC30UZ10	313,53	371,84	386,28	73	39
WPC30UZ3 + G	653,028	726,14	813,27	1320	1690
WPC30UZ5 + G	566,4224	609,93	670,05	1560	1800
WPC30UZ10 + G	618,6063	686,39	752,04	1420	1750
WPC30UZ3 + C	288,15	285,46	325,31	85	120
WPC30UZ5 + C	264,27	306,16	356,58	105	105
WPC30UZ10 + C	340,40	443,46	514,71	175	260
WPC + S	338,55	376,92	380,68	60	230
WPC + MP	324,57	311,80	304,96	30	5
WPC30UZ5+S	697,41	682,88	701,94	150	150
WPC30UZ10+S	625,87	590,37	604,83	300	120
WPC30UZ5+MP	124,95	128,60	151,92	150	5
WPC30UZ10+MP	624,07	700,86	753,18	195	100

**Tablica 19. Indeks aktiviteta i indeks stabilnosti emulzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz**

<b><i>INDEKS AKTIVITETA EMULZIJE – IAE (<math>m^2/g</math>)</i></b>				
Tretman	IP	WPC	$\alpha$ -LA	HP
netretirani	148,2	114,5	180,62	161,32
20UZ15	165,86	294,67	204,67	174,45
20UZ30	276,47	356,32	224,78	181,27
40UZ15	240,64	251,34	195,67	183,25
40UZ30	177,86	282,23	187,54	165,76
500UZ15	174,52	134,2	182,47	162,67
500UZ30	173,65	134,6	181,56	161,23
<b><i>INDEKS STABILNOSTI EMULZIJE – ISE (h)</i></b>				
Tretman	IP	WPC	$\alpha$ -LA	HP
netretirani	70,5	65,5	70,9	77,9
20UZ15	123,5	156,7	89,5	80,4
20UZ30	145,3	187,8	88,4	82,3
40UZ15	137,3	154,8	77,8	84,6
40UZ30	134,3	145,3	76,9	86,7
500UZ15	81,3	78,4	73,4	78,7
500UZ30	80,9	77,3	72,3	75,6

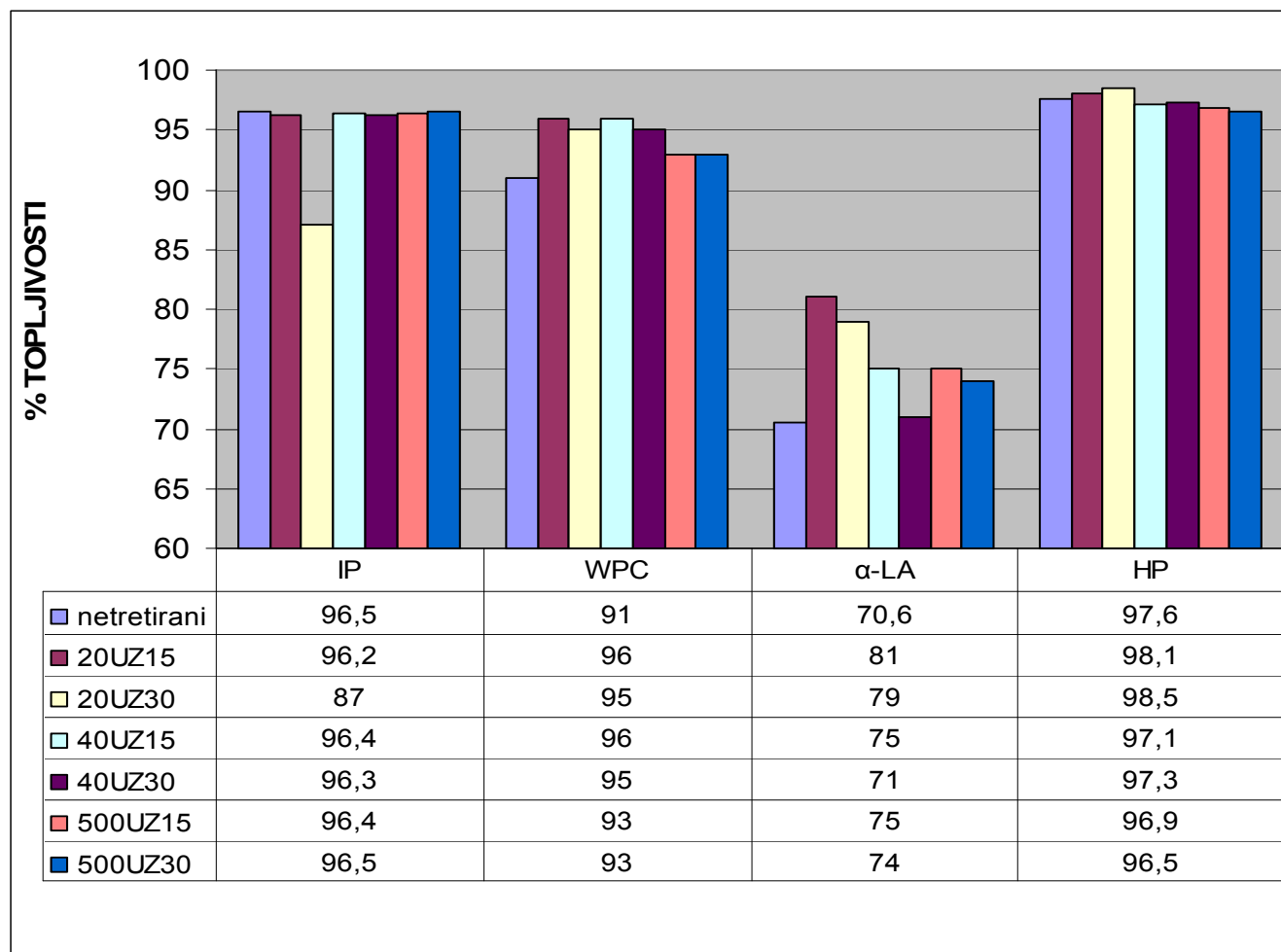
**Tablica 20. Indeks aktiviteta i indeks stabilnosti emulzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima proteina sirutke s ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

Tretman	INDEKS AKTIVITETA EMULZIJE IAE (m <sup>2</sup> /g)	INDEKS STABILNOSTI EMULZIJE ISE (h)
IP	148,2	70,5
IP30UZ3	94,21	18,84
IP30UZ5	83,89	13,92
IP30UZ10	93,57	20,92
IP30UZ3 + G	130,07	25,59
IP30UZ5 + G	111,01	29,34
IP30UZ10 + G	96,84	32,33
IP30UZ3 + C	120,51	24,10
IP30UZ5 + C	113,63	23,06
IP30UZ10 + C	135,03	29,55
IP + S	153,60	73,5
IP + MP	165,03	65,3
IP30UZ5+S	63,49	33,12
IP30UZ10+S	61,16	29,54
IP30UZ5+MP	152,46	34,78
IP30UZ10+MP	143,66	28,97

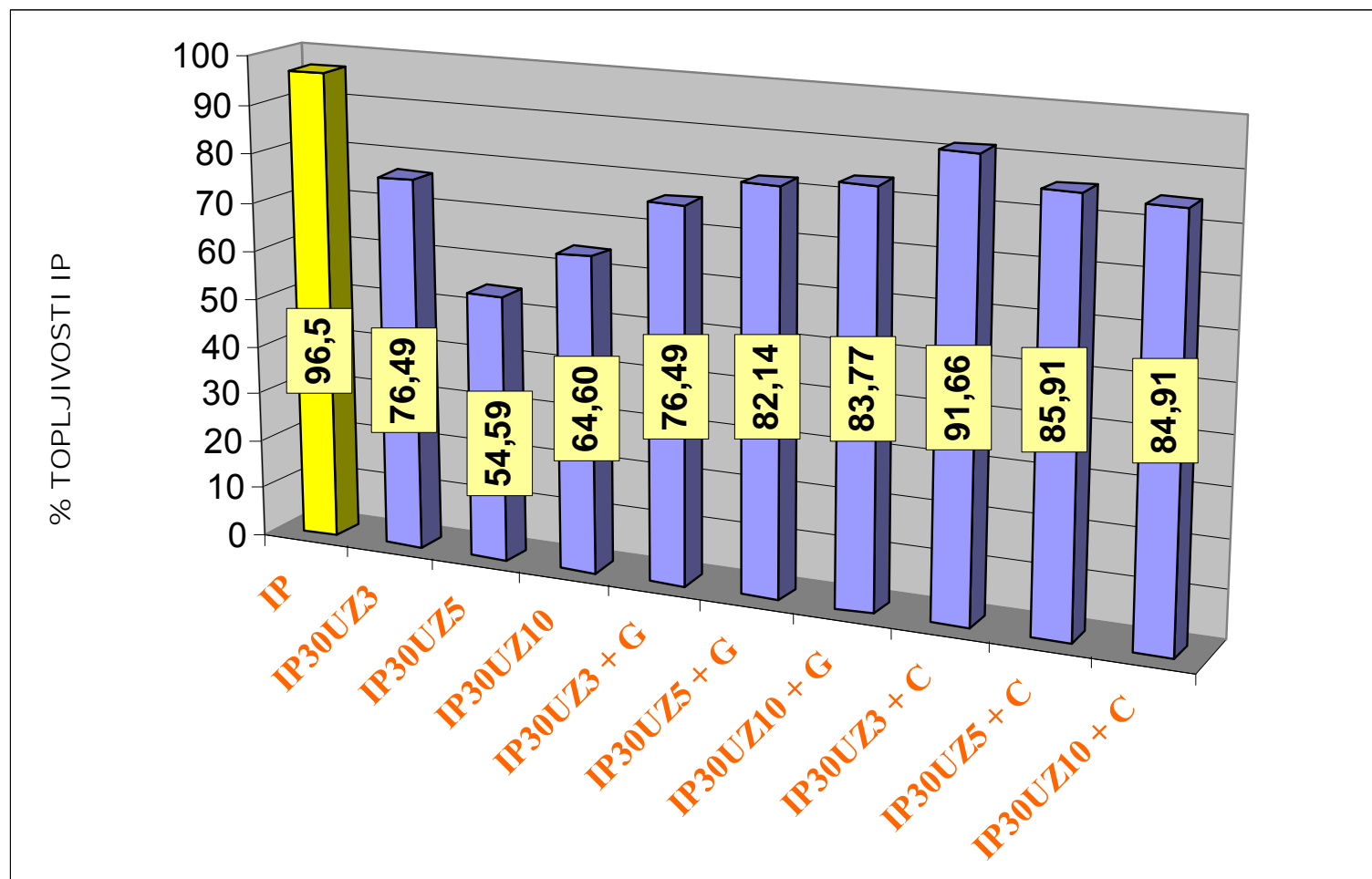


**Tablica 21. Indeks aktiviteta i indeks stabilnosti emulzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim koncentratima proteina sirutke s ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guaru, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

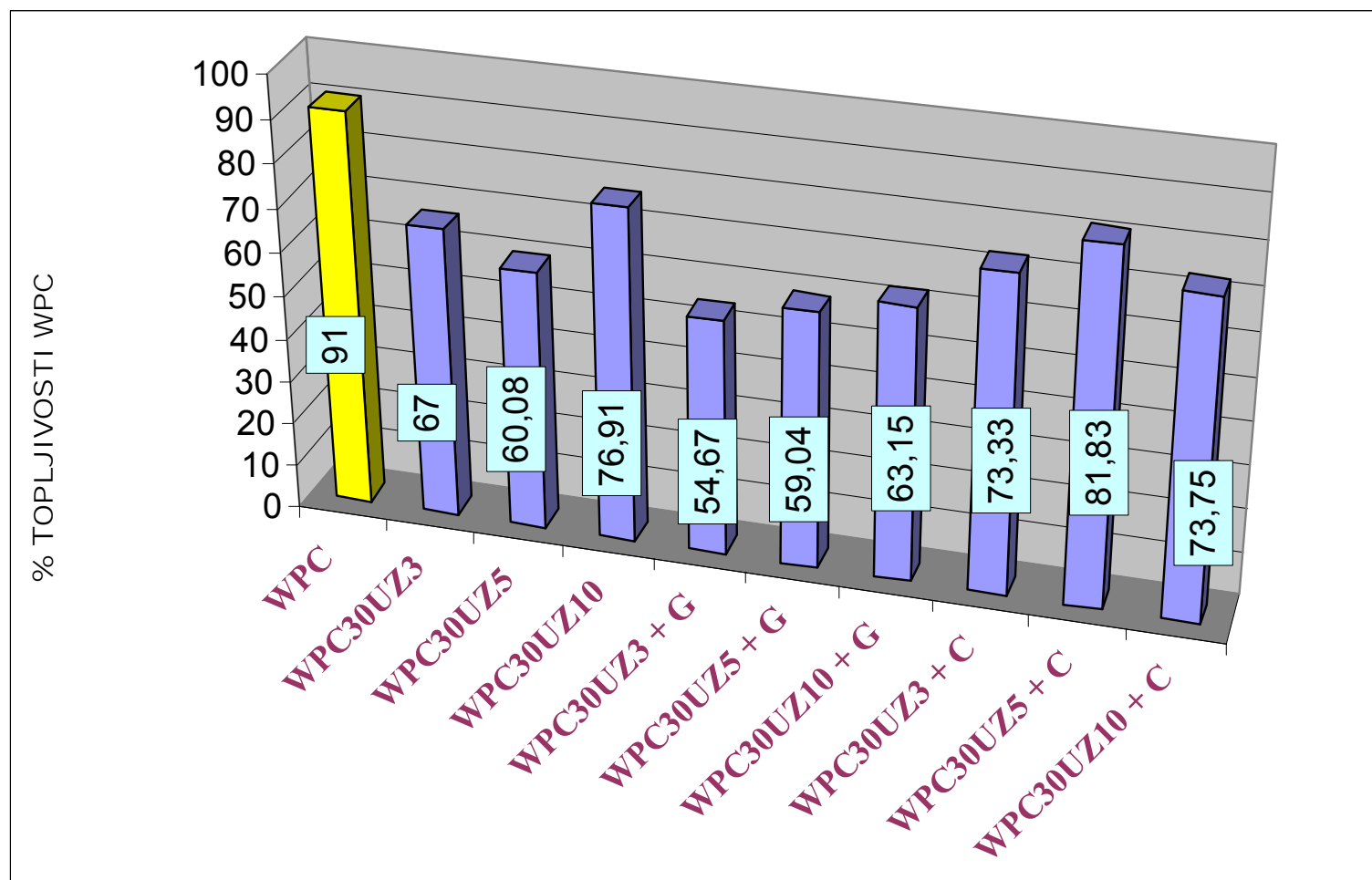
Tretman	INDEKS AKTIVITETA EMULZIJE IAE (m <sup>2</sup> /g)	INDEKS STABILNOSTI EMULZIJE ISE (h)
WPC	114,5	65,5
WPC30UZ3	143,02	24,57
WPC30UZ5	99,79	14,88
WPC30UZ10	113,43	16,98
WPC30UZ3 + G	148,86	30,52
WPC30UZ5 + G	147,80	36,07
WPC30UZ10 + G	145,56	25,97
WPC30UZ3 + C	145,38	24,78
WPC30UZ5 + C	144,79	24,78
WPC30UZ10 + C	134,34	24,70
WPC + S	124,30	67,2
WPC + MP	134,60	64,3
WPC30UZ5+S	112,00	21,98
WPC30UZ10+S	88,15	18,11
WPC30UZ5+MP	161,26	28,44
WPC30UZ10+MP	151,29	24,51



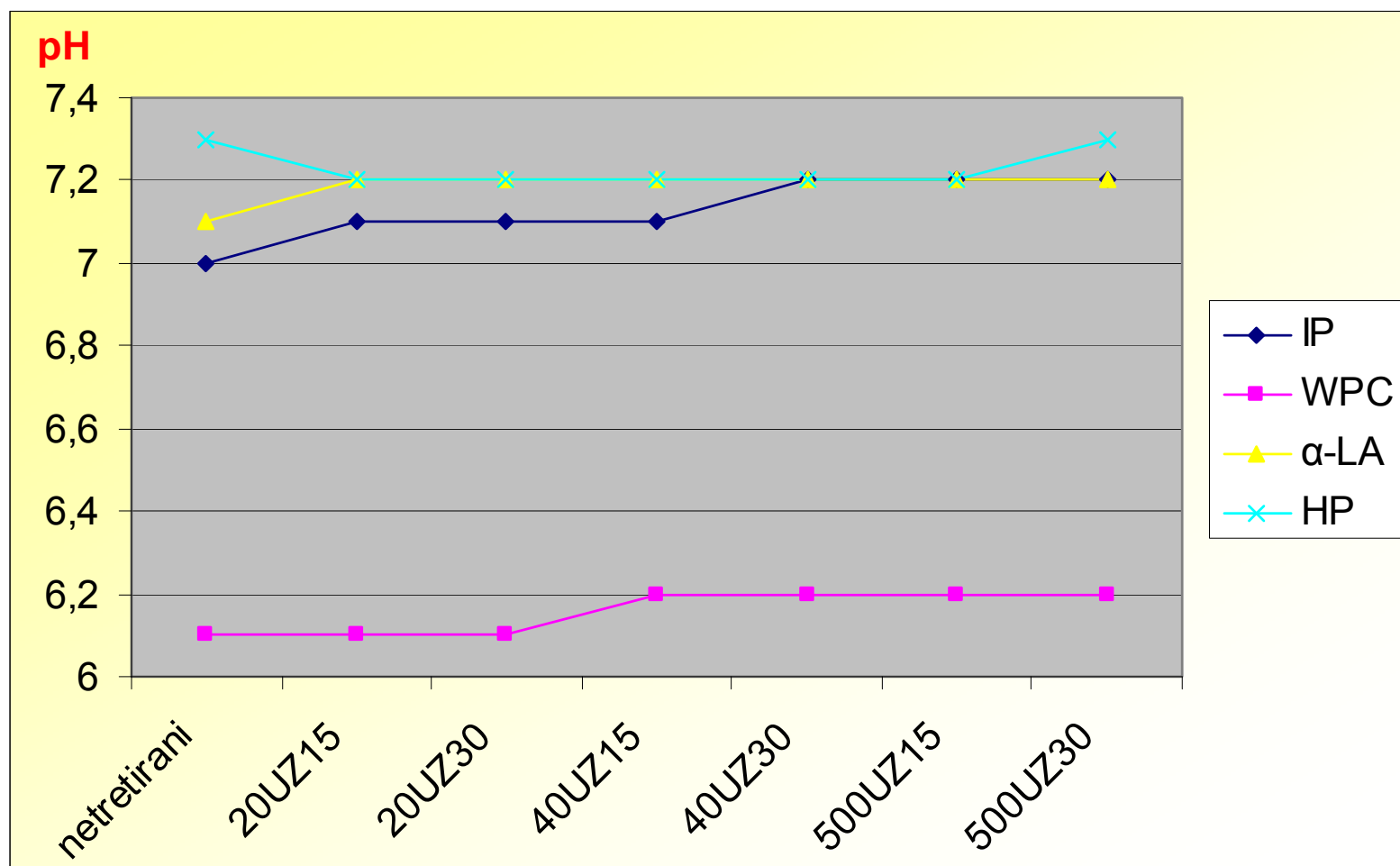
Slika 56. Topljivost (u vodi) suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



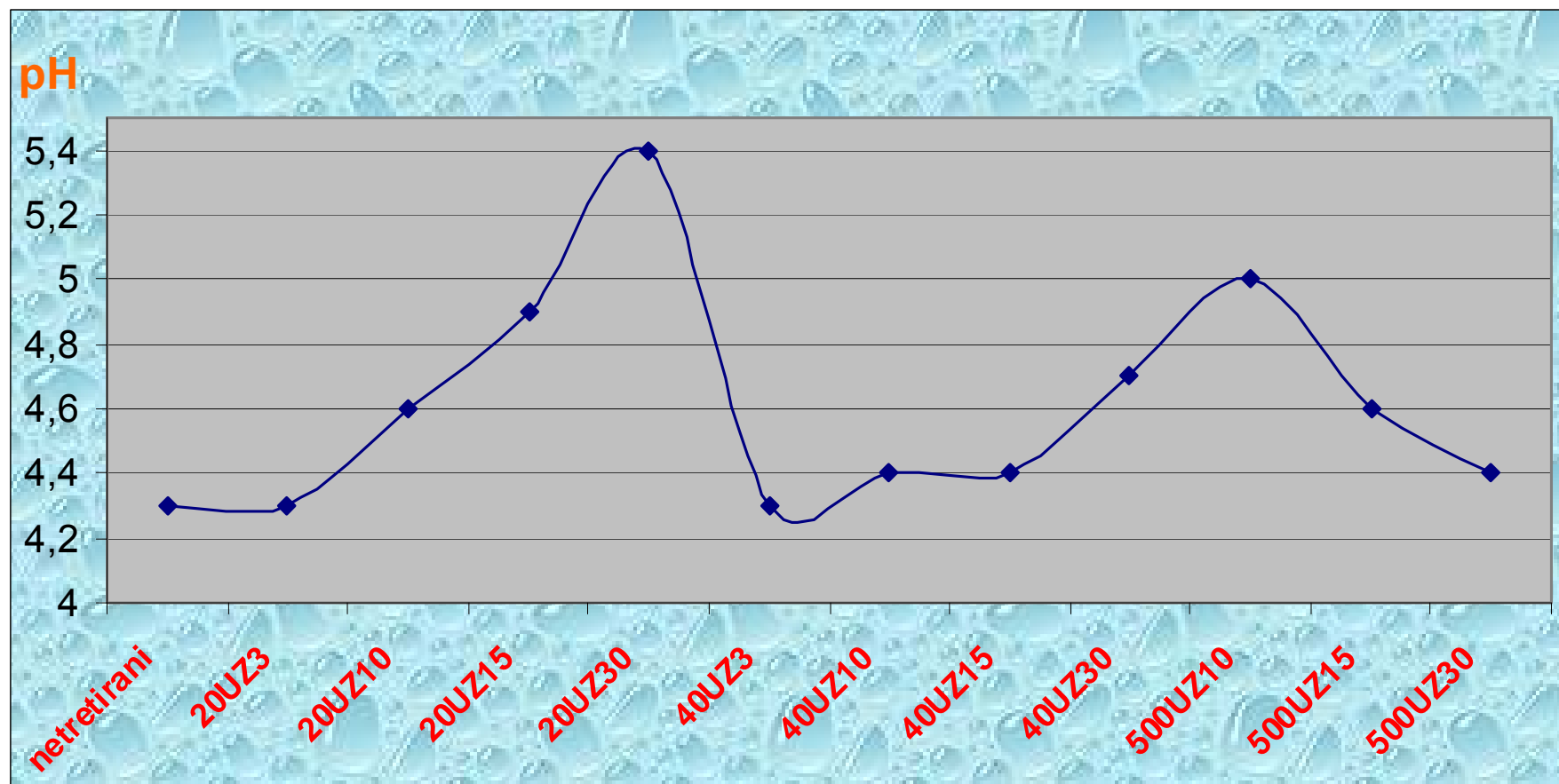
Slika 57. Topljivost (u vodi) suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima proteina sirutke ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara i metil celuloze



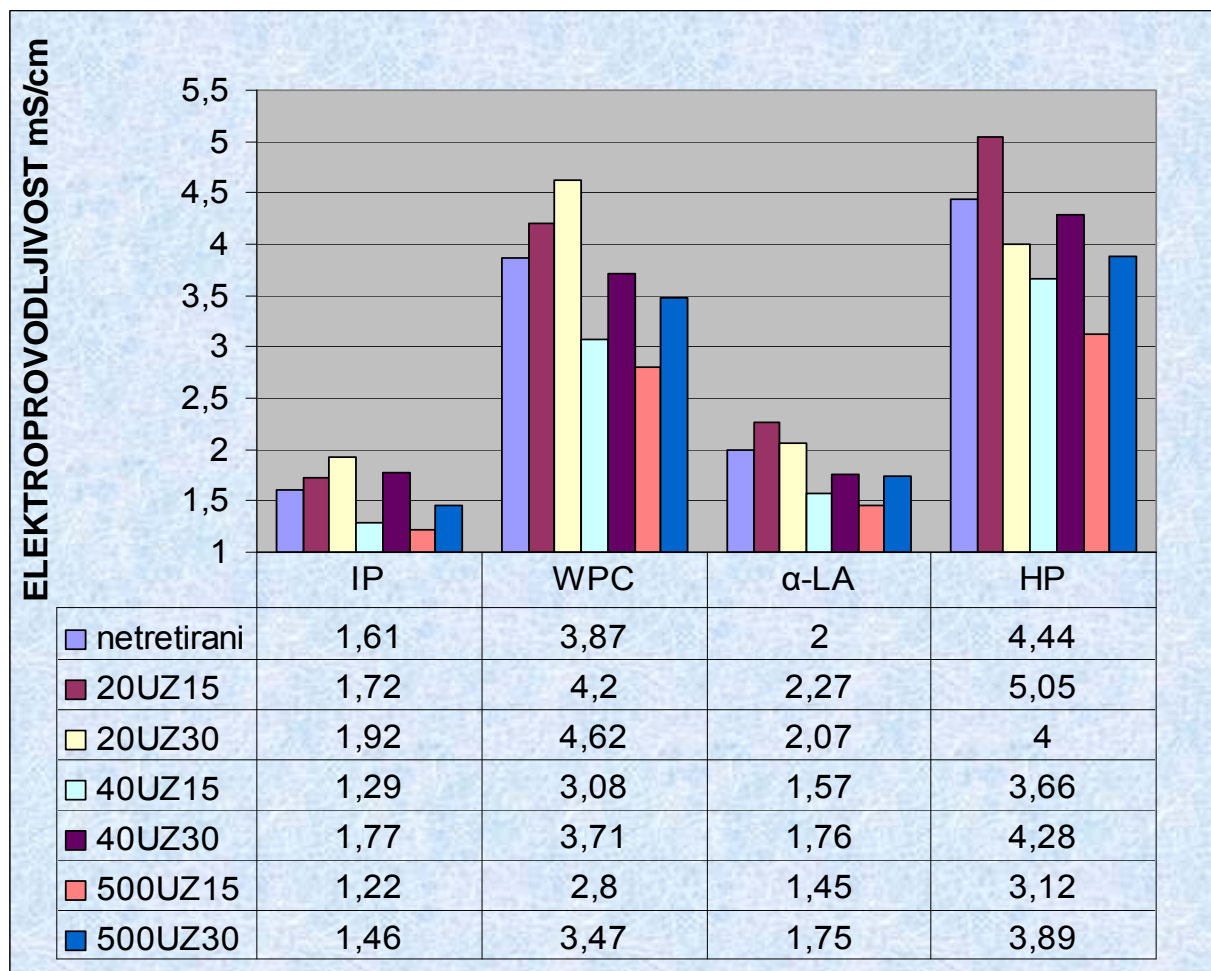
Slika 58. Topljivost (u vodi) suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim koncentratima proteina sirutke ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara i metil celuloze



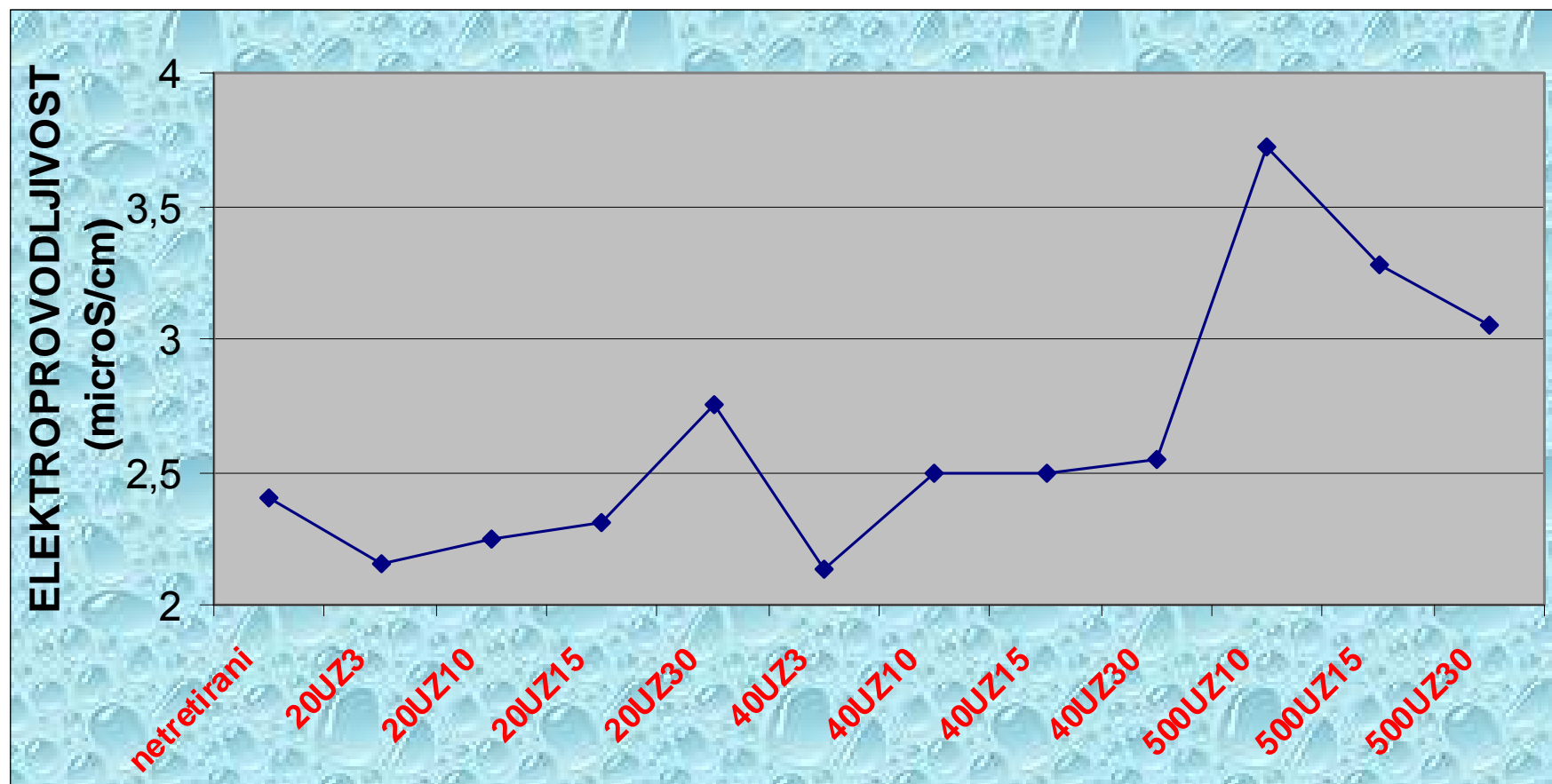
Slika 59. Promjene pH vrijednosti suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



Slika 60. Promjene pH vrijednosti destilirane vode nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz

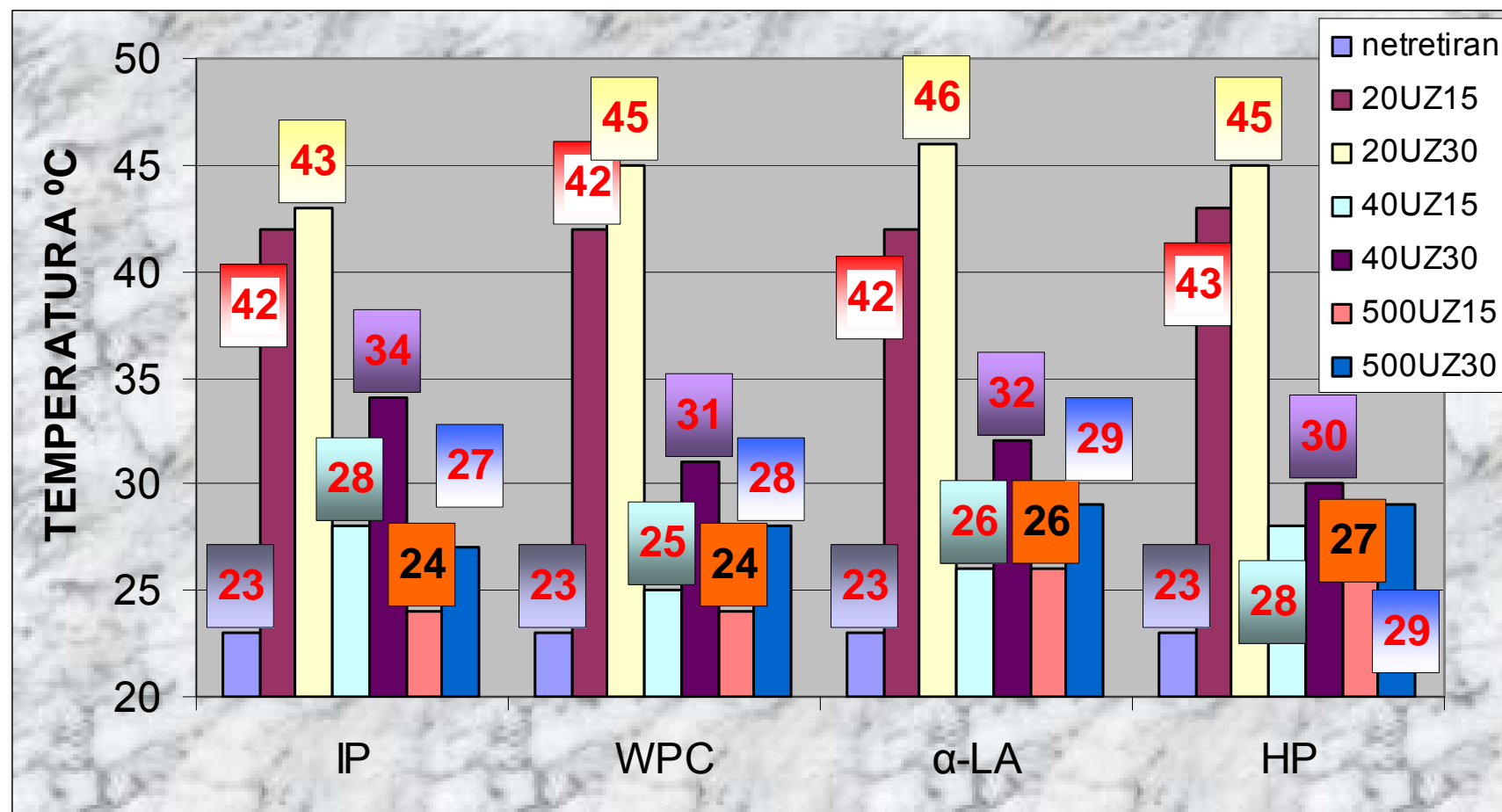


Slika 61. Promjene elektroprovodljivosti suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ - laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz

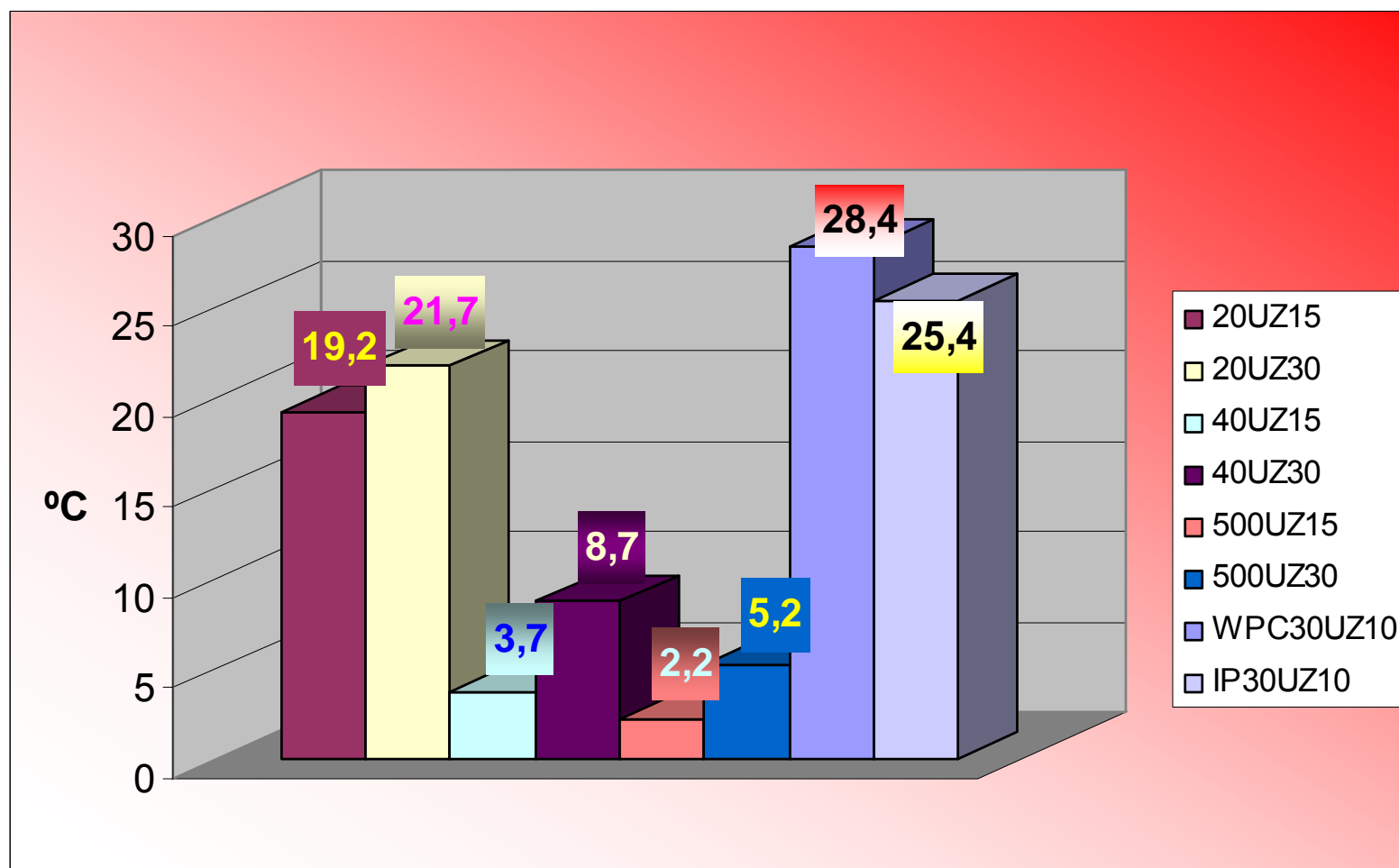


Slika 62. Promjene elektroprovodljivosti destilirane vode nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz

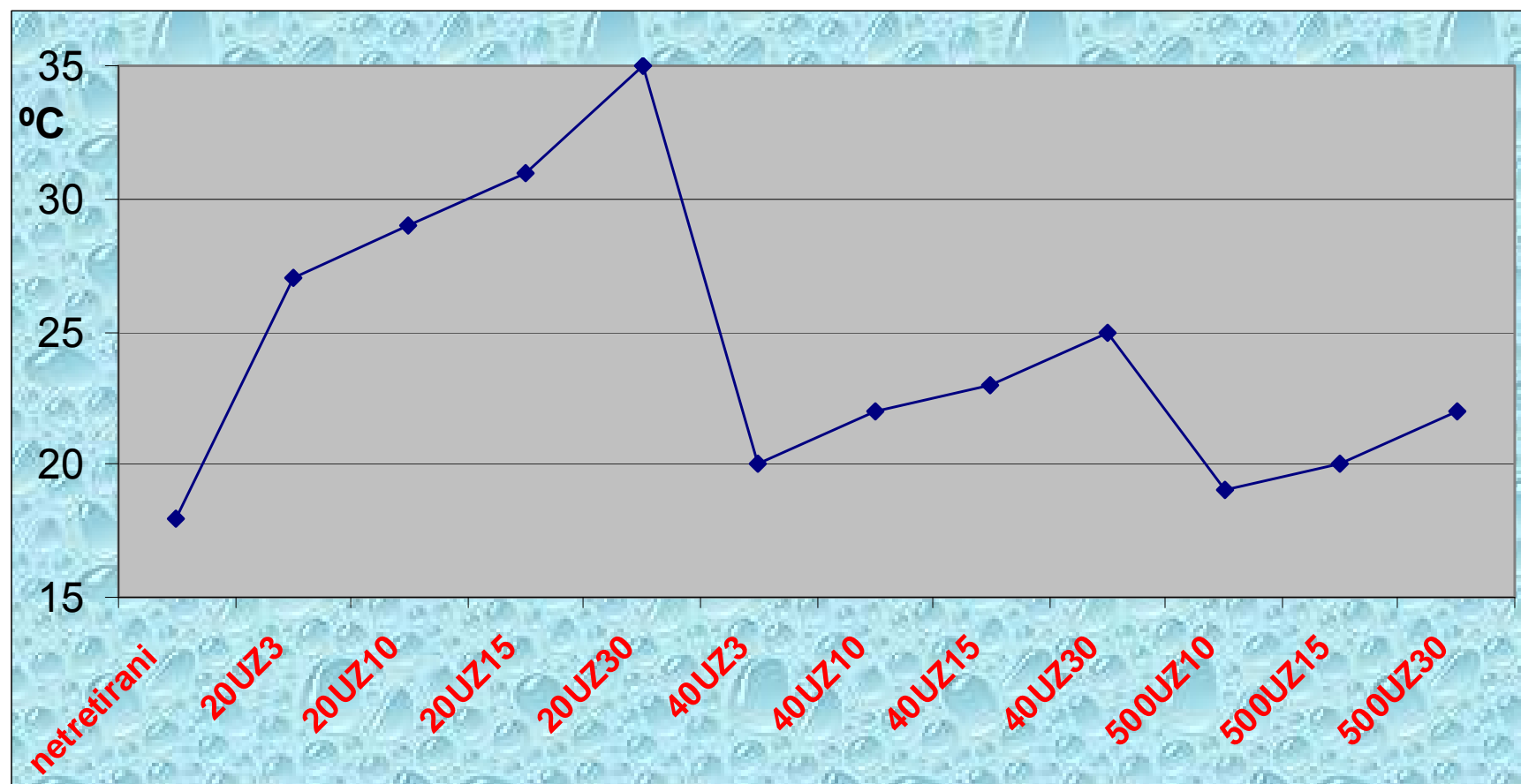




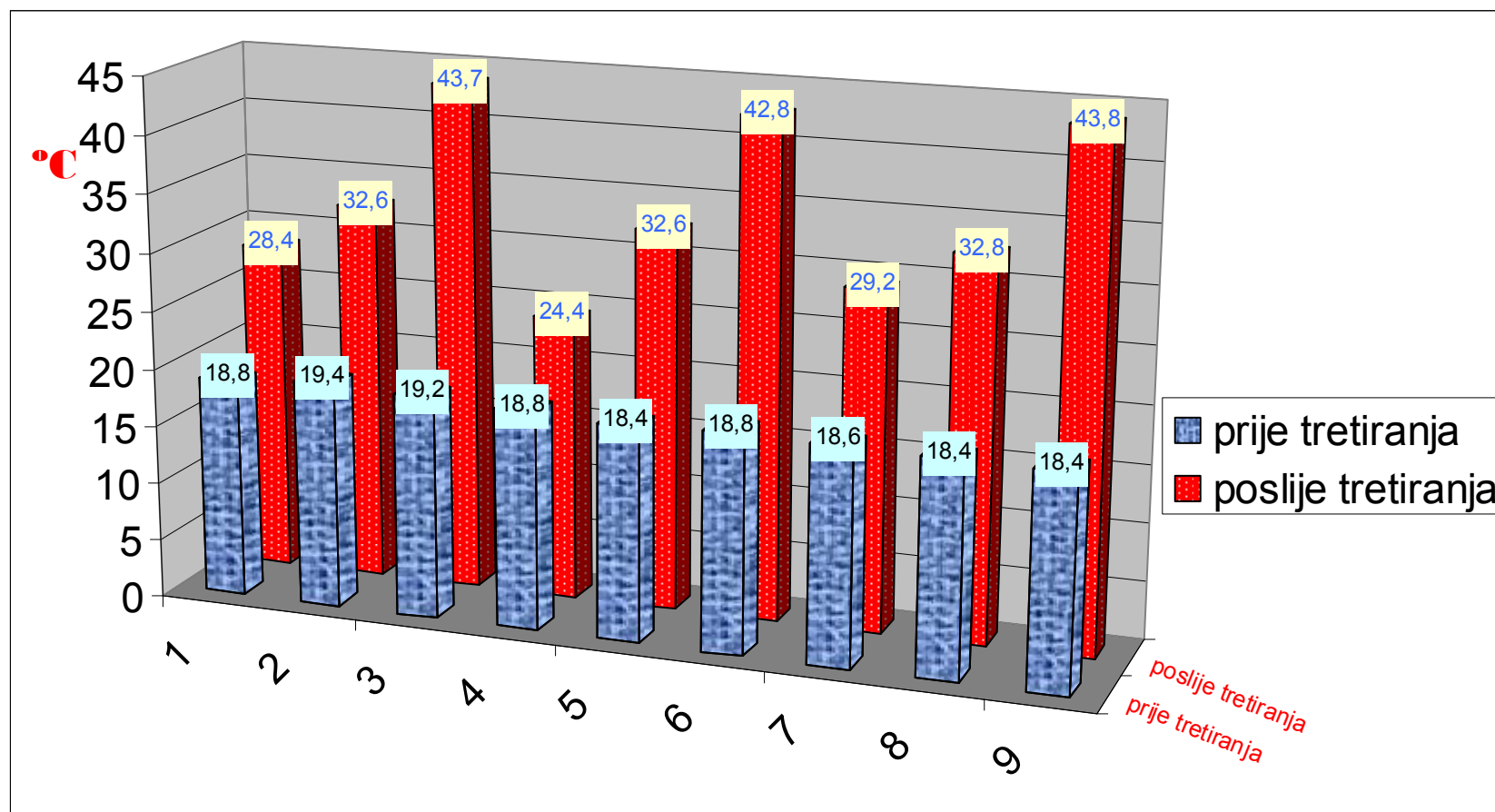
Slika 63. Promjene temperature suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



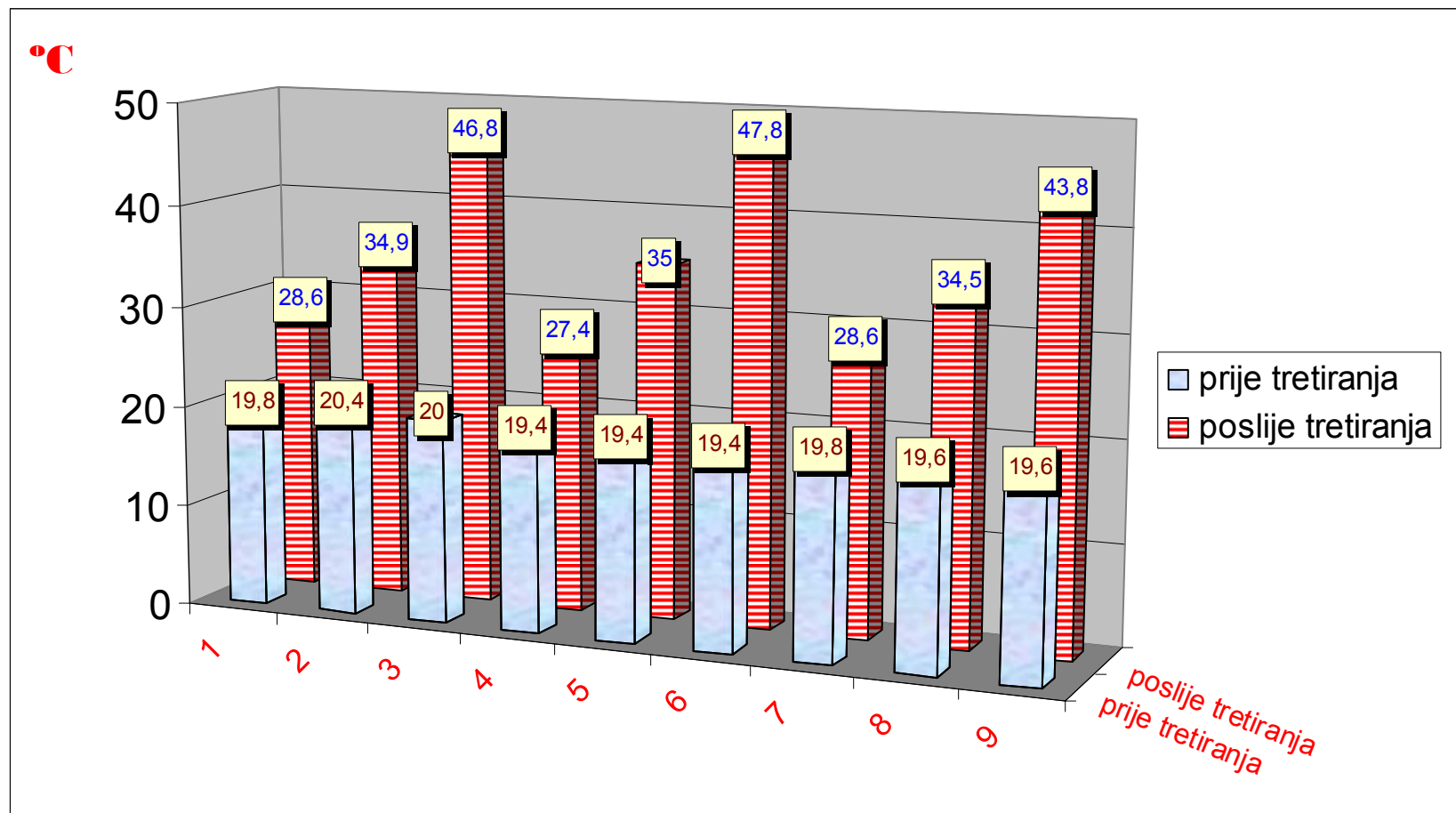
Slika 64. Prosječan porast temperature suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima, koncentratima, hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



Slika 65. Prosječan porast temperature destilirane vode nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



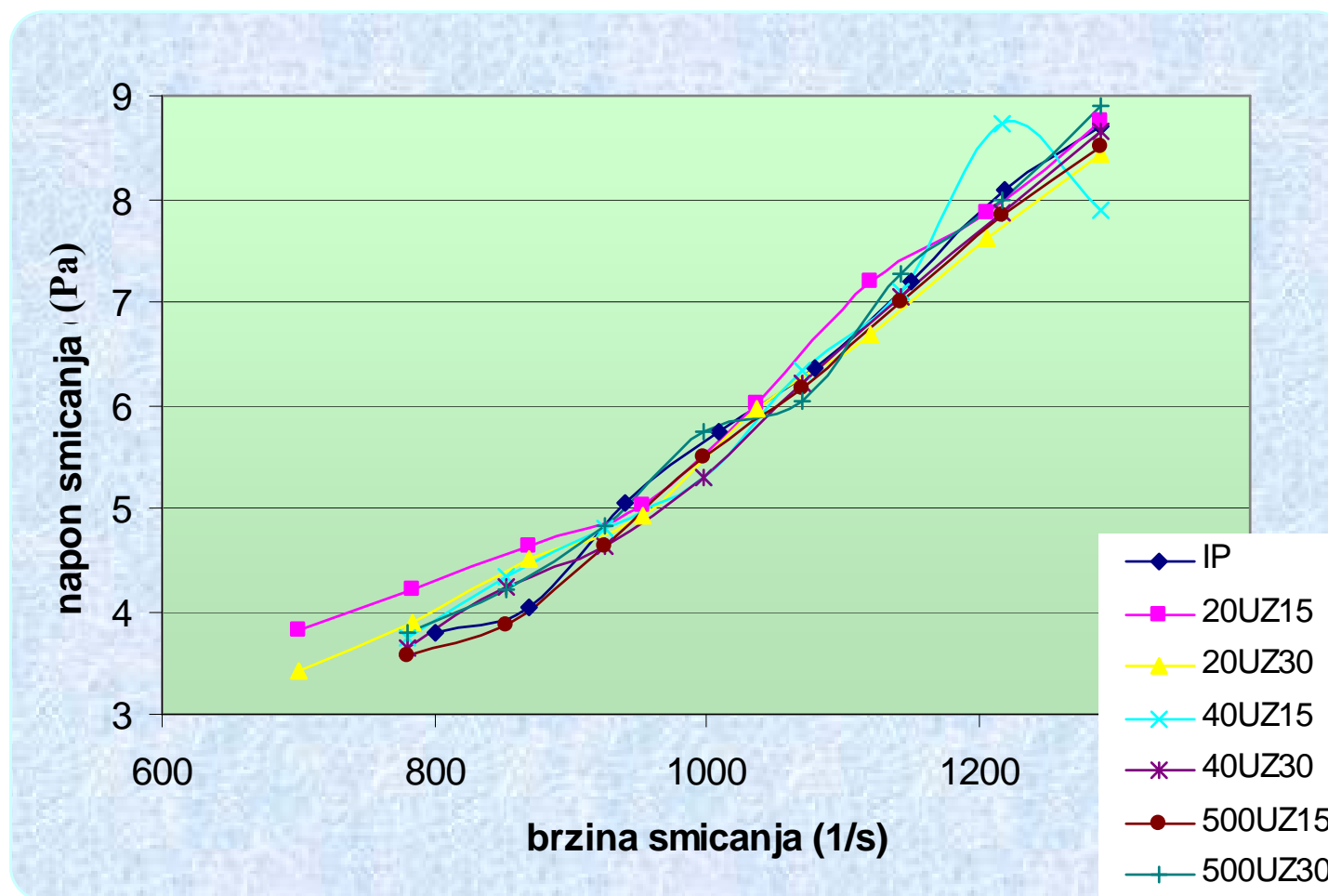
Slika 66. Promjene temperature suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim izolatima proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara i metil celuloze  
(1. IP30UZ3, 2. IP30UZ5, 3. IP30UZ10, 4. IP30UZ3 + G, 5. IP30UZ5 + G, 6. IP30UZ10 + G, 7. IP30UZ3 + C, 8. IP30UZ5 + C, 9. IP30UZ10 + C)



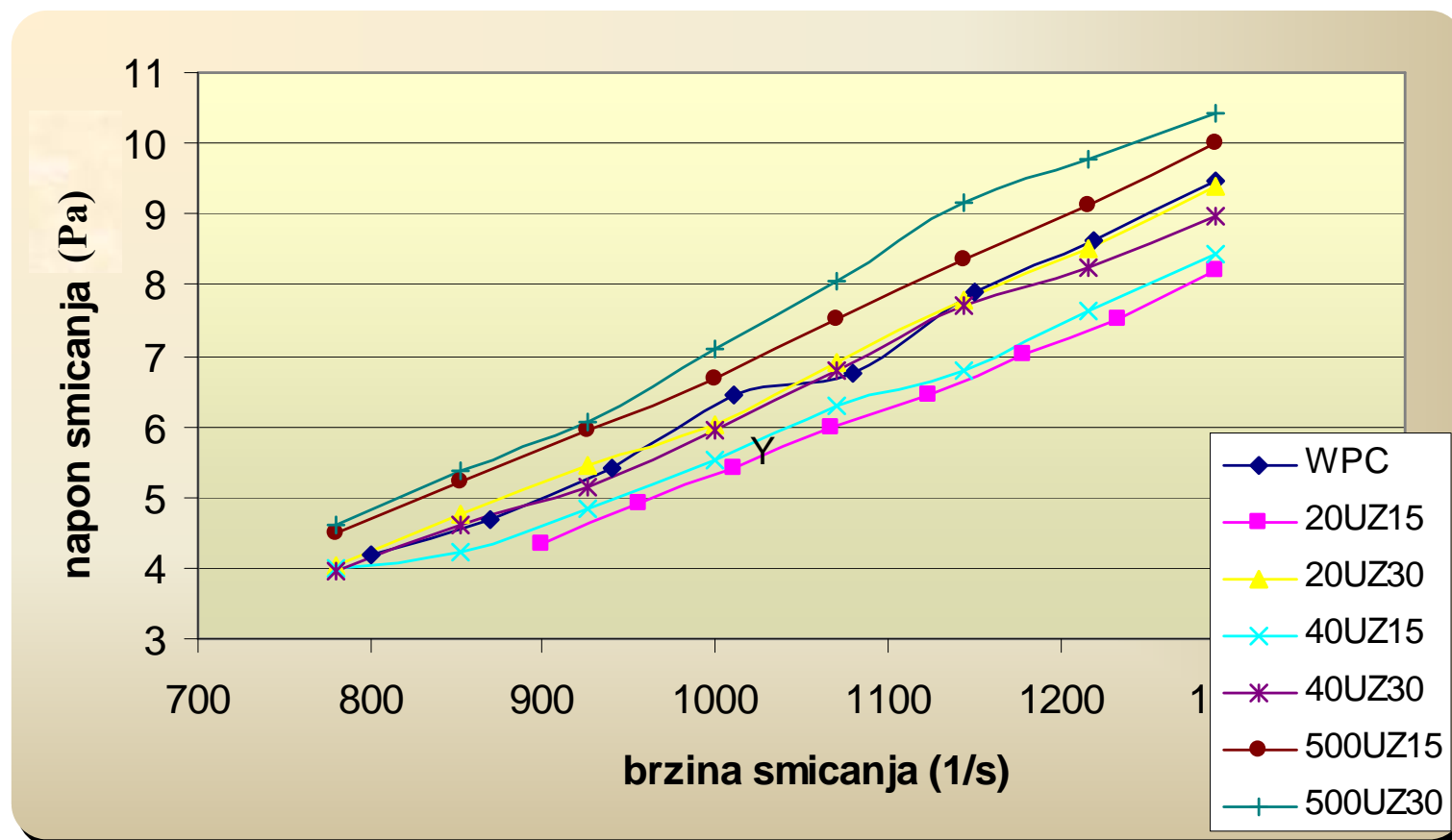
Slika 67. Promjene temperature suspenzija pripremljenih s netretiranim i tretiranim koncentratima proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guaru i metil celuloze  
 (1. WPC30UZ3, 2. WPC30UZ5, 3. WPC30UZ10, 4. WPC30UZ3 + G, 5. WPC30UZ5 + G, 6. WPC30UZ10 + G, 7. WPC30UZ3 + C, 8. WPC30UZ5 + C, 9. WPC30UZ10 + C)

Tablica 22. Reološke vrijednosti modelnih suspenzija prije i nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, 40 kHz i 500 kHz pripremljenih s izolatima, koncentratima i hidrolizatima proteina sirutke, te  $\alpha$ -laktalbuminom

	Tretman	Prividna viskoznost kod 1290 s <sup>-1</sup> (mPa s)	Koeficijent konzistencije <b>k</b> (mPa s <sup>n</sup> )	Indeks tečenja <b>n</b>	Koeficijent regresije <b>R<sup>2</sup></b>
<b><math>\alpha</math> LA</b>	netretirani	6,0	0,0427	1,6984	0,992
	20UZ15	6,0	0,0352	1,7251	0,998
	20UZ30	6,0	0,0400	1,7005	0,986
	40UZ15	6,0	0,0599	1,6476	0,983
	40UZ30	5,0	0,1167	1,5358	0,999
	500UZ15	6,0	0,0418	1,7009	0,997
	500UZ30	6,0	0,0329	1,7356	0,999
<b>HP</b>	netretirani	8,0	0,3296	1,4351	0,998
	20UZ15	7,0	0,0440	1,7013	0,991
	20UZ30	7,0	0,0862	1,6043	0,998
	40UZ15	7,0	0,1465	1,5445	0,989
	40UZ30	8,0	0,1319	1,5636	0,994
	500UZ15	7,0	0,1129	1,5762	0,990
	500UZ30	8,0	0,1278	1,5681	0,999
<b>IP</b>	netretirani	7,0	0,0175	1,8333	0,991
	20UZ15	8,0	0,3869	1,3972	0,992
	20UZ30	7,0	0,1683	1,5082	0,991
	40UZ15	7,0	0,0781	1,6170	0,991
	40UZ30	7,0	0,0308	1,7504	0,994
	500UZ15	7,0	0,0174	1,8303	0,994
	500UZ30	7,0	0,0342	1,7389	0,991
<b>WPC</b>	netretirani	7,0	0,0369	1,7394	0,994
	20UZ15	8,0	0,0352	1,7251	0,998
	20UZ30	7,0	0,0597	1,6709	0,999
	40UZ15	7,0	0,1260	1,5489	0,991
	40UZ30	7,0	0,0604	1,6650	0,996
	500UZ15	8,0	0,1144	1,5892	0,999
	500UZ30	8,0	0,0632	1,6823	0,994

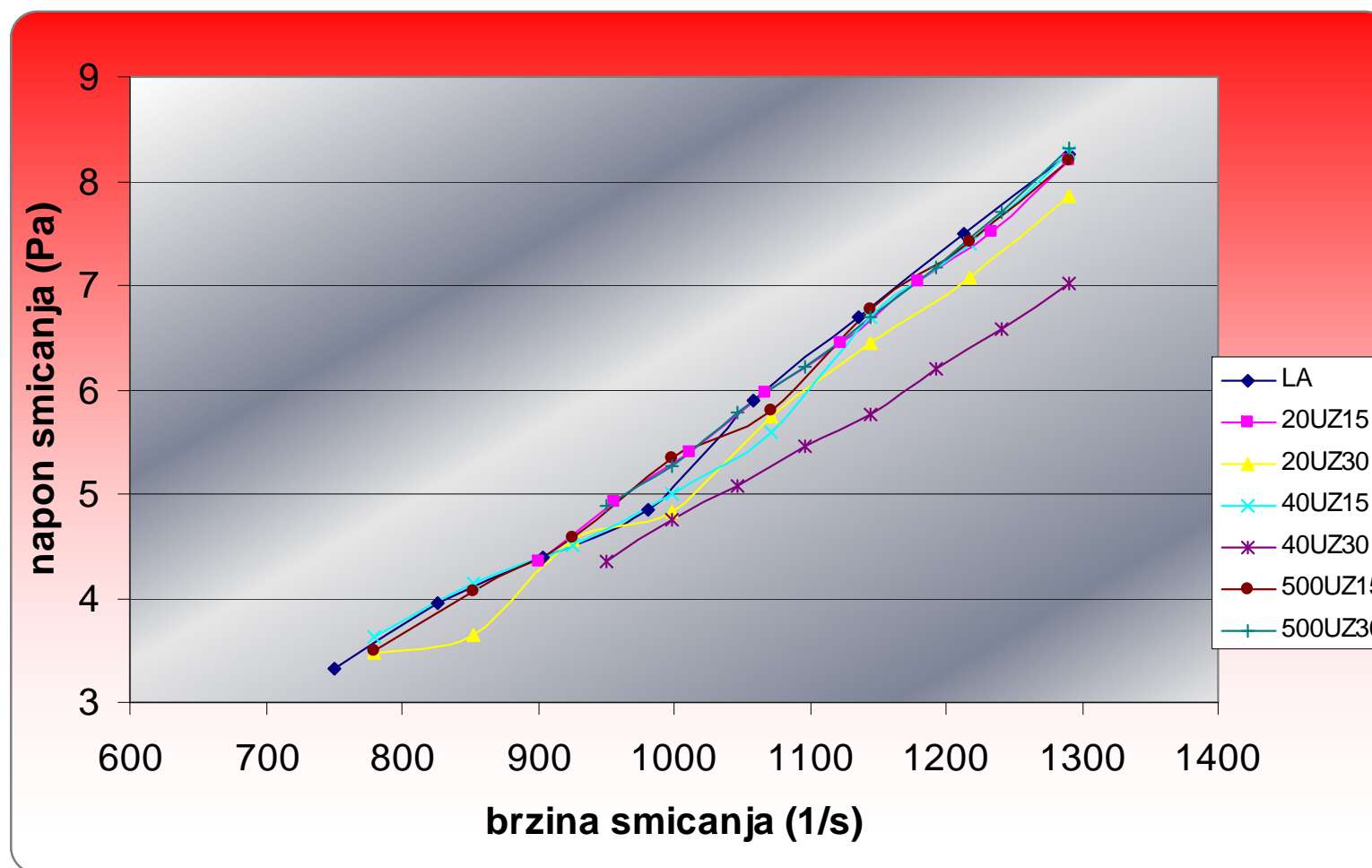


Slika 68. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija izolata proteina sirutke nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz

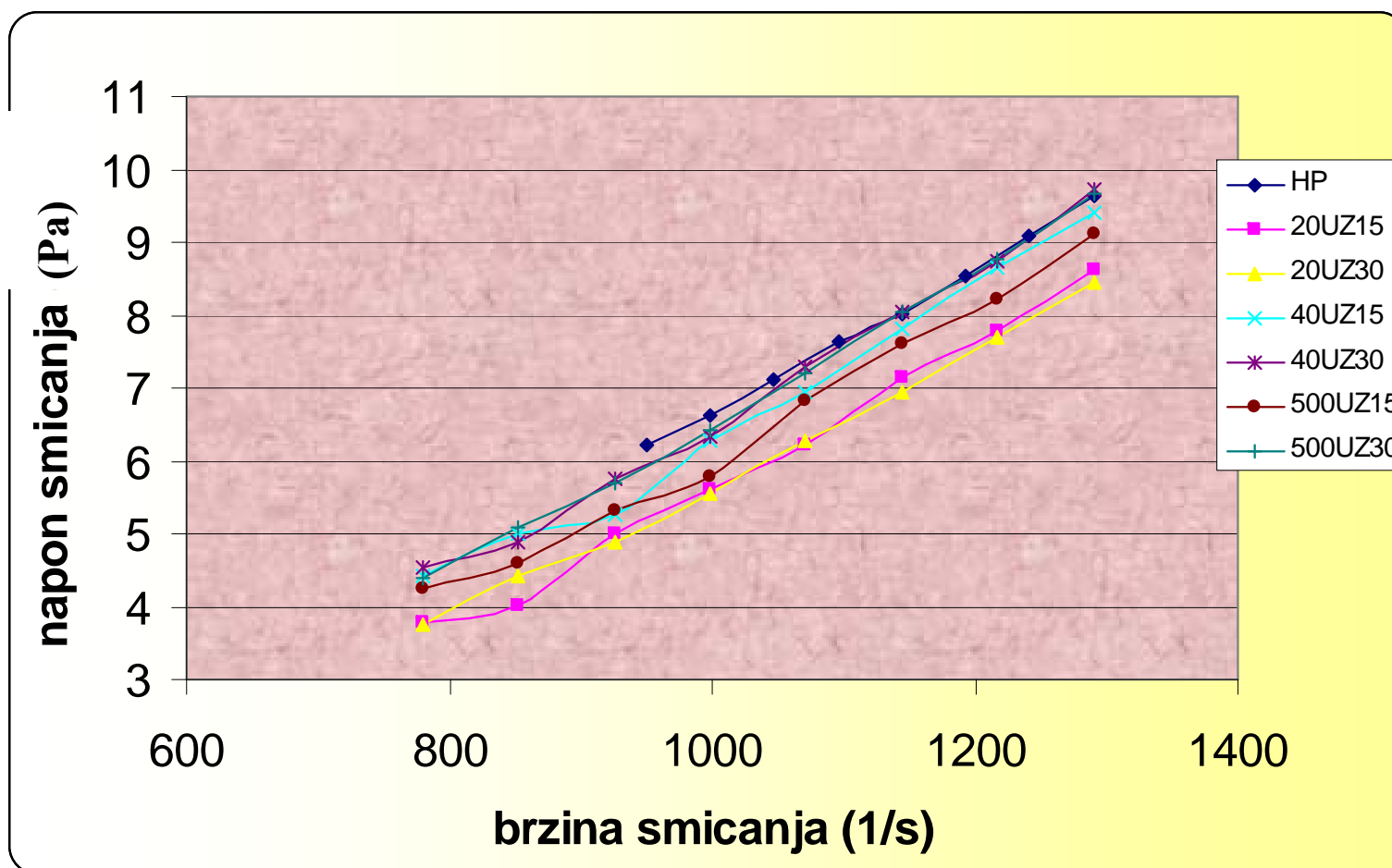


Slika 69. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija koncentrata proteina sirutke nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima 40 kHz i 500 kHz





Slika 70. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija  $\alpha$ -laktalbumina nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz



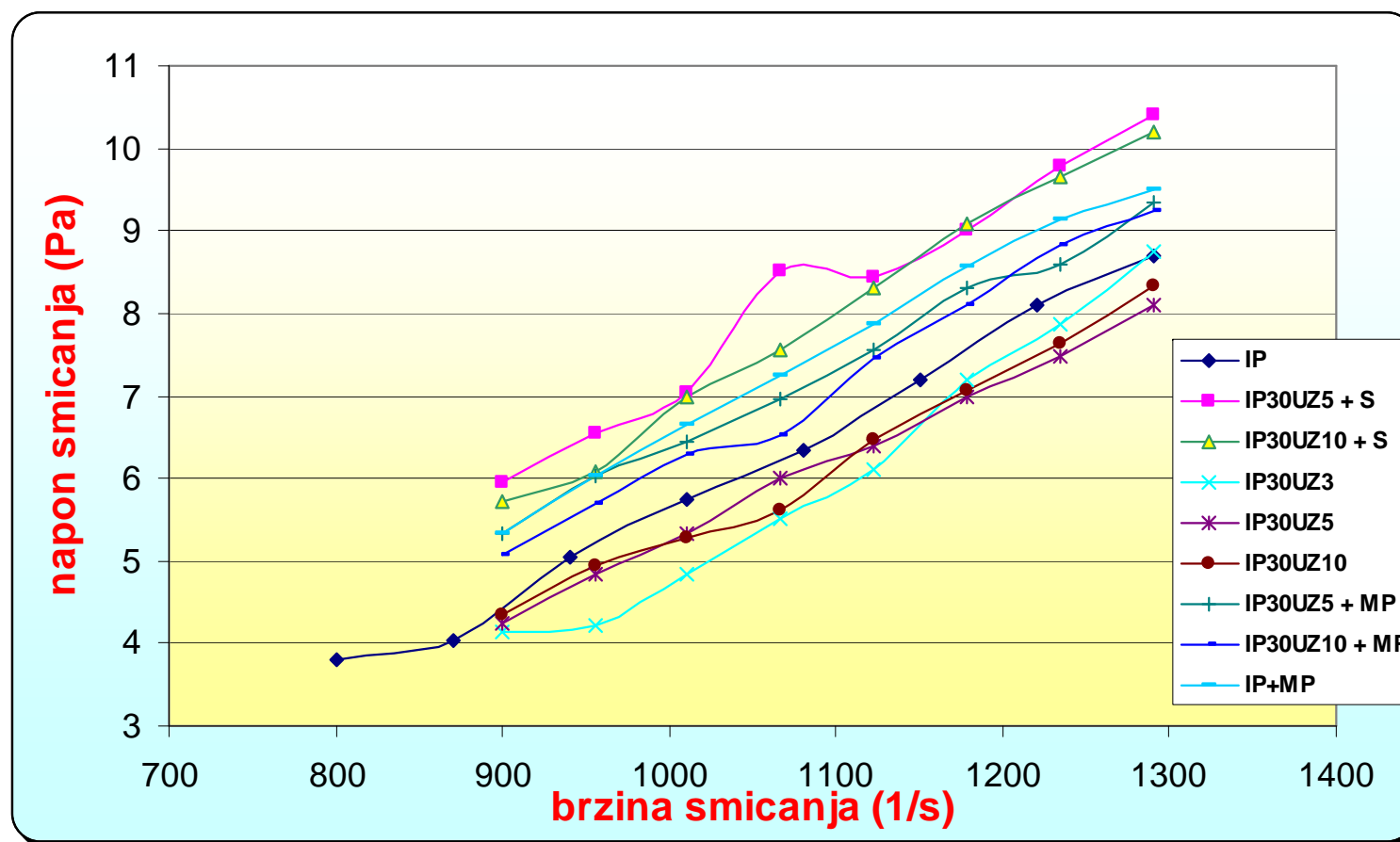
Slika 71. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija hidrolizata proteina sirutke nakon različitih tretmana ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz

Tablica 23. Reološke vrijednosti modelnih suspenzija prije i nakon različitih tretmana ultrazvukom od 30 kHz pripremljenih s izolatima proteina sirutke i dodacima

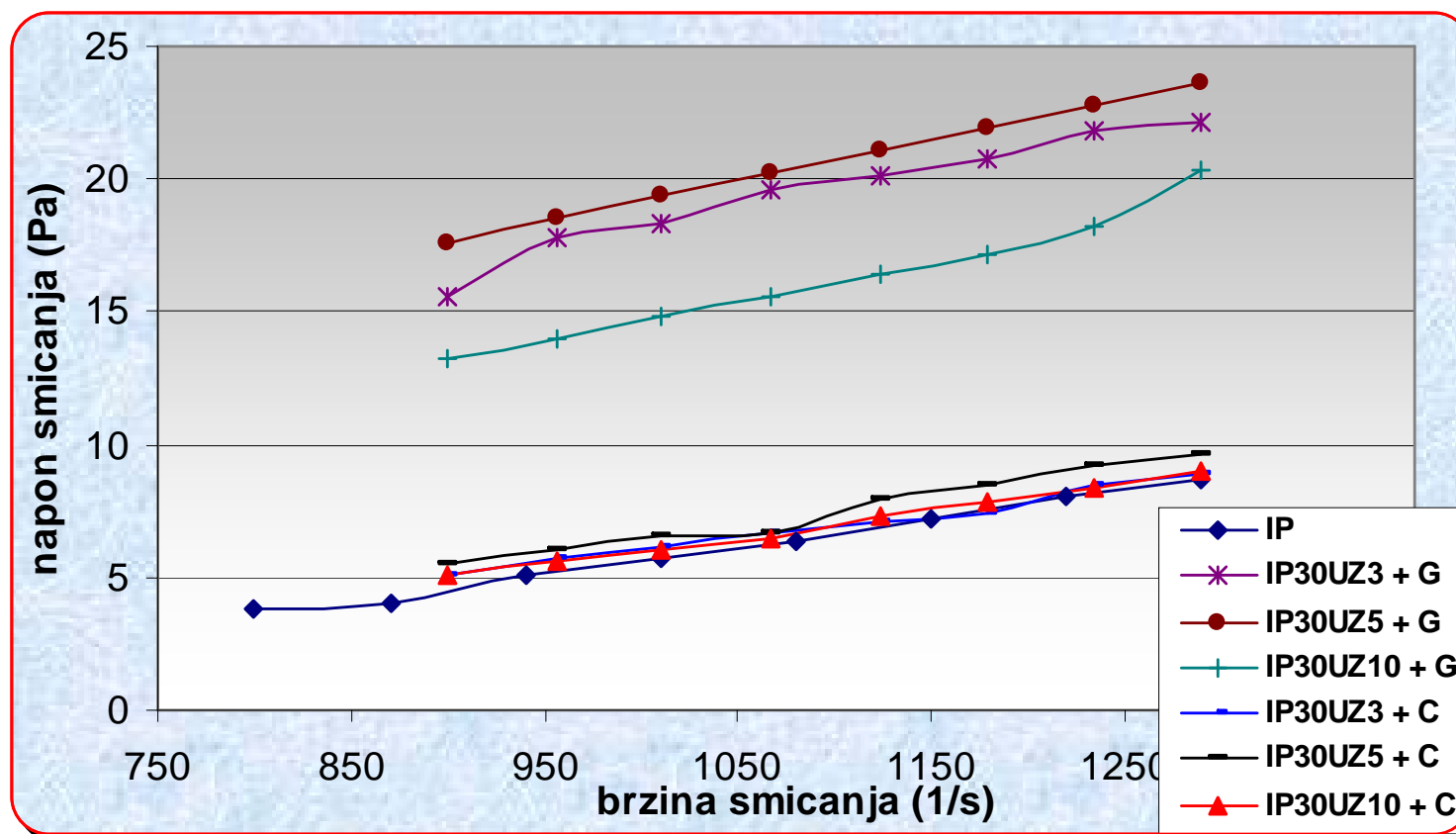
Tretman	Prividna viskoznost kod 1290 s <sup>-1</sup> (mPa s)	Koeficijent konzistencije <b>k</b> (mPa s <sup>n</sup> )	Indeks tečenja <b>n</b>	Koeficijent regresije <b>R<sup>2</sup></b>
IP	7,0	0,0175	1,8333	0,991
IP30UZ3	6,0	0,0009	2,2299	0,981
IP30UZ5	6,0	0,0265	1,7645	0,995
IP30UZ10	6,0	0,0203	1,7917	0,992
IP30UZ3 + G	17,0	34,87	0,9041	0,999
IP30UZ5 + G	18,0	69,51	0,8136	0,998
IP30UZ10 + G	16,0	6,69	1,1133	0,997
IP30UZ3 + C	7,0	0,1726	1,5142	0,995
IP30UZ5 + C	7,0	0,0876	1,6218	0,998
IP30UZ10 + C	7,0	0,0835	1,6179	0,991
IP + S	6,0	0,0198	1,8489	0,997
IP + MP	7,0	0,0904	1,6181	0,994
IP30UZ5+S	8,0	0,1613	1,5476	0,996
IP30UZ10+S	8,0	0,0631	1,6777	0,993
IP30UZ5+MP	7,0	0,1722	1,5220	0,995
IP30UZ10+MP	7,0	0,0525	1,6879	0,992

Tablica 24. Reološke vrijednosti modelnih suspenzija prije i nakon različitih tretmana ultrazvukom od 30 kHz pripremljenih s koncentratima proteina sirutke i dodacima

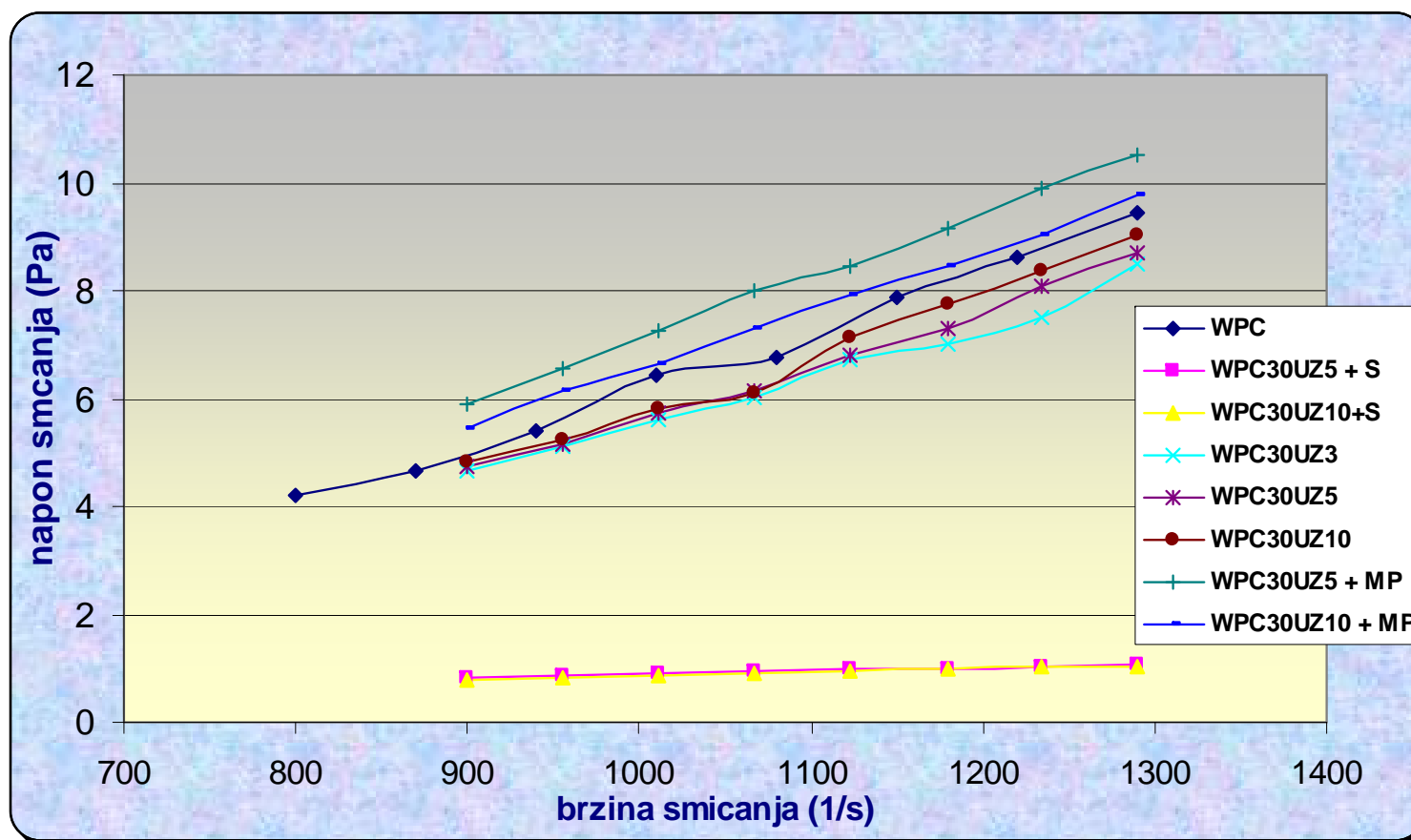
Tretman	Prividna viskoznost kod 1290 s <sup>-1</sup> (mPa s)	Koeficijent konzistencije <b>k</b> (mPa s <sup>n</sup> )	Indeks tečenja <b>n</b>	Koeficijent regresije <b>R<sup>2</sup></b>
WPC	7,0	0,0369	1,7394	0,994
WPC30UZ3	7,0	0,0793	1,6132	0,991
WPC30UZ5	7,0	0,0432	1,7039	0,993
WPC30UZ10	7,0	0,0254	1,784	0,995
WPC30UZ3 + G	15,0	2,56	1,125	0,995
WPC30UZ5 + G	16,0	31,0	0,9059	0,992
WPC30UZ10 + G	15,0	2,61	1,2311	0,993
WPC30UZ3 + C	7,0	0,0716	1,6401	0,994
WPC30UZ5 + C	7,0	0,0923	1,6131	0,995
WPC30UZ10 + C	7,0	0,0678	1,6476	0,998
WPC + S	6,0	0,0274	1,7731	0,998
WPC + MP	8,0	0,2178	1,5085	0,995
WPC30UZ5+S	9,0	0,2147	1,5202	0,997
WPC30UZ10+S	9,0	0,1184	1,5973	0,998
WPC30UZ5+MP	8,0	0,1169	1,5938	0,997
WPC30UZ10+MP	8,0	0,1171	1,5824	0,998



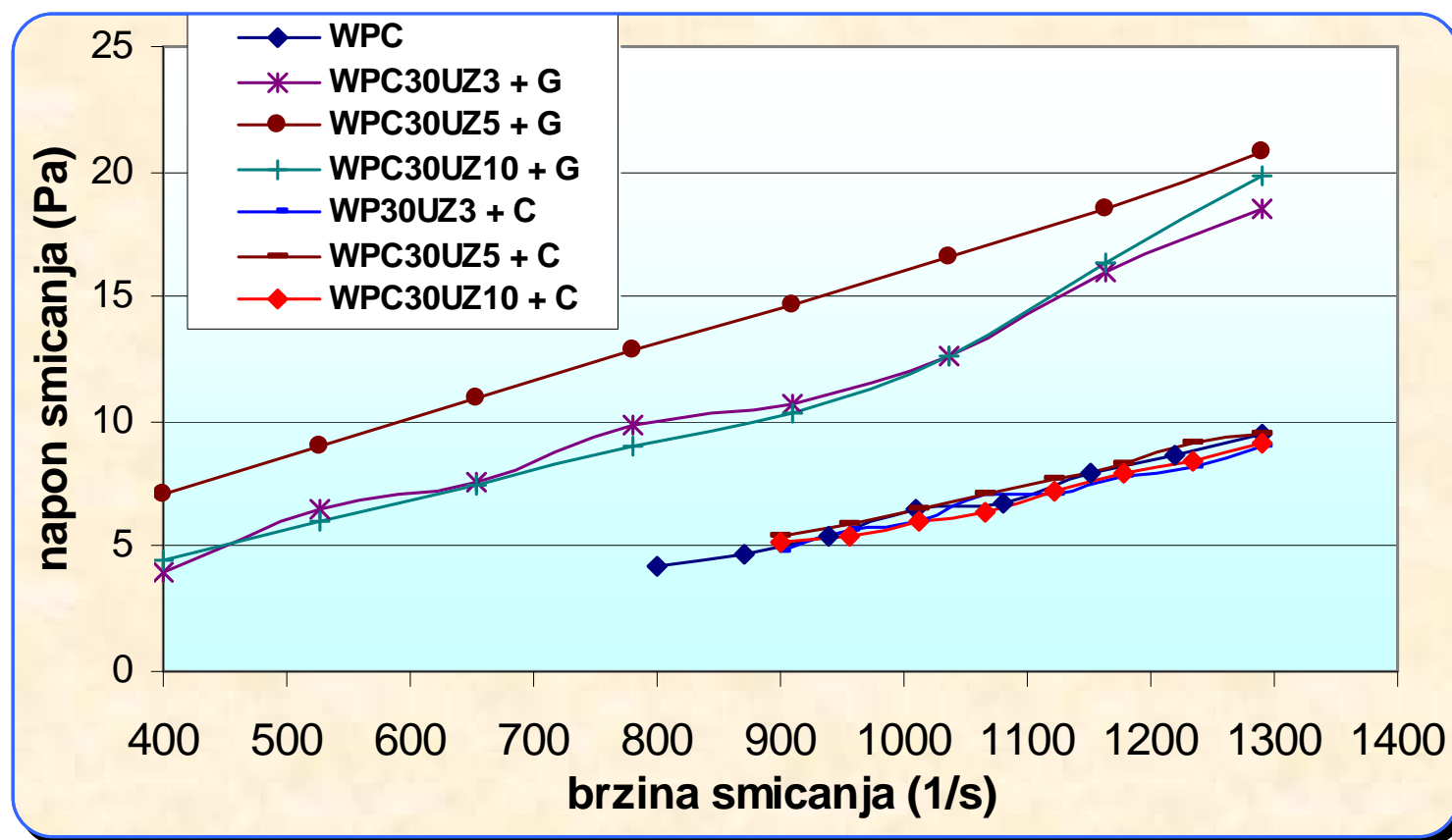
Slika 72. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija izolata proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodataka saharoze i mlijeka u prahu



Slika 73. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija izolata proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodatka guar gume i metil celuloze



Slika 74. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija koncentrata proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodatka saharoze i mlijeka u prahu



Slika 75. Ovisnost napona smicanja o brzini smicanja suspenzija koncentrata proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, te dodataka guar gume i metil celuloze



**Tablica 25. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija izolata proteina sirutke tretiranih ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
netretirani	-1,15	-5,22	-7,03	-2,04
20UZ15	-1,29	-5,39	-7,28	-2,23
20UZ30	-1,31	-5,41	-7,31	-2,25
40UZ15	-1,17	-5,32	-7,14	-2,11
40UZ30	-1,18	-5,30	-7,19	-2,13
500UZ15	-1,20	-5,29	-7,15	-2,13
500UZ30	-1,22	-5,33	-7,17	-2,16

**Tablica 26. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija koncentrata proteina sirutke tretiranih ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
netretirani	-1,21	-5,31	-6,87	-1,89
20UZ15	-1,33	-5,44	-6,98	-2,12
20UZ30	-1,32	-5,46	-6,99	-2,12
40UZ15	-1,24	-5,34	-7,11	-2,21
40UZ30	-1,25	-5,33	-7,05	-2,25
500UZ15	-1,27	-5,38	-6,93	-2,19
500UZ30	-1,27	-5,39	-6,95	-2,19

**Tablica 27. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija hidrolizata proteina sirutke tretiranih ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz.**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
netretirani	-1,87	-5,48	-6,83	-2,48
20UZ15	-2,09	-5,67	-7,22	-2,39
20UZ30	-2,14	-5,74	-7,25	-2,54
40UZ15	-1,92	-5,53	-6,87	-2,47
40UZ30	-1,94	-5,58	-6,90	-2,44
500UZ15	-1,95	-5,64	-6,99	-2,50
500UZ30	-1,96	-5,67	-7,01	-2,43

**Tablica 28. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija  $\alpha$ -laktalbumina tretiranih ultrazvukom od 20 kHz, i ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz.**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
netretirani	-1,18	-5,28	-6,91	-2,14
20UZ15	-1,32	-5,45	-7,13	-2,33
20UZ30	-1,37	-5,48	-7,16	-2,35
40UZ15	-1,22	-5,34	-7,00	-2,21
40UZ30	-1,21	-5,33	-7,02	-2,22
500UZ15	-1,19	-5,29	-6,95	-2,15
500UZ30	-1,20	-5,30	-6,97	-2,16

**Tablica 29. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija izolata proteina sirutke tretiranih ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
IP	-0,98	-4,2	-6,3	-1,09
IP30UZ3	-1,02	-4,25	-6,54	-1,17
IP30UZ5	-1,09	-4,59	-6,62	-1,12
IP30UZ10	-1,25	-5,15	-6,78	-1,23
IP30UZ3 + G	-1,54	-5,75	-7,47	-1,65
IP30UZ5 + G	-1,47	-5,69	-7,52	-1,59
IP30UZ10 + G	-1,61	-5,8	-7,54	-1,63
IP30UZ3 + C	-2,17	-6,21	-7,10	-1,69
IP30UZ5 + C	-2,25	-6,24	-7,13	-1,71
IP30UZ10 + C	-2,23	-6,27	-7,17	-1,70
IP + S	-1,30	-6,34	-7,03	-1,36
IP + MP	-1,69	-6,63	-7,46	-1,59
IP30UZ5+S	-1,38	-6,43	-7,15	-1,39
IP30UZ10+S	-1,42	-6,57	-7,21	-1,43
IP30UZ5+MP	-1,73	-6,74	-7,63	-1,73
IP30UZ10+MP	-1,77	-6,83	-7,71	-1,75

**Tablica 30. Temperature smrzavanja i odmrzavanja suspenzija koncentrata protein sirutke tretiranih ultrazvukom od 30 kHz, te dodacima guara, metil celuloze, saharoze i mlijeka u prahu**

Tretman	Početak smrzavanja (°C)	Vrh krivulje smrzavanja (°C)	Početak odmrzavanja (°C)	Vrh krivulje odmrzavanja (°C)
WPC	-1,18	-4,53	-6,13	-1,31
WPC30UZ3	-1,2	-4,55	-6,17	-1,33
WPC30UZ5	-1,19	-4,54	-6,15	-1,37
WPC30UZ10	-1,22	-4,57	-6,16	-1,38
WPC30UZ3 + G	-2,01	-5,51	-7,42	-1,57
WPC30UZ5 + G	-2,03	-5,48	-7,53	-1,6
WPC30UZ10 + G	-2,10	-5,52	-7,61	-1,62
WPC30UZ3 + C	-2,38	-6,10	-7,13	-1,87
WPC30UZ5 + C	-2,37	-6,12	-7,15	-1,90
WPC30UZ10 + C	-2,40	-6,18	-7,17	-1,91
WPC + S	-1,21	-6,28	-7,05	-2,09
WPC + MP	-1,62	-6,46	-7,24	-1,92
WPC30UZ5+S	-1,25	-6,37	-7,15	-2,12
WPC30UZ10+S	-1,22	-6,40	-7,12	-2,18
WPC30UZ5+MP	-1,78	-6,67	-7,33	-2,0
WPC30UZ10+MP	-1,80	-6,71	-7,37	-2,02

## **5. RASPRAVA**

Proteini sirutke koriste se u velikoj mjeri kao dodaci prehranbenim proizvodima zbog svojih jedinstvenih funkcionalnih svojstava koji uključuju emulgiranje, želiranje, ugušćivanje, pjenjenje, te kapacitet vezanja masti i aroma. Proteini sirutke dodaju se u proizvode u obliku izolata proteina sirutke i koncentrata proteina sirutke. Isto tako koriste se i zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i GRAS statusa (generaly recognized as safe). Hidrolizati proteina sirutke zbog svojeg nisko alergnog statusa i  $\alpha$ -laktalbumin (sudjeluje u sintezi laktoze i koristan je za razvoj moždanih stanica) koriste se u proizvodnje hrane za djecu. Molekularne promjene koje se dešavaju tijekom proizvodnje hidrolizata proteina sirutke, mogu rezultirati njihovim promijenjenim tehno-funkcionalnim ponašanjem u usporedbi s intaktnim proteinima kao što su promjene topljivosti, viskoznosti, senzorskih značajki i značajki pjenjenja.

### **5.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA RASPODJELU VELIČINE ČESTICA**

Fizičke i strukturne značajke proteina mogu se ponekad promijeniti mehaničkim putem. Visoki tlak i ultrazvučne vibracije uzrokuju djelomičnu denaturaciju koja značajno utječe na fizičke i strukturne značajke proteina. Prethodna istraživanja pokazala su da ultrazvuk, osim razaranja aglomerata koji se mogu stvoriti, može isto tako značajno promijeniti strukturne značajke proteina sirutke (Bryant i McClements, 1998; Apenten i sur., 2000). Neposredno prije određivanja osnovnih funkcionalnih svojstava proteinima je određena raspodjela veličine čestica u svrhu utvrđivanja razlike veličine čestica, te postojanja eventualnih aglomerata koji bi u daljnjem ispitivanju značajno utjecali na njihova funkcionalna svojstva, prije svega na topljivost.

Dobiveni rezultati (tablice 11-14) pokazuju da je nakon tretiranja ultrazvučnom sondom od 20 kHz ultrazvuk uzrokovao smanjenje veličine čestica, suzio njihovu raspodjelu, te značajno povećao specifičnu slobodnu površinu ( $p < 0,05$ ) kod svih uzoraka proteina osim kod hidrolizata proteina sirutke (tablica 14). Tretiranjem ultrazvučnom kupelji od 40 kHz došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) smanjenja veličine čestica, ali ne u tolikoj mjeri kao tretmanom sondom. Tretiranje s ultrazvučnom kupelji od 500 kHz nije pokazalo značajan utjecaj na raspodjelu veličina čestica modelnih uzoraka proteina. Nije primijećen utjecaj ultrazvuka na raspodjelu veličina čestica hidrolizata proteina sirutke.

Karakteristične krivulje raspodjela veličina čestica pokazani su za uzorke izolata i koncentrata proteina sirutke te su prikazani na slikama 33-38. Na slici 33 vidi se raspodjela



veličina čestica netretiranih i tretiranih **izolata proteina sirutke** nakon tretmana sondom od 20 kHz. Učinkovitiji je tretman sondom od 20 kHz kroz 15 minuta za uzorke izolata proteina sirutke (slika 33) i  $\alpha$ -laktalbumina (tablica 13), dok je kod koncentrata proteina sirutke (slika 36) učinkovitiji tretman sondom od 20 kHz kroz 30 min. Kod koncentrata proteina sirutke primarno je došlo do redukcije masnih globula kao posljedice ultrazvučnih učinaka, kao što je to uočeno u studiji (Villamiel i de Jong, 2000b). Ultrazvučno inducirane strukturne promjene na proteinima povezane su sa djelomičnim cijepanjem intermolekulranih hidrofobnih interakcija, prije nego peptidnih ili disulfidnih veza. Kada se čestice podvrgnu smičnom naprezanju, povećava se brzina agregacije kako se povećava brzina sudara, a neki agregati se raspadnu djelovanjem smičnog naprezanja. Kako se ultrazvučni tretman produljuje, veličina čestica se smanjuje, a raspodjela veličine čestica se suzuje. Za svaki intenzitet postoji limit veličine i koncentracije disperzne faze. Sonifikacija ne djeluje na površinski naboj, nego stvara nove površine i reducira veličinu čestica. Smanjenjem veličine čestica povećava se slobodna površina materijala. U ovom slučaju, čestice su smanjene zbog sila kavitacije. To uključuje, razaranje aglomerata i agregata. Ultrazvučna kavitacija je vrlo učinkovita u razaranju aglomerata, agregata, te čak i manjih čestica, kidajući van der Waals-ove sile.

Tretiranjem ultrazvučnom kupelji od 40 kHz došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) smanjenja veličine čestica, ali ne u tolikoj mjeri kao tretmanom sondom. Kod ovih tretmana prevladava više učinak turbulencije i smičnih naprezanja, nego kavitacije. Veća je površina koja je izvor mehaničkih vibracije, ali nisu jako visokog intenziteta kao kod djelovanja direktno uronjene sonde. Najučinkovitiji je tretman tijekom 30 minuta kod uzoraka koncentrata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina. Kod izolata proteina sirutke je došlo do djelomične agregacije nakon tretmana s ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 min (slika 34). Kod koncentrata proteina sirutke došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) smanjenja veličina čestica djelovanjem ultrazvučne kupelji od 40 kHz kroz 15 i 30 min (slika 37). Nije primijećen utjecaj ultrazvučne kupelji od 40 kHz na hidrolizate proteina sirutke (slika 40). Hidrolizat proteina sirutke ima značajno manju veličinu čestica u usporedbi s ostalim proteinskim proizvodima (tablica 14). Ova razlika je posljedica samog postupka enzimatske hidrolize koja uzrokuje cijepanje peptidnih veza. Proizvodnjom hidrolizata proteina sirutke provodi se enzimaska hidroliza pri čemu dolazi do cijepanja peptidnih veza proteina zbog čega nastaju i značajne promjene u konformaciji proteinske globule. Ovisno o vrsti upotrijebljenog enzima, te uvjeta u kojima se provodi hidroliza, nastaju kraći peptidni lanci i različiti fragmenti aminokiselina. Tako dobiveni hidrolizat proteina sirutke u konačnici ima modificiranu nutritivnu vrijednost, odnosno fizikalna i funkcionalna svojstva u odnosu na ostale pripravke proteina sirutke. Budući da je

raspodjela veličine čestica pokazala da postoji značajna razlika u veličini čestica nakon enzimske hidrolize proteina sirutke, za očekivati je da modifikacije strukture proteina te djelomično odmotana polipeptidna struktura hidrolizata proteina sirutke ima i značajno drugačija funkcionalna svojstva od ostalih proteinskih pripravaka (Messens i sur., 1997). Svi postupci koji uzrokuju denaturaciju proteina predstavljaju kompleksan fenomen čiji intenzitet ovisi o strukturi proteina, upotrijebljenom enzimu, temperaturi, pH, ionskoj jakosti i uvjetima tretiranja (Masson, 1992). Kod uzoraka  $\alpha$ -laktalbumina (slika 43) došlo je do djelomičnog sužavanja raspodjele veličina čestica nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz.

Tretiranje s ultrazvučnom kupelji od 500 kHz nije pokazalo značajan utjecaj na modelne uzorke proteina (tablice 11-14). Međutim, došlo je do povećanja slobodne površine kod koncentrata proteina sirutke (slika 38) što se može objasniti činjenicom da je došlo do mehaničkog cijepanja prisutnih nakupina masti i laktoze, te da je to utjecalo na smanjenje veličina čestica za razliku od drugih pripravaka gdje većinu čine proteini. Ultrazvuk nedovoljno visokog intenziteta, uzrokuje akustična trenja i turbulencije, jer se ne stvara dovoljno jak negativan tlak da bi došlo do implozije mjehurića odnosno kavitacije. Samim time djeluje na površine materijala koji je podvrgnut tretiranju. Zbog jako malih razina snage, ultrazvuk niskog intenziteta ne uzrokuje fizičke i kemijske promjene u svojstvima materijala kroz koji val prolazi.

## 5.2. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA MOLEKULARNE MASE TRETIRANIH PROTEINSKIH FRAKCIJA

Gel elektroforeza je najčešće korištena elektroforetska tehnika. Gelovi koji se koriste u ovim separacijama, poliakrilamid i agaroz, čine trodimenzionalnu umreženu strukturu s veličinom pora molekularnih dimenzija koje je moguće definirati. Razdjeljivanje molekula u ovim gelovima vrši se na osnovu elektroforetske pokretljivosti i veličine molekula (molekularne mase). Molekule putuju kroz gel određenom brzinom definiranom njihovom pokretljivošću prema suprotno nabijenoj elektrodi, najčešće anodi, pronalazeći si put kroz trodimenzionalnu mrežu određenih veličina pora, ali u tom kretanju nailaze na otpor okolnog medija (gela) s obzirom na svoju veličinu, tako da veće molekule putuju relativno sporije od manjih. Proteini se najčešće razdvajaju elektroforezom na temelju mase, u poliakrilamidnom gelu, u denaturirajućim uvjetima. Tretirajući mješavinu proteina otopinom koja sadrži natrijev dodecil sulfat (SDS) dolazi do denaturacije. SDS je anionski detergent koji ometa gotovo sve nekovalentne interakcije u nativnom proteinu. Anioni SDS se vežu na glavni lanac u omjeru otprilike jedan anion SDS na svake dvije amino kiselinske podjedinice. Ovaj kompleks SDS-a sa denaturiranim proteinom ima veliki negativni naboj, koji je u grubo proporcionalan masi proteina. Negativan naboj koji je nastao vezivanjem SDS-a je u pravilu puno veći od naboja koji nosi nativni protein, pa taj naboj nativnog proteina postaje zanemariv. Kompleks SDS-protein se zatim podvrgne elektroforezi. Kada je elektroforeza gotova, proteine u gelu je moguće vizualizirati bojanjem sa srebrom ili bojom poput Coomassie blue. Radioaktivno obilježene proteine moguće je detektirati autoradiografski. Maleni proteini se gibaju brže kroz gel, dok veliki proteini ostaju pri vrhu, u blizini mjesta nanošenja uzorka.

Kod svih gelova dobivena je krivulja u programu ImageJ koja je dobivena prema intenzitetu piksela proteinske vrpce. Udio pojedinih komponenti dobiven je iz intenziteta piksela proteinske vrpce koji je prikazan površinom ispod pika.

Iz prikazanih gelova netretiranih proteina sirutke (slike 39-42) mogu se jasno vidjeti proteinske vrpce pripadajućih proteinskih frakcija. Iz standarda Anamed, dobivena je krivulja koja pokazuje udjel pojedinog standarda tj. proteina određene molekularne mase. Slike 39 i 46 prikazuju gel i krivulju netretiranih izolata proteina sirutke. Udio molekularne mase od 14 200 Da, odgovara udjelu od 23,4 %, te to odgovara molekuli  $\alpha$ -laktalbumina. Zatim, udio mol. mase od 18 300 Da, udio je 45,8 %, i odgovara  $\beta$ -laktoglobulinu. Ostatak, odgovara mol. masama od 5590 Da, sa udjelom od 5,6 %; 66 400 Da, sa udjelom od 6,4 %, te to odgovara

molekuli serum albumina (BSA); zatim mol. masa 92642 Da, sa udjelom od 8,1 % i 166425 Da, sa udjelom od 10,5 %. Ovo zadnje se odnosi uglavnom na imunoglobuline sa molnim masama većim od 100 kDa. Vidljiva je i prisutnost trimera i tetramera proteina sirutke mol. mase >60 kDa. Slika 40 prikazuje gel netretiranih koncentrata proteina sirutke. Pripadajuće proteinske vrpce prikazane su prema intenzitetu piksela kao krivulja (slika 49). Udio molekularne mase od 14 200 Da, odgovara udjelu od 16,4 %, te to odgovara molekuli  $\alpha$ -laktalbumina. Zatim, udio mol. mase od 18 300 Da, udio je 24,2 %, i odgovara  $\beta$ -laktoglobulinu. Ostatak, odgovara mol. masama od 5647 Da, sa udjelom od 11,3 %; 20980 Da, sa udjelom od 19,8 %; 42138 Da, sa udjelom od 14,3 %, 66 400 Da, sa udjelom od 5,4 %; te to odgovara molekuli serum albumina (BSA) i 118054 Da, sa udjelom od 5,8 %. Ovo zadnje se odnosi uglavnom na imunoglobuline sa molnim masama većim od 100 kDa. Slika 41 prikazuje gel netretiranog  $\alpha$ -laktalbumina. Pripadajuće proteinske vrpce prikazane su prema intenzitetu kao krivulja (slika 51). Iz gela i iz krivulje se vidi da proteinski pripravak  $\alpha$ -laktalbumina nije čisti tako da se primjećuju i druge proteinske vrpce. Udio molekularne mase od 14 200 Da, odgovara udjelu od 52,1 %, te to odgovara molekuli  $\alpha$ -laktalbumina. Zatim, udio mol. mase od 18 300 Da, udio je 16 %, i odgovara  $\beta$ -laktoglobulinu. Ostatak, odgovara mol. masama od 55348 Da, sa udjelom od 9,2 % i 197600 Da, sa udjelom od 5,1 %. Ovo zadnje se odnosi uglavnom na imunoglobuline sa molnim masama većim od 100 kDa. Slika 48 prikazuje gel netretiranih hidrolizata proteina sirutke. Pripadajuće proteinske vrpce prikazane su prema intenzitetu kao krivulja (slika 54). Udio molekularne mase manje od 14 000 Da gotovo 70 %, te je to udio mol. mase od oko 8000 Da. Ostatak, odgovara mol. masama od 10997 Da, sa udjelom od 18,2 % i 78026 Da, sa udjelom od 13,7 %.

Slike 43-45 prikazuju gelove proteina sirutke nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz i 40 kHz. Prikazane su proteinske vrpce standarda Anamed i BioLabs. Nisu prikazani gelovi tretiranih pripravaka proteina sirutke nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 500 kHz, jer nije došlo do preliminarnih promjena nakon ispitivanja veličine čestica i funkcionalnih značajki uzoraka. Nakon tretmana sondom od 20 kHz došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) smanjenja molekularne mase i frakcioniranja proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Duži tretman ne pokazuje i veće cijepanje proteinskih lanaca. Tretmanom ultrazvučnom kupelji od 40 kHz isto tako je došlo do značajne ( $p < 0,05$ ) promjene u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija i to u većoj mjeri kod svih uzoraka nego kod tretmana sondom. Učinkovitiji je tretman kroz 15 minuta. Duži tretman ne pokazuje i veće cijepanje proteinskih lanaca, osim kod uzoraka koncentrata proteina sirutke gdje je taj tretman

učinkovitiji čak i od tretmana sondom od 20 kHz. Produženi tretman ultrazvučnom kupelji od 40 kHz ima kod izolata proteina sirutke djelovanje koje potiče stvaranje agregata molekula.

Slika 47 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranih **izolata proteina sirutke** ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 15 (20UZ15) i 30 (20UZ30) minuta. U odnosu na netretirani izolat proteina sirutke došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija.

Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 15 min je slijedeći: mol.masa od 5156 Da, odgovara udjelu od 17 %, udio mol. mase od 6981 Da, udio je 41,5 %, mol. masa od 29351 Da, sa udjelom od 20,4 % , mol. masa 72243 Da, odgovara udjelu od 9,4 %, te mol.masa 176822 Da, sa udjelom od 11,6 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena i pomaka ka području od oko 7000 Da. Proteinski lanci srednjih mol. masa u rasponu od 14 000 – 70000 Da najviše su bili izloženi djelovanju ultrazvuka. To se može objasniti i činjenicom, da su ti lanci dostupniji i lakše dolazi do njihovog cijepanja. Problem je cijepanja većih lanaca, jer ultrazvučno cijepanje molekula, kao i hidrokoloida kreće iz centra molekule (Grönroos, 2004; Grönroos, 2008). Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 30 min je slijedeći: mol.masa od 5590 Da, odgovara udjelu od 26,7 %, udio mol. mase od 7723 Da, udio je 45,1 %, mol. masa od 31123 Da, sa udjelom od 9,7 %, mol. masa 72242 Da, odgovara udjelu od 5,2 %, te mol.masa 173286 Da, sa udjelom od 3,7 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena i pomaka ka području od oko 8000 Da. Međutim, ovdje se vidi da je duži tretman ultrazvukom uzrokovao i veće cijepanje većih lanaca, tj. lanaca većih molekularnih masa gdje je njihov udio smanjen na cca. 9 %.

Slika 48 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranih izolata proteina sirutke ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 (40UZ15) i 30 (40UZ30) minuta. U odnosu na netretirani izolat proteina sirutke došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 min je slijedeći: mol.masa od 4661 Da, odgovara udjelu od 87,6 %, dok je udio mol. mase od cca. 66000 Da oko 11,3 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena, čak i u odnosu na tretman sondom puno jačeg intenziteta i veće snage. Došlo je do pomaka ka skroz malim mol. masama proteinskih frakcija od oko 5000 Da. Ultrazvučna kupelj od 40 kHz ima veću frekvenciju, ali manju snagu. Kod ovih tretmana prevladava više učinak turbulencije i smičnih naprezanja unutar tekućeg medija, te je došlo do većih sudara molekula pri čemu je došlo do većih cijepanja. Isto tako ovdje je prisutno 40000 ciklusa u širenju vala, dok je kod sonde to 20000, što je i definicija frekvencije. Samim time više je okretaja i ciklusa, koji uzrokuje smična naprezana i sudare u mediju. Ovdje je primijećena i skoro potpuna redukcija

proteinskih frakcija većih mol. masa, te je došlo do skoro ujednačene raspodjele. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 min je slijedeći: mol.masa od 3886 Da, odgovara udjelu od 25,2 %, udio mol. mase od 5156 Da, udio je 41,4 %, mol. masa od 22528 Da, sa udjelom od 14,3 %, mol. masa 62480 Da, odgovara udjelu od 6,1 %, te mol.masa 150437 Da, sa udjelom od 2,4 %. Ovdje nije došlo do tolikog cijepanja proteinskih lanaca na molekule manjih mol. masa. Produženi tretman ultrazvukom može imati i djelovanje koje potiče stvaranje agregata molekula (Mason, 1996). Moguće da je došlo do povezivanja ostataka aminokiselina intermolekularnim interakcijama, kao što su vodikove veze, -SH slobodnim grupama, protein-protein interakcijama novostvorenih grupa koje su uslijed djelovanja ultrazvuka došle na površinu. Vidi se i da je došlo najviše do promjena i pomaka ka području od oko 5000 Da.

Slika 50 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranih **koncentrata proteina sirutke** ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 15 (20UZ15) i 30 (20UZ30) minuta, te ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 minuta. U odnosu na netretirani koncentrat proteina sirutke došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 15 min je slijedeći: mol.masa od 6504 Da, odgovara udjelu od 34,5 %, udio mol. mase od 10562 Da, udio je 62,1 %, mol. masa od 84592 Da, sa udjelom od 2,9 %, te mol.masa 173286 Da, sa udjelom od 3,3 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena i pomaka ka području od oko 10000 Da, što nije tako velik pomak prema manjim mol. masama kao kod izolata proteina sirutke. To se objašnjava različitim sastavom proteinskih prahova, gdje su kod koncentrata proteina sirutke prisutne i masti i disaharidi koji pokazuju određeni zaštitni učinak na molekule proteina kao i prilikom djelovanja visokog tlaka (Dumay, 1994). Međutim, vidljivo je bolje cijepanje proteinskih frakcija velikih mol. masa na cca. 7 % što nije bio slučaj kod izolata proteina sirutke. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 30 min je slijedeći: mol.masa od 8630 Da, odgovara udjelu od 29,5 %, udio mol. mase od 13459 Da, udio je 59,1 %, mol. masa od 88974 Da, sa udjelom od 2,9 %, te mol.masa 171545 Da, sa udjelom od 2,8 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena i pomaka ka području od oko 13000 Da. Ovdje se vidi da duži tretman ultrazvukom nije uzrokovao i veće cijepanje lanaca nego je sličan tretmanu od 15 minuta. Slika 50 prikazuje i pripadajuće proteinske vrpce tretiranih koncentrata proteina sirutke ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 (40UZ30) minuta. U odnosu na netretirani koncentrat proteina sirutke došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 min je slijedeći: mol.masa od 4522 Da, odgovara

udjelu od 20,3 %, udio mol. mase od 6841 Da je 69,7 %, udio mol. mase od 71246 Da je 3,2 %, dok je udio mol. mase od 163097 Da, 4 %. Vidi se da je došlo najviše do promjena, čak i u odnosu na tretman sondom puno jačeg intenziteta i veće snage. Došlo je do pomaka prema vrlo malim mol. masama proteinskih frakcija od oko 7000 Da udjela gotovo 70 %. Ultrazvučna kupelj od 40 kHz ima veću frekvenciju, ali manju snagu. Kod ovih tretmana prevladava više učinak turbulencije i smičnih naprezanja unutar tekućeg medija, te je došlo do većih sudara molekula pri čemu je došlo do većih cijepanja.

Mehanizam kojim se odvija degradacija makromolekula ultrazvukom, nije još dovoljno razjašnjen. Međutim smatra se da hidrodinamičke sile imaju primarnu važnost. Hidrodinamičke sile proizlaze kao rezultat povećanih sila trenja između ultrazvučno ubrzanih molekula otapala i većih manje mobilnijih, makromolekula (Grönroos, 2004; Grönroos, 2008). Hidrodinamičke sile mogu nastati i zbog visokog tlaka koji je povezan sa kolapsom kavitacijskih mjehurića.

Slika 52 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranog  **$\alpha$ -laktalbumina** ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 15 (20UZ15), a slika 53 tretman sondom kroz 30 (20UZ30) minuta. U odnosu na netretirani  $\alpha$ -laktalbumin došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 15 min je sljedeći: mol.masa od 6637 Da, odgovara udjelu od 58,8 %, udio mol. mase od 9742 Da, udio je 25,8 %, mol. masa od 16978 Da, sa udjelom od 11,6 % , mol. masa 35133 Da, odgovara udjelu od 2,7 %, te mol.masa 82068 Da, sa udjelom od 1 %. Vidi se da je došlo do promjena u mol. masama, međutim pomak nije kompletno prema nekoj određenoj mol. masi nego je rašireniji. Ipak, vidi se da je najveće smanjenje došlo do mol. mase od oko 7000 Da. U tom uzorku bilo je prisutnih još i drugih proteinskih frakcija osim  $\alpha$ -laktalbumina, došlo i do cijepanja većih lanaca. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 30 min je sljedeći: mol.masa od 4213 Da, odgovara udjelu od 73,1 %, udio mol. mase od oko 11000 Da, udio je 21,9 %, dok je mol.masa od oko 76000 Da udjela od 1 %. Došlo je do većih i uniformnijih promjena ka području od oko 4500 Da, zbog duljeg vremena tretiranja.

Slika 53 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranog uzorka  $\alpha$ -laktalbumina ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 (40UZ15) i 30 (40UZ30) minuta. U odnosu na netretirani  $\alpha$ -laktalbumin došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija i to u približno sličnom učinku kao i kod tretmana sondom od 30 minuta. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 min je sljedeći: mol.masa od 3925 Da, odgovara udjelu od 69,1 %, udio mol. mase od 10887 Da je

28,1 %, dok je udio mol. mase od 71246 Da, 2,8 %. Došlo je do pomaka ka skroz malim mol. masama proteinskih frakcija od oko 4000 Da. Ultrazvučna kupelj od 40 kHz ima veću frekvenciju, ali manju snagu. Kod ovih tretmana prevladava više učinak turbulencije i smičnih naprezanja unutar tekućeg medija, kao i u prethodno objašnjenim pojavama koje se dešavaju prilikom tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz. Dolazi do više okretaja i ciklusa zvučnog vala, koji uzrokuje smična naprezana i sudare molekula u mediju. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 min je sljedeći: mol.masa od 3732 Da, odgovara udjelu od 68,1 %, udio mol. mase od 10456 Da, udio je 27,8 %, te mol.masa 69120 Da, sa udjelom od 3,9 %. Kod tretiranja uzoraka  $\alpha$ -laktalbumin nije primijećeno stvaranje agregata proteina.

Slika 54 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranih **hidrolizata proteina sirutke** ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 15 (20UZ15) minuta. Slika 55 prikazuje utjecaj tretmana sondom kroz 30 (20UZ30) minuta i utjecaj tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 minuta (40UZ30). Udio pojedinih komponenti dobiven je iz intenziteta piksela proteinske vrpce koji je prikazan površinom ispod pika. U odnosu na netretirani uzorak nije došlo do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Hidrolizati su proteini male molekularne mase. Kod djelovanja ultrazvukom nastaju i slobodni radikali koji mogu stupati u reakcije polimerizacije, te se htjela utvrditi moguća polimerizacija hidrolizata zbog nastalih slobodnih radikala (Mason, 1996). Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 15 min je sljedeći: mol.masa od 4788 Da, odgovara udjelu od 89,8 %, udio mol. mase od oko 18000 Da, udio je 7,2 %, te mol.masa od oko 88080 Da, sa udjelom od 2,8 %. Udio molekularnih masa nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz kroz 30 min (slika 61) je sljedeći: mol.masa od 2207 Da, odgovara udjelu od 52,5 %, dok je mol.masa od oko 3300 Da udjela od 47,4 %. Vidi se da je došlo do manjih promjena ka području od oko 3000 Da, zbog duljeg vremena tretiranja, međutim nije došlo do moguće očekivane polimerizacije uslijed nastanka slobodnih radikala.

Slika 55 prikazuje pripadajuće proteinske vrpce tretiranih hidrolizata proteina sirutke ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 30 (40UZ30) minuta. U odnosu na netretirane hidrolizate proteina sirutke došlo je do promjena u sastavu molekularnih masa pojedinih proteinskih frakcija. Došlo je do potpuno ujednačene podjele, gdje udio mol. mase od oko 4000 Da čini gotovo 93 % udjela.



**Najveći udio proteinskih frakcija nakon različitih tretmana:**

**Izolati proteina sirutke:** 20 kHz / 15 min ~7000 Da, udio 41,5 %, 20 kHz / 30 min ~ 8000 Da, udio 45,1 %, 40 kHz / 15 min ~ 5000 Da, udio 87,6 %, 40 kHz kroz 30 min ~ 5000 Da, udio 41,4 %. **Koncentrati proteina sirutke:** 20 kHz / 15 ~10000 Da, udio 62,1 %, i 30 minuta ~ 13000 Da, udio 59,1 %, te ultrazvučnom kupelji od 40 kHz / 30 minuta - 7000 Da udio 69,7 %.  **$\alpha$ -laktalbumin:** 20 kHz / 15 ~ 7000 Da, odgovara udjelu od 58,8 %, sandom kroz 30 minuta ~ 4500 Da, udio 73,1 %, 40 kHz / 15 ~ 4000 Da, udio 69,1 %, i 30 minuta ~ 4000 Da, udio 68,1 %. **hidrolizata proteina sirutke** 20 kHz / 15 minuta ~ 5000 Da, udio 89,8 %, 20 kHz / 30 min ~ 2200 Da, udio 52,5 %, 40 kHz kroz 30 ~ 4000 Da čini gotovo 93 % udjela.

U tablici 15. prikazan je izračun približne molekularne mase nastalih produkata i molekularne mase standarda na osnovu njihovih  $R_f$  vrijednosti. Iz udaljenosti standarda ANAMED i BioLabs, te proteina određena je vrijednost  $\log M_w$  prema baždarnoj krivulji i određena  $M_w$  traženog proteina.

Napravljena baždarna krivulja u odnosu na proteine poznatih molekularnih masa (standardi) koristila je u izračunu molnih masa prema udaljenosti koju su prešli nastali produkti, tako da se može usporediti s podacima koji su dobiveni kompjuterskim programom ImageJ.

### 5.3. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA ZNAČAJKE PJENJENJA PROTEINSKIH PRIPRAVAKA

Formiranje pjene zavisi o sposobnosti proteinskih lanaca da se otvore i usmjere na međupovršine tekućina-zrak. Za formiranje stabilne pjene neophodna je brza difuzija proteina na međupovršinu radi smanjenja površinske napetosti. Pri tome dolazi do djelomičnog otvaranja proteinske molekule što rezultira inkapsuliranjem mjehurića zraka i asocijacijom proteinskih molekula čime se stvara intramolekulski kohezivni film određenog stupnja elastičnosti (Adebowale i Lawal, 2003). Netretirani hidrolizati proteina sirutke imaju veću sposobnost pjenjenja (tablica 16) i molekularnu fleksibilnost od ostalih proteinskih pripravaka sirutke (kao rezultat orijentacije aminokiselinskih ostataka). Hidroliza proteina sirutke generalno je rezultirala povećanom sposobnošću stvaranja pjene kod hidrolizata proteina sirutke, u usporedbi s ostalim proteinima (Britten i sur., 1994; Ludwig i sur., 1995; Lieske i Konrad, 1996; Caessens i sur., 1999). Sposobnost stvaranja pjene suspenzija praćena je povećanjem volumena pjene produženim miješanjem (15 min), pa je uočeno da se produljenjem vremena miješanja u svim uzorcima značajno povećava volumen pjene uslijed ugradnje veće količine zraka i smanjivanja veličine mjehurića zraka u pjeni (tablica 16).

Kapaciteti pjenjenja i stabilnosti pjena poboljšani su ultrazvučnim tretmanima sondom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (tablica 16).

**Kapaciteti pjenjenja** su statistički ( $p < 0,05$ ) značajno porasli nakon tretmana sondom od 20 kHz kroz 15 min, i kupelji od 40 kHz kroz 15 min za suspenzije izolata proteina sirutke - IP - (132% na 235% i 220%), za koncentrate proteina sirutke - WPC - (124% na 221% i 209%), te za suspenzije  $\alpha$ -laktalbumina-  $\alpha$ -LA - (113% na 145% i 123%). Statistički nije značajna ( $p > 0,05$ ) promjena kapaciteta pjenjenja za hidrolizate proteina sirutke - HP - (168% na 170% i 177%). **Stabilnosti pjena** su se poboljšale za sve uzorke nakon tretmana sondom od 20 kHz, sa najvećim porastom kod uzoraka izolata proteina sirutke - IP - (68,3–98,4 min), koncentrata proteina sirutke - WPC - (55,6–89,5 min), te nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, sa najvećim porastom kod uzoraka hidrolizata proteina sirutke - HP - (65,7–85,6 min). Nije primijećena statistički značajna ( $p > 0,05$ ) promjena stabilnosti pjene kod uzoraka  $\alpha$ -laktalbumina (49,7–56,5 min) nakon tretmana sondom od 20 kHz, i tretmanom ultrazvučnom kupelji od 40 kHz (49,7-65,6 min). Nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 500 kHz nije primijećen statistički značajan ( $p > 0,05$ ) utjecaj na povećanje volumena pjene i stabilnost pjene kod svih navedenih modelnih suspenzija proteina sirutke (tablica 16).

Ovakvo povećanje volumena pjene manifestacija je velike molekularne fleksibilnosti proteina kao rezultat djelovanja ultrazvuka, njihove prostorne orijentacije, te sposobnosti interakcije i raširenosti na međufazi zrak/tekuće u formiranju pjene (Mishra i sur., 2001). Veće povećanje sposobnosti pjenjenja izolata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina, nakon tretmana ultrazvukom može se objasniti homogenizacijskim učinkom ultrazvuka. Proces mehaničke homogenizacije nastoji povećati sposobnost pjenjenja. Homogenizacijski učinak ultrazvuka ujednačenije raspršuje proteine i masti (kod koncentrata proteina sirutke), te na taj način poboljšava svojstvo pjenjenja. Tijekom tretmana ultrazvukom, proteini se djelomično odmotavaju, te na taj način dolazi do povećanja sposobnosti pjenjenja. Za adsorpciju na međufazu zrak/voda molekule trebaju posjedovati hidrofobne regije (Horiuchi i sur., 1978; Turgeon i sur., 1992). Kod proteina sirutke hidrofobne i hidrofilne amino kiseline su ujednačeno razmještene kroz cijeli protein (Schmidt i sur., 1984). Sposobnost pjenjenja kod koncentrata proteina sirutke ovisi o koncentraciji proteina, sa minimumom od 10% (Schmidt i sur., 1984). Ovi uzorci u startu imaju manji udio proteina od ostalih uzorka. Ti uzorci sadrže osim proteina i masti, mineralne tvari i laktozu. U studijama koje su se bavile funkcionalnim značajkama koncentrata proteina sirutke i izolatima, pokazano je da ove komponente utječu na funkcionalno ponašanje proteina sirutke (Morr i Ha, 1993; Zhu i Damodaran, 1994).

Prema Coke i sur. (1990), stabilnost pjene treba promatrati kao funkciju dvaju mehanizama: drenaže tekućine i urušavanja strukture pjene. U održavanju strukture pjene presudni su sastav i struktura adsorbiranog materijala na međufazi zrak/voda, dok je za drenažu tekućine presudna značajka površinskog sloja tankog filma tekućine stvorenog između susjednih mjehurića. Ta je sposobnost značajno veća kod proteina tretiranih ultrazvukom budući da oni tvore nestabilno klupko, a veći je i broj razmotanih globula (nastalih kao posljedica kavitacije) na raspolaganju za stvaranje viskoelastičnog filma na granici faza. Sve ovo djeluje na povećavanje volumena i stabilnosti pjene (Clarkson i sur., 1999). Veća stabilnost pjene direktna je posljedica većeg udjela proteina kod izolata i hidrolizata proteina sirutke, te debljine filma na granici faza koja sprječava drenažu tekućine iz lamelarnog sloja (Zhu i Damodaran, 1994), ali i sposobnosti boljeg otvaranja proteinskih lanaca proteina sirutke, što omogućuje bolje usmjeravanje na međupovršine tekućina-zrak.

Posljedica značajno većeg indeksa stabilnosti pjene proizlazi zbog boljeg međudjelovanja između proteinskih lanaca, bolje raširenosti na međufazi tekućina-zrak te formiranja debljeg i viskoznijeg filma (Mishra i sur., 2001; Clarkson i sur., 1999). Tijekom formiranja stabilne pjene dolazi do stvaranja filma na međufazi voda/zrak, te djelomičnog odmotavanja proteina i interakcija putem intermolekularnog vezanja koje uključuje

inkapsuliranje mjehurića zraka i asocijacija proteinskih molekula, što u konačnici rezultira stvaranjem kohezivnog filma kojim je mjehurić zraka u pjeni stabiliziran (Jayaprakasha i Brueckner, 1999; Adebawale i Lawal, 2003).

### 5.3.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA ZNAČAJKE PJENJENJA MODELNIH SUSTAVA PROTEINA SIRUTKE I DODATAKA

Iz tablice 17. vidi se da je primjenom ultrazvuka od 30 kHz došlo do destabilizacije suspenzija koje su pripravljene sa izolatima proteina sirutke. Najveći pad **kapaciteta pjenjenja** primijećen je nakon tretmana modelne suspenzije izolata proteina sirutke ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 minuta, gdje dolazi do pada volumena pjene u odnosu na netretirani uzorak. Dodatkom guar gume i metil celuloze u modelne sustave proteina sirutke došlo je do značajnog pada volumena pjene. Najveći pad primijećen je kod dodatka guar gume i tretmana od 10 minuta te kod dodatka metil celuloze kod tretiranja kroz 3 minute. Nakon ultrazvučnog tretiranja uzoraka sa dodatkom mlijeka u prahu i saharoze primijećen je statistički značajan ( $p < 0,05$ ) porast kapaciteta pjenjenja kod uzoraka izolata i koncentrata proteina sirutke, osim kod uzoraka s dodatkom mlijeka u prahu tretiranih 5 minuta. Došlo je do porasta kapaciteta pjenjenja kod suspenzija koji su pripravljene s koncentratima proteina sirutke i to kod tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 i 10 minuta. Tretman od 5 minuta negativno je djelovao na navedeno svojstvo. Dodatkom guar gume dolazi do porasta kapaciteta pjenjenja s najvećim povećanjem nakon tretmana navedene suspenzije kroz 3 minute. Kod dodatka metil celuloze i tretiranjem kroz 3 i 5 minuta dolazi do pada kapaciteta pjenjenja, osim nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 minuta gdje dolazi do povećanja kapaciteta pjenjenja.

Došlo je do pada minimalne **stabilnosti pjene** kod uzoraka izolata proteina sirutke koji su tretirani ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 min i pripravljene samo sa izolatima, te najveće smanjenje kod uzoraka koji su pripravljene sa dodatkom metil celuloze i izolatima proteina sirutke te tretmanom ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 min. Međutim, kod dodatka guar gume k modelnim uzorcima izolata proteina sirutke došlo je do povećanja stabilnosti pjene nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 3, 5 i 10 minuta, i to najviše nakon tretmana od 3 minute. Nakon dodatka saharoze i mlijeka u prahu kod modelnih uzoraka s izolatima došlo je do povećanja stabilnosti pjena u odnosu na netretirane uzorke, osim kod uzoraka s dodatkom mlijeka u prahu i tretiranih 5 minuta.

Kod modelnih uzoraka pripremljenih samo s koncentratima proteina sirutke došlo je do najvećeg smanjenja stabilnosti pjene nakon tretmana od 3 minute, te kod tretmana od 5 i 10 minuta (tablica 18). Kod modelnih uzoraka pripremljenih s koncentratima proteina sirutke i metil celuloze, došlo je do najvećeg smanjenja stabilnosti pjene nakon tretmana od 5 minute, te kod tretmana od 3 min. Međutim, nakon dodatka metil celuloze i tretiranja od 10 minuta došlo je do povećanja stabilnosti. Nakon dodatka guar gume u modelne suspenzije koncentrata proteina sirutke te nakon tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 3, 5 i 10 min došlo je do porasta stabilnosti s najvećim povećanjem nakon tretiranja kroz 5 min. Stabilnost pjena je smanjena nakon ultrazvučnog tretmana uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom saharoze i tretmanom kroz 5 i 10 min. Kod uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom mlijeka u prahu stabilnost pjene nije promijenjena nakon tretmana kroz 5 minuta (stabilnost je 5 min), ali je porasla nakon tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 min (sa 5 min na 100 min).

Modelne suspenzije pripremljene samo s **izolatima proteina sirutke** i tretirane ultrazvukom od 30 kHz kroz 3, 5 ili 10 minuta pokazuju veći **kapacitet pjenjenja** u prvih 5 minuta miješanja (tablica 17). To pokazuje da miješanje u prvim minutama djeluje povoljno na otvaranje proteinskih lanaca, ali daljnje miješanje tj. inkorporacija zraka uzrokuje pad kapaciteta pjenjenja. Dodatak guar gume i metil celuloze (0,5 %) u modelne sustave proteina sirutke značajno ( $p < 0,05$ ) je utjecao na značajke pjenjenja. Došlo je do pada volumena pjene nakon dodataka navedenih molekula. Najveći pad primijećen je kod dodatka guar gume i tretmana od 10 minuta (491,3 % na 246,98 %), a kod dodatka metil celuloze kod tretiranja kroz 3 minute (491,3 % na 357,05 %). Došlo je do denaturacije proteina sirutke uzrokovane jakim ultrazvučnim vibracijama i kavitacijom, koja dovodi do razmatanja proteina i narušavanja njihovih funkcionalnih svojstva.

Nakon dodatka saharoze (10 %) i mlijeka u prahu (5%) u modelne suspenzije s izolatima proteina sirutke došlo je do povećanja kapaciteta pjenjenja (saharoza) i dodatkom mlijeka u prahu (tretman kroz 10 minuta), odnosno smanjenja (mlijeko u prahu – tretman 5 minuta) kapaciteta pjenjenja. Kod dodataka saharoze u modelne suspenzije netretiranih izolata proteina sirutke primijećen je porast kapaciteta pjenjenja (491,3 % na 513,21 %), a kod mlijeka u prahu pad kapaciteta pjenjenja (491,3 % na 412,03 %) u odnosu na modelni uzorak pripremljen sa samim izolatima proteina sirutke. Poznato je da šećeri i polisaharidi nemaju afinitet za međufazu zrak-voda (Bos i van Vliet, 2001), ali potiču protein-protein interakcije, koje vode ka stvaranju višeslojnog kohezivnog filma na međupovršini, koji sprječava kolaps pjene i omogućava stvaranje stabilnije pjene (Adebowale i Lawal, 2003). Nakon ultrazvučnog

tretiranja uzoraka sa dodatkom mlijeka u prahu i saharoze primijećen je statistički značajan ( $p < 0,05$ ) porast kapaciteta pjenjenja kod uzoraka, osim kod uzoraka s dodatkom mlijeka u prahu tretiranih 5 minuta. Uzrok tome je kao što je već navedeno, da šećeri potiču interakcije proteina i time povećavaju kapacitet pjenjenja čime i toj pozitivnoj kooperaciji pridonosi i otvaranje proteinskih lanaca i njihova fragmentacija čime oni bolje propagiraju na međupovršinu zrak-voda. Kod dodatka mlijeka u prahu, dolazi do emulgiranja uslijed tretmana ultrazvukom i homogenizacije. Produljenim tretmanom kroz 10 minuta dolazi do omogućavanja propagacije proteinskih lanaca na međufazu, što je kraćim tretmanom kroz 5 minuta zakriveno zbog prisustva masti i laktoze, koji se nalaze u mlijeku u prahu. Najveće povećanje volumena pjene indicirano je kod uzoraka izolata proteina sirutke s dodatkom saharoze i tretmanom kroz 5 minuta (513,21 % na 906,86 % - miješanje 15 min). Kod uzoraka izolata proteina sirutke s dodatkom mlijeka u prahu najveće povećanje volumena pjene je tretmanom kroz 10 minuta (513,21 % na 876,43).

**Stabilnost pjene** modelnih suspenzija izolata proteina sirutke praćena je izdvajanjem prve kapi tekućine iz pjene čime je definiran indeks stabilnosti pjene, te vrijeme potrebno za urušavanje kompletne strukture pjene tj. minimalna stabilnost pjene. Došlo je do pada minimalne stabilnosti pjene kod uzoraka koji su tretirani ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 min i pripremljeni sa izolatima (290 min na 75 min), te najveće smanjenje kod uzoraka koji su pripremljeni sa dodatkom metil celuloze i izolatima proteina sirutke i tretmanom ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 min (290 min na 10 min). Došlo je do nastanka pjene velikih lamela koja je krhkija, vjerojatno zbog stvaranja agregata. To se može objasniti i zbog slabije sposobnosti proteina za stabilizaciju pjene, zbog toga što je došlo do denaturacije proteina primjenom ultrazvuka od 30 kHz, te zbog prisustva lanaca metil celuloze koji onemogućavaju stvaranje debljeg sloja na međupovršini voda/zrak, koji bi mogao stabilizirati pjenu. Međutim, kod dodatka guar gume k modelnim uzorcima izolata proteina sirutke došlo je do povećanja stabilnosti pjene nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 3, 5 i 10 minuta, i to najviše nakon tretmana od 3 minute (290 min na 450 min). Djelovanje ultrazvuka na polimerni lanac guar gume uzrokuje njegovo cijepanje. Rezultat su lanci manje mol. mase. Dodatak molekula kraćeg lanca, dodatno stabilizira pjene (Murray, 1997). Promjene koje su gore navedene, uzrokovane su i povećanom topljivošću i molekularnom fleksibilnošću proteina, kao rezultat prostorne orijentacije proteina, njegovih interakcija i razmatanja na međupovršini tekuće-zrak sa stvaranjem debljeg i viskoznijeg filma (Mishra i sur., 2001). Došlo je do zaštite proteina, u modelnoj suspenziji, te je ultrazvuk prvo djelovao na lanac guar gume koji je velike mol. mase, a proteini su ostali očuvani.

Nakon dodatka saharoze kod modelnih uzoraka s izolatima došlo je i do povećanja stabilnosti pjena (290 na 320 min), u odnosu na uzorke samo s izolatima. Međutim stabilnost pjene se smanjila nakon dodatka mlijeka u prahu sa 290 min na 250 i to zbog prisutnosti masti koja se nalazi kod mlijeka u prahu, te destabilizira pjenu, zbog ometanja protein-protein interakcija koji bi stvorili stabilniju pjenu kao što je slučaj nakon dodatka saharoze. Najveća stabilnost pjene indicirani su kod uzoraka izolata proteina sirutke s dodatkom saharoze i tretmanom kroz 5 i 10 min (320 min na 1440 min). Kod uzoraka izolata proteina sirutke s dodatkom mlijeka u prahu najveća stabilnost pjene je nakon tretmana kroz 10 minuta (320 min na 1200 min).

Iz tablice 18 vidljiv je utjecaj ultrazvuka od 30 kHz na modelne suspenzije **koncentrata proteina sirutke**. Došlo je do porasta **kapaciteta pjenjenja** (nakon 15 min) kod suspenzija koji su pripremljeni s koncentratima proteina sirutke i to kod tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 3 (370,28 % na 386,43 %) i 10 minuta (370,28 % na 386,28 %). Tretman od 5 minuta negativno je djelovao na navedeno svojstvo (370,28 % na 316,13 %). To se može objasniti činjenicom da tijekom 3 i 10 minuta dolazi do promjena koje su povezane s djelovanjem ultrazvuka na masti i laktozu koje su prisutne u koncentratima, pri čemu ih dispergiraju i omogućavaju proteinima propagiranje na međupovršinu zrak/tekuće. Nakon 5 minuta dolazi do stvaranja njihovih agregata i koncentriranja suspenzije, pri čemu dolazi do negativnog djelovanja ultrazvuka na proteine tj. njihove denaturacije. Produljenim tretiranjem dolazi vjerojatno do reverzibilnih promjena na proteinima. Dolazi do promjena u sekundarnoj strukturi, te protein prolazi kroz molekularnu reorijentaciju (Güzey i sur., 2006). Dodatkom guar gume dolazi do porasta kapaciteta pjenjenja s najvećim povećanjem nakon tretmana navedene suspenzije kroz 3 minute (370,28 % na 813,27 %). Kod dodatka metil celuloze i tretiranjem kroz 3 i 5 minuta dolazi do pada kapaciteta pjenjenja (370,28 % na 325,31 %, odnosno na 356,58 %), osim nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 minuta gdje dolazi do povećanja kapaciteta pjenjenja (370,28 % na 514,71 %). Vjerojatno dolazi do povećanja sposobnosti proteina da dođu na međupovršinu i stabiliziraju je zbog prisustva lanca metil celuloze koja je polimerizirala te na taj način omogućila pjenjenje uzorka.

Nakon dodatka saharoze (10 %) i mlijeka u prahu (5%) u modelne suspenzije s koncentratima proteina sirutke došlo je do povećanja (saharozu) i dodatkom mlijeka u prahu (tretman kroz 10 minuta), odnosno smanjenja (mlijeko u prahu – tretman 5 minuta) kapaciteta pjenjenja. To se može objasniti činjenicom da šećeri i polisaharidi nemaju afinitet za međufazu zrak-voda (Bos i van Vliet, 2001), ali potiču protein-protein interakcije, koje vode ka stvaranju višeslojnog kohezivnog filma na međupovršini. Međutim, masti prisutne u

mlijeku u prahu sprječavaju propagaciju proteina na međupovršinu u cilju smanjenja površinske napetosti. Modelni uzorci koncentrata proteina sirutke, zbog malog udjela proteina, stvorili su krhku i poroznu pjenu, karakteriziranu s velikim lamelama pora. Najveće povećanje volumena pjene indicirano je kod uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom saharoze i tretmanom kroz 5 minuta (380,68 % na 701,94 % - miješanje 15 min). Kod uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom mlijeka u prahu povećanje volumena pjene je nakon ultrazvučnog tretmana kroz 10 minuta (304,96 % na 753,18).

Kod modelnih uzoraka pripremljenih samo s koncentratima proteina sirutke došlo je do najvećeg smanjenja **stabilnosti pjene** (210 min na 10 min) nakon tretmana od 3 minute, te kod tretmana od 5 min (210 min na 23 min) i 10 minuta (210 min na 39 min). Kod modelnih uzoraka pripremljenih s koncentratima proteina sirutke i metil celuloze, došlo je do najvećeg smanjenja stabilnosti pjene (210 min na 105 min) nakon tretmana od 5 minute, te kod tretmana od 3 min. Tretman ultrazvukom uzrokovao je smanjenje u volumenu pjene zbog stvaranja agregata. Uloga proteina u stvaranju pjene je smanjenje površinske napetosti. Agregacija uzrokuje smanjenje dostupne količine proteina za formaciju pjene, ali stvoreni filmovi smatraju se debljima i stabilnijima, poboljšavajući stvaranje mrežaste strukture u proteinskom filmu. Povezivanje S-S mostovima pridonosi dobrim viskoelastičnim filmovima. Međutim, nakon dodatka metil celuloze i tretiranja od 10 minuta došlo je do povećanja stabilnosti (210 min na 260 min). Nakon dodatka guar gume u modelne suspenzije koncentrata proteina sirutke te nakon tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 3, 5 i 10 min došlo je do porasta stabilnosti s najvećim povećanjem nakon tretiranja kroz 5 min (210 min na 1800 min).

Nakon dodatka saharoze (10 %) i mlijeka u prahu (5%) u modelne suspenzije s koncentratima proteina sirutke došlo je do povećanja (saharozu) s 210 na 230 min, odnosno smanjenja (mlijeko u prahu) stabilnosti pjene s 210 na 5 min. Stabilnost pjena je smanjena nakon ultrazvučnog tretmana uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom saharoze i tretmanom kroz 5 i 10 min (230 min na 150 odnosno 120 min). Kod uzoraka koncentrata proteina sirutke s dodatkom mlijeka u prahu stabilnost pjene nije promijenjena nakon tretmana kroz 5 minuta (5 min), ali je porasla nakon tretiranja ultrazvukom od 30 kHz kroz 10 min (5min na 100 min). Navedena vremena označavaju kada je došlo do potpunog kolapsa pjene.



## 5.4. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA EMULGIRAJUĆA SVOJSTVA PROTEINSKIH PRIPRAVAKA

Prema Pearce i Kinsella (1978), indeks aktiviteta emulzije predstavlja površinu međufaze koju može stabilizirati jedan gram proteina. U emulzijama stabiliziranim proteinima, proteini osiguravaju nastanak međufazne membrane oko masne globule čime se sprječava flokulacija, koalescencija i izuljivanje. Svojstvo proteina da doprinese nastanku i stabilizaciji emulzija ključno je za primjenu proteina sirutke u različitim prehrambenim proizvodima, uključujući aditive za mesnu industriju, bjelilo za kavu, dresinge i zamrznute deserte (Jayaprakasha i Brueckner, 1999).

Ultrazvuk visokog intenziteta može značajno unaprijediti stabilnost emulgiranja materijala (pojava između dviju tekućih faza prilikom čega je jedna (dispergirana) faza rasprostranjena u drugoj (kontinuiranoj) fazi u obliku malih kapljica promjera, općenito, do 0,1  $\mu\text{m}$ ). Općenito govoreći, emulzije su termodinamički nestabilne, ali njihova se stabilnost može poboljšati dodatkom aditiva (npr. površinski aktivne tvari). Osim posebnih slučajeva gdje do emulzije dolazi spontano, da bi se stvorila takva metastabilna mješavina mora biti primijenjena energija i to se može postići ultrazvukom. Učinak ultrazvukom se temelji na razdjeljivanju kapljica u sustavu tekuće-tekuće izloženom ultrazvuku, a kao rezultat djelovanja kavitacija.

Kod netretiranih suspenzija proteina sirutke možemo vidjeti da je indeks aktiviteta emulzije najveći kod  $\alpha$ -laktalbumina, zatim hidrolizata proteina sirutke, izolata proteina sirutke, te kod koncentrata proteina sirutke (tablica 19). Kod prva 3 navedena uzorka najveći je udio proteina. U literaturi postoje navodi da hidrolizati pokazuju bolju emulgirajuću sposobnost zbog otvaranja hidrofobnih ostataka amino kiselina na površinu molekule (Neklyudov, 2000), međutim ona ovisi o veličini proteinskih lanaca. Za emulgirajuću aktivnost i sposobnost migracije na međupovršinu ulje, voda, potrebni su proteinski lanci mol. mase veće od 10000 Da, jer oni bolje doprinose stvaranju emulzija, nego lanci manje mol. mase kao što je to slučaj kod hidrolizata proteina sirutke. Na sposobnost stvaranja emulzije, utječe stupanj hidrolize (DH). Do cca. 5-7 % hidrolize dolazi do poboljšanja stvaranja emulzije, ali on pada kod DH veće od 9%. Ovaj uzorak ima veći stupanj hidrolize (DH), te su lanci puno kraći. Međutim IAE kod netretiranih hidrolizata proteina sirutke je veći nego kod netretiranih izolata i koncentrata proteina sirutke. Kod uzoraka  $\alpha$ -laktalbumina, uočena je prisutnost i drugih proteina od kojih je i  $\beta$ -laktoglobulin. To pokazuje da se i kod čistih uzoraka koji postoje na tržištu, mogu naći udjeli drugih komponenata. U ovom slučaju to

utječe na navedeno svojstvo, iako teorijski čisti  $\alpha$ -laktalbumin pokazuje lošija svojstva emulgiranja nego  $\beta$ -laktoglobulin.  $\beta$ -laktoglobulin bolje formira emulzije nego drugi proteini sirutke, dok za  $\alpha$ -laktalbumin nije u potpunosti razjašnjena funkcija u stvaranju emulzija (Webb i sur., 2002). Prethodna istraživanja pokazala su da  $\alpha$ -laktalbumin može pozitivno djelovati na stabilizaciju emulzija (Leman, 1999), međutim neka istraživanja pokazuju da  $\alpha$ -laktalbumin može inhibirati formiranje emulzije (Dickinson i Stainsby, 1982).

Bolja emulgirajuća svojstva hidrolizata proteina sirutke, nego izolata proteina sirutke, mogu se objasniti njihovom manjom molarnom masom, odnosno manjom veličinom proteinske globule u odnosu na molekule izolata proteina sirutke. Također, do značajne razlike u sposobnosti formiranja emulzija među ispitivanim uzorcima dolazi i zbog samog mehanizma tvorbe emulzija, pri čemu se na površini masne kapljice tvori adsorbirani sloj proteina. Pojedinačne kapljice unutar emulzije (granica ulje-voda) okružene su adsorbiranim slojem proteina sličnog gelu. Najslabija emulgirajuća svojstva koncentrata proteina sirutke, mogu se objasniti činjenicom da oni sadrže najmanji udio proteina (60%), te sadrže masti i laktozu koji ne pridonose stvaranju emulzija (Zayas, 1997).

Nakon tretiranja ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 30 minuta, došlo je do najvećeg povećanja indeksa aktiviteta emulzije kod svih uzoraka (tablica 19). Do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja IAE, došlo je kod uzoraka koncentrata proteina sirutke, zatim izolata proteina sirutke,  $\alpha$ -laktalbumina te hidrolizata proteina sirutke. Povećanje je manje izraženo nakon tretiranja od 15 min. Djelovanjem ultrazvučne kupelji od 40 kHz kroz 15 minuta, isto tako je došlo do značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja IAE. Povećanje je najveće kod koncentrata proteina sirutke, zatim izolata proteina sirutke,  $\alpha$ -laktalbumina te hidrolizata proteina sirutke. Povećanje je manje izraženo nakon tretmana od 30 min kod svih uzoraka, međutim kod koncentrata proteina sirutke ono je još veće. Tretiranjem ultrazvučnom kupelji od 500 kHz, ne dolazi do značajnih promjena ni kod jednog modelnog uzorka. Nakon tretmana ultrazvučnom sondom od 20 kHz nastale emulzije pokazivale su i značajno veću stabilnost ( $p < 0,05$ ), osim kod uzoraka s  $\alpha$ -laktalbuminom. Najveće povećanje je nakon tretmana od 30 minuta. Tretmani ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, imali su pozitivan utjecaj na stabilnost emulzija pripremljenih s izolatima i koncentratima proteina sirutke. Tretman ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 minuta imao je veći utjecaj nego tretman s 30 minuta. Nije primijećen utjecaj ultrazvučnih tretmana sa ultrazvučnom kupelji od 40 kHz na emulgirajuću stabilnost modelnih suspenzija pripremljenih s  $\alpha$ -laktalbuminom i 500 kHz na emulgirajuću stabilnost svih modelnih suspenzija.

Nakon tretiranja ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 30 minuta, došlo je do najvećeg povećanja indeksa aktiviteta emulzije kod svih uzoraka. Do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja IAE, došlo je kod uzoraka koncentrata proteina sirutke (114,5 na 356,32  $m^2/g$ ), zatim izolata proteina sirutke (148,2 na 276,47  $m^2/g$ ),  $\alpha$ -laktalbumina (180,62 na 224,78  $m^2/g$ ), te hidrolizata proteina sirutke (161,32 na 181,27  $m^2/g$ ). Do najvećeg povećanja IAE nakon tretiranja sondom od 20 kHz kod suspenzija koncentrata proteina sirutke, došlo je zbog ultrazvučnog djelovanja na laktozu i masti prisutne u uzorku, gdje oni pokazuju zaštitni učinak za proteine (Murray, 1997). Ultrazvuk prvo djeluje na smanjenje njihovih čestica mehaničkom energijom, te tako dolazi do većeg povećanja sposobnosti proteina da stabilizira međupovršinu ulje/voda. Dolazi do manje denaturacije proteina, te dolazi do fragmentacije lanaca proteina na peptide i lance manje molekularne mase. Oni dodatno pridonose sposobnosti stvaranja emulzije i boljeg otvaranja proteinskih lanaca, te stabilizacije filma na međupovršini što omogućuje bolje usmjeravanje hidrofilnog odnosno hidrofobnog dijela molekule unutar emulzije na granici ulje-voda (Damodoran, 1996).

Djelovanjem ultrazvučne kupelji od 40 kHz kroz 15 minuta, isto tako je došlo do značajnog ( $p < 0,05$ ) povećanja IAE. Kod koncentrata proteina sirutke (114,5 na 251,34  $m^2/g$ ), zatim izolata (148,2 na 240,64  $m^2/g$ ) proteina sirutke,  $\alpha$ -laktalbumina (180,62 na 195,67  $m^2/g$ ), te hidrolizata proteina sirutke (161,32 na 183,25  $m^2/g$ ). To je razlog, manjeg povećanja temperature, koja ima određeni učinak na destabilizaciju strukture proteina, te i zbog drugačijeg širenja vala. U ovom slučaju veća je frekvencija, a manji intenzitet. Dolazi do određenog mehaničkog cijepanja koji uzrokuje cijepanje lanca proteina, ali bez denaturacije njegovih dijelova. U studiji Villamiel i de Jong (2000b), uočeno je da ne dolazi do denaturacije  $\alpha$ -laktalbumina i  $\beta$ -laktoglobulina nakon djelovanja ultrazvuka, ako nije prisutno i dodatno grijanje.

Drugim tretmanom ultrazvučnom kupelji od 40 kHz s produljenim tretiranjem od 30 min, ne dolazi do značajnih promjena IAE osim kod koncentrata proteina sirutke. Razlog je vjerojatno reverzibilnih promjena koji se dešavaju na proteinskoj molekuli, koja nije izložena velikom intenzitetu zvučnog vala. Samim time ne dolazi do velikog povišenja tlaka i temperature, te se molekula nakon tretiranja uspijeva vratiti u prvobitno stanje. Güzey i sur., 2006 zaključili su, bazirano na rezultatima analize sekundarne strukture, da je povećanje kinetike adsorpcije BSA rezultiralo činjenicom da se protein podvrgava nizu molekularnih reorijentacija koje vode do formiranja stabilnog strukturnog međuproducta koji posjeduje veću molekularnu fleksibilnost. Slični rezultati su zabilježeni i za  $\alpha$ -laktalbumin nakon prijelaza iz nativnog stanja u stanje nasumičnog klupka (Cornec i sur., 2001). Stanje

nasumičnog klupka je definirano kao ravnotežno stanje između nativnog i razmotanog stanja. Proteinska molekula u stanju nasumičnog klupka je gotovo kompaktna kao u nativnom stanju, ali je slobodnije upakirana nepolarna jezgra (Vassilenko i Uversky, 2002).

Tretiranjem ultrazvučnom kupelji od 500 kHz, ne dolazi do značajnih promjena ni kod jednog modelnog uzorka. Ovaj tip ultrazvuka predstavlja ultrazvuk visoke frekvencije i prijelaznog intenziteta ( $< 2 \text{ W/cm}^2$ ), koji nije dovoljno visokog intenziteta i snage da bi uzrokovao neke mehaničke i fizičke promjene u sistemu na koji djeluje (tablica 19).

Adsorbirani sloj na površini kapljice ulja (sličan gelu) proizlazi iz međusobnih interakcija između proteinskih molekula te između proteinskih molekula i kapljica ulja pri čemu hidrofobne interakcije imaju značajnu ulogu u njihovu nastajanju. Sile koje upravljaju navedenim interakcijama pri stvaranju tzv. gela iste su kao i kod stvaranja kvarterne strukture proteina - vodikove veze, ionske interakcije (privlačne i odbojne), van der Waals – ove interakcije i hidrofobne interakcije (kada se hidrofobni lanci grupiraju i isključuju molekule vode iz okoline uljne kapljice) (Blijdenstein i sur., 2004). Sve to utječe na stabilnost stvorenih emulzija. Kod netretiranih uzoraka proteina sirutke vidi se da najmanju stabilnost emulzija (ISE) imaju koncentri proteina sirutke (65,5 h) iz već spomenutog prisutva masti i laktoze. Nadalje se stabilnost povećava preko izolata proteina sirutke (70,5 h),  $\alpha$ -laktalbumina (70,9 h) i hidrolizata proteina sirutke (77,9 h) (tablica 19).  $\beta$ -laktoglobulin prisutan u uzorcima izolata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina, tvori stabilne emulzije budući da posjeduje sposobnost razmatanja peptidnog lanca na granici faza, te tvori intermolekularne asocijacije bilo putem hidrofobnih interakcija ili S-S mostova, a posjeduje i tzv. "hidrofobni džep" unutar kojeg se može vezati hidrofobni ligand (Qin i sur., 1998.; Damodoran, 1997).

Nakon tretmana ultrazvučnom sondom od 20 kHz kroz 30 minuta, nastale emulzije pokazivale su i značajno veću stabilnost ( $p < 0,05$ ) (osim kod uzoraka s  $\alpha$ -laktalbuminom), koja je izražena kao vrijednost indeksa stabilnosti emulzije (ISE), u usporedbi s modelnim sustavima pripremljenim s netretiranim suspenzijama proteina sirutke (tablica 19). ISE kod koncentrata proteina sirutke porastao je s 65,5 na 187,8 h; zatim izolata (70,5 na 145,3 h) proteina sirutke,  $\alpha$ -laktalbumina (70,9 na 88,4 h), te hidrolizata proteina sirutke (77,9 na 82,3 h). Jačina adsorbiranog sloja proteina je kritična u sprječavanju spajanja kapljica koje dovodi do eventualnog kolapsa strukture emulzije (Poole, 1989), te u stvaranju hidrofobnih i elektrostatskih interakcija. Rezultat adsorbiranih komponenti je redukcija površinske napetosti između dva sloja tekućine (Dickinson i Stainsby, 1982). Ultrazvučni tretmani s ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, imali su pozitivan utjecaj na stabilnost emulzija pripremljenih s izolatima (137,3 h i 134,3 h) i koncentratima proteina sirutke (154,8 h i 145,3

h). Tretman s ultrazvučnom kupelji od 40 kHz kroz 15 minuta imao je veći utjecaj nego tretman s 30 minuta zbog navedenih vjerojatno reverzibilnih promjena na molekulama proteina. Nije primijećen utjecaj ultrazvučnih tretmana s ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz na emulgirajuću stabilnost modelnih suspenzija pripremljenih s  $\alpha$ -laktalbuminom, zbog njegove najveće otpornosti na povišen tlak, gdje ne dolazi do formiranja debljeg sloja između proteina i kapljica masti.

#### 5.4.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA EMULGIRAJUĆA SVOJSTVA MODELNIH SUSTAVA PROTEINA SIRUTKE I DODATAKA

Kod suspenzija pripremljenih s izolatima proteina sirutke, te dodacima metil celuloze i guar gume, došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) pada indeksa aktiviteta emulzije (IAE). Najveći pad IAE kod uzoraka pripremljenih samo s izolatima proteina sirutke, te i s dodatkom metil celuloze je kod tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 min, a kod dodataka guar gume i tretmana od 10 minuta. Kod dodatka saharoze i mlijeka u prahu izolatima proteina sirutke i nakon tretmana kroz 5 i 10 min, isto dolazi do pada IAE i ISE i to najviše kod saharoze 10 minutnim tretmanom. Kod mlijeka u prahu tretmanom od 10 min dolazi do pada IAE, ali nije statistički značajno ( $p > 0,05$ ). Za emulzije pripremljene s koncentratima proteina sirutke i dodacima metil celuloze i guar gume, došlo je do povećanja IAE. Kod dodatka saharoze i tretiranja modelnih suspenzija kroz 5 i 10 min dolazi do značajnog ( $p < 0,05$ ) pada IAE, a kod dodatka mlijeka u prahu i tretiranja modelnih suspenzija dolazi do porasta IAE. Tretiranjem sondom od 30 kHz dolazi do narušavanja stabilnosti emulzija modelnih suspenzija izolata i koncentrata proteina sirutke s najvećim padom kroz 5 min. Nakon dodataka guar gume izolatima i koncentratima dolazi do pada ISE, te isto nakon dodatka metil celuloze i saharoze te mlijeka u prahu.

Kod suspenzija pripremljenih s **izolatima proteina sirutke**, te dodacima metil celuloze i guar gume, došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) pada IAE (tablica 20). Najveći pad kod uzoraka pripremljenih samo s izolatima proteina sirutke je s 148,2 m<sup>2</sup>/g na 83,89 m<sup>2</sup>/g, kod tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 minuta. Zatim s dodatkom metil celuloze s 148,2 m<sup>2</sup>/g na 113,63 m<sup>2</sup>/g, kod tretmana ultrazvukom od 30 kHz kroz 5 min, a kod dodataka guar gume i tretmana od 10 minuta 148,2 m<sup>2</sup>/g na 96,84 m<sup>2</sup>/g. Kod dodatka saharoze i mlijeka u prahu izolatima proteina sirutke i nakon tretmana kroz 5 i 10 min, isto dolazi do pada IAE i ISE i to najviše kod saharoze (153,60 m<sup>2</sup>/g na 61,16 m<sup>2</sup>/g) 10 minutnim tretmanom. Kod

mlijeka u prahu tretmanom od 10 min ( $165,03 \text{ m}^2/\text{g}$  na  $143,66 \text{ m}^2/\text{g}$ ) dolazi do pada IAE, ali nije statistički značajno ( $p > 0,05$ ). Ovdje se uočava djelovanje ultrazvuka na navedene dodatke kako je i prije prikazano. Guar guma je veliki molekularni lanac, velike mol. mase, te je potrebno više vremena da bi došlo do cijepanja tog lanca. Guar guma je za razliku od metil celuloze više zaštitila proteine od djelovanja ultrazvuka, no ne i dovoljno. Za razliku od koncentrata proteina sirutke tu je razlika u sadržaju proteina. Izolati sadrže veći udio proteina, te ultrazvuk negativno djeluje na proteinsku molekulu velikim ultrazvučnim intenzitetom te dolazi do denaturacije proteina. Protein gubi sposobnost stvaranja emulzije. Smanjenje IAE leži u činjenici da dolazi do inkompatibilnosti polisaharida, koji se ne adsorbiraju na kapljicu emulzije, te dolazi do slabljenja interakcija između kapljica emulzija i povećanja viskoznosti vodene faze (Cao i sur., 1990; Lekkerkerker i sur., 1992; Vrij, 1976).

Ovdje se jasno vidi razlika između frekvencija i intenziteta ultrazvuka. Primijećen je suprotan učinak tretiranja sondama na IAE i ISE suspenzija pripremljenih sa samim proteinima. Primjenom sonde od 20 kHz dolazi do poboljšanja navedenih svojstva, a sondom od 30 kHz i većim intenzitetom dolazi do narušavanja svojstva IAE i ISE i to pogotovo kod izolata proteina sirutke. Adsorbirani sloj proteina na površini kapljice ulja (sličan gelu) nije dovoljno jak, te dolazi do narušavanja međusobnih interakcija između proteinskih molekula te između proteinskih molekula i kapljica ulja pri čemu dolazi do cijepanja hidrofobnih interakcija.

Za emulzije pripremljene s **koncentratima proteina sirutke** i dodacima metil celuloze i guar gume, došlo je do povećanja mutnoće, kao rezultat razlike refraktivnog indeksa između kapljica ulja i vodene faze (Blijdenstein i sur., 2004). IAE značajno je porastao ( $p < 0,05$ ) za modelne sustave pripremljene s koncentratima proteina sirutke (tablica 21) s približno sličnim povećanjem ( $114,5 \text{ m}^2/\text{g}$  na  $\sim 145 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Kod dodatka saharoze i tretiranja modelnih suspenzija kroz 5 i 10 min dolazi do značajnog ( $p < 0,05$ ) pada IAE ( $124,3 \text{ m}^2/\text{g}$  na  $112,00 \text{ m}^2/\text{g}$  odnosno  $88,15 \text{ m}^2/\text{g}$ ), a kod dodatka mlijeka u prahu i tretiranja modelnih suspenzija dolazi do porasta IAE ( $134,6 \text{ m}^2/\text{g}$  na  $161,26 \text{ m}^2/\text{g}$  odnosno  $151,29 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Utjecaj ultrazvučne sonde od 30 kHz, kroz 3, 5 i 10 min imao je utjecaj na formiranje emulzija zbog ultrazvučnog djelovanja na laktozu, masti i polimere velikog lanca kao što su guar guma i metil celuloza prisutne u uzorku. Oni se nalaze prvi izloženi djelovanju ultrazvuka, te na taj način pokazuju zaštitni učinak za proteine (Murray, 1997). Djelovanje ultrazvuka na polimere velikog lanca, očituje se njihovim cijepanjem na manje lance i to prvo djelovanjem na centar molekule, te zatim na pobočne lance (Grönroos, 2004 i 2008). Ultrazvuk prvo djeluje na smanjenje njihovih čestica mehaničkom energijom, te tako dolazi

do većeg povećanja sposobnosti proteina da stabilizira međupovršinu ulje/voda. Dolazi do manje denaturacije proteina, te dolazi do fragmentacije lanaca proteina na peptide i lance manje molekularne mase. Oni dodatno pridonose sposobnosti stvaranja emulzije i boljeg otvaranja proteinskih lanaca, te stabilizacije filma na međupovršini što omogućuje bolje usmjeravanje hidrofилnog odnosno hidrofobnog dijela molekule unutar emulzije na granici ulje-voda (Damodoran, 1996).

Tretiranjem sondom od 30 kHz dolazi do narušavanja stabilnosti emulzija modelnih suspenzija izolata proteina sirutke kroz 3 min (70,5 h na 18,84 h); 5 min (70,5 h na 13,92 h); 10 min (70,5 h na 20,92 h) i koncentrata proteina sirutke kroz 3 min (65,5 h na 24,57 h); 5 min (65,5 h na 14,88 h); 10 min (65,5 h na 16,98 h). Nakon dodataka guar gume izolatima i koncentratima dolazi do pada ISE (70,5 h na 25,59 h odnosno 65,5 h na 25,97 h) te isto nakon dodatka metil celuloze izolatima i koncentratima (70,5 h na 23,06 h odnosno 65,5 h na 24,7 h). Nakon dodatka saharoze netretiranim izolatima odnosno koncentratima ISE je porastao (70,5 h na 73,5 h), te za koncentrate (65,5 h na 67,2 h). Međutim, nakon dodatka saharoze i mlijeka u prahu izolatima i koncentratima i tretiranjem nastalih modelnih suspenzija dolazi do pada ISE s najvećim padom nakon 10 minutnih tretmana. Kod saharoze i izolata proteina sirutke pad je (73,5 h na 29,54 h), a kod mlijeka u prahu s 65,3 h na 28,97 h. Kod saharoze i koncentrata proteina sirutke pad je s 67,2 h na 18,11 h), a kod mlijeka u prahu s 64,3 h na 24,51 h.

ISE je procjena proteinskog kapaciteta za ostajanje na međufazi voda-ulje nakon skladištenja emulzija ili zagrijavanja emulzija (Mohanty i sur., 1988). Narušavanje stabilnosti kod emulzija uzoraka koncentrata proteina sirutke, uzrokovana je denaturacijom proteina, te djelovanjem na polimere, a sama ne prisutnost površinski aktivnih tvari dovodi do raspada emulzija. ISE pada i zbog djelomične agregacije uljnih kapljica (Dickinson i Galazka, 1991; Vanapalli i sur., 2002). Slobodni, neadsorbirani polisaharid koji je prisutan, dovodi do flokulacija i brze separacije faza (Dickinson, 1996; Dickinson i sur., 1994), te rezultira smanjenom stabilnošću emulzija. Taj učinak se objašnjava i veličinom dodanih molekula (guar guma > metil celuloza) koji ometaju sposobnost proteinske propagacije na međufazu ulje-voda (Kim i sur., 2003). Dodatak mlijeka u prahu pokazuje blago narušavanje ISE, za izolate (70,5 h na 65,3 h), te koncentrate (65,5 h na 64,3 h). Došlo je do povećanja IAE (tablice 20 i 21) nakon dodatka saharoze kod uzoraka koji nisu tretirani ultrazvukom, zbog nastalih interakcija s proteinima, rezultirajući stvaranjem sistema s poboljšanim svojstvima emulgiranja (Dickinson i Galazka, 1991; Nagasawa i sur., 1996; Semenova i sur., 2002). Kompleksi biopolimera (ili konjugata) mogu pokriti cijelu površinu uljne kapljice putem

mehanizma kooperativne adsorpcije i stvaranja debelog makromolekularnog sloja koji elektrostatički i sterički doprinosi stabilnosti emulzija (Dickinson i Eriksson, 1991). U tom sloju, proteini uglavnom stabiliziraju kapljice emulzije s elektrostatskim odbojnim silama (McClements, 2001; Tesch i sur., 2002). Međutim kod tih istih uzoraka nakon dodatka mlijeka u prahu došlo je do smanjenja ISE. Sama prisutnost masti i laktoze u uzorku mlijeka u prahu dodatno će narušiti stabilnost i sposobnost stvaranja emulzije jer se sprječava propagacija proteina na međupovršinu ulje/voda.



## 5.5. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA TOPLJIVOST PROTEINA

Topljivost proteina sirutke jedna je od najvažnijih osobina proteinskih sustava koja također utječe i na druga funkcionalna svojstva: sposobnost stvaranja pjene, emulgirajuća svojstva, povećanje viskoznosti itd. Topljivost je najpraktičnija mjera proteinske denaturacije i agregacije, a isto tako i dobar pokazatelj proteinske funkcionalnosti. Općenito, proteini koji inicijalno egzistiraju u denaturiranom, djelomično agregiranom stanju, obično pokazuju nedovoljnu sposobnost sudjelovanja u želiranju, emulgiranju i pjenjenju.

Određivanjem topljivosti, moguće je predvidjeti interakcije protein/otapalo, protein/protein i otapalo/protein, koje određuju funkcionalnost proteina sirutke (Webb i sur., 2002). Velike vrijednosti topljivosti (slika 56) uzoraka koji nisu tretirani ultrazvukom, rezultat su visokog udjela proteina sirutke. Proteini sirutke u nativnom obliku, topljivi su u cijelom pH području. Tretman ultrazvukom od 20 kHz pokazao je povećanje topljivosti kod uzoraka koncentrata proteina sirutke (93 – 96 %) u usporedbi s netretiranim uzorcima (91 %) i  $\alpha$ -laktalbumina (71 – 81 %), dok nije primijećena značajna ( $p > 0,05$ ) promjena topljivosti kod uzoraka izolata proteina sirutke (96,5 %) i hidrolizata proteina sirutke (97,6 %). Razaranje peptidnih veza hidrolizom uzrokuje konformacijske promjene u proteinskim globulama pri čemu je veća topljivosti hidrolizata proteina sirutke u odnosu na druge suspenzije (slika 56). Ultrazvuk visokog intenziteta povećava topljivost proteina mijenjajući proteinsku konformaciju i strukturu na taj način da su hidrofilni ostaci amino kiselina iz unutrašnjosti okrenuti prema vodi (Morel i sur., 2000; Moulton i Wang, 1982). Ovaj tretman isto tako dovodi do smanjenja molekularne mase proteina, čime je veća površina proteina pokrivena s molekulama vode (Morel i sur., 2000). Isto tako dolazi do smanjenja veličine čestica proteina sirutke, praćena povećanim brojem nabijenih grupa ( $\text{NH}_4^+$  i  $\text{COO}^-$ ) i povećanom elektrovodljivošću u usporedbi s netretiranim uzorcima (Herceg i sur., 2002). Posljedično, dolazi do poboljšanih interakcija voda-protein pošto su jače elektrostatske sile i više molekula vode stupa u interakcije s proteinskim molekulama. Povišena temperatura nakon tretmana ultrazvukom isto tako doprinosi povećanoj topljivosti, pošto je proteinska topljivost povećana u intervalu između 40 °C i 50 °C, što je slučaj koristeći sondu od 20 kHz. Utjecaj ultrazvuka na modelni sistem s  $\alpha$ -laktalbuminom, pokazao je povećanje topljivosti nakon tretmana sondom od 20 kHz kroz 15 min (70,6 % na 81 %), dok je to povećanje bilo manje nakon istog

tretmana kroz 30 minuta (70,6 % na 79 %). Upotrebom ultrazvučnih kupelji od 40 kHz i 500 kHz nije došlo do značajnog utjecaja na topljivost.

### 5.5.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA SVOJSTVA TOPLJIVOSTI PROTEINA U MODELNIM SUSTAVIMA PROTEINA SIRUTKE I DODATAKA

Nakon dodataka guar gume i metil celuloze u modelne sustave pripremljene s **izolatima proteina sirutke**, nije došlo do značajnog smanjenja topljivosti nakon tretiranja sondom od 30 kHz kroz 3, 5 i 10 minuta (slika 57). Međutim, tretiranje 10 % suspenzija izolata proteina sirutke bez dodataka pokazalo je značajan pad ( $p < 0,05$ ) topljivosti proteina sirutke s istim tretmanima i vremenima tretiranja (96,5 % pad na 54,59 % nakon tretmana 5 min, 64,61 % nakon 10 min i 76,49 % nakon 3 minute tretiranja). Ovaj gubitak topljivosti, može se objasniti jačim intenzitetom ultrazvuka i većim tlakom koji je stvoren kavitacijom, koji uzrokuje denaturaciju praćenu sa stvaranjem agregata koji najvjerojatnije nastaju stvaranjem intermolekularnih disulfidnih mostova putem SH/S–S reakcija (Galazka i sur., 2000). Ispitivanjem vrijednosti topljivosti proteina, moguće je utvrditi denaturaciju i agregaciju proteina nakon primjene visokog tlaka kod koncentracija koje su premale za stvaranje gela (Cheftel i sur., 1985). Stvaranje hidrofobnih veza i ionskih parova praćeno je velikim promjenama volumena, te tako primijenjeni ultrazvučni tretman s djelovanjem povišenog tlaka i temperature ima štetan utjecaj na intramolekularne hidrofobne i elektrostatske interakcije. Isto tako dolazi i do promjena u terciarnoj i kvaternoj strukturi globularnih proteina. Utvrđeno je da tretman ultrazvukom od 5 minuta sa sistemom sonde od 30 kHz ima najjači štetni utjecaj. Produljenim tretmanom, najvjerojatnije dolazi do nekih reverzibilnih promjena čime se dio molekule vraća u prethodno stanje.

Značajan pad topljivosti ( $p < 0,05$ ) primijećen je kod modelnih sistema s **koncentratima proteina sirutke**, ali i nakon dodatka guar gume, što nije bilo jako izraženo kod izolata proteina sirutke (slika 58). Ovdje se može primijetiti da sadržaj proteina koji je prisutan u koncentratima, i koji je u startu manji nego u izolatima, utječe na daljnju topljivost (91 % pad na 60,08 % nakon tretiranja 5 min, 67 % nakon 3 min, te 76,92 nakon 10 min tretiranja). Primijenjen tretman dodatno narušava postojeću strukturu proteina i smanjuje njihovu topljivost. Manji utjecaj prikazan je na topljivost nakon dodatka metil celuloze (91 % pad na 73,33 % do 73,75 %). To je kraći lanac za razliku od guar gume i vjerojatno dolazi do

određene polimerizacije čime se zaštićuje proteinska molekula, najvjerojatnije sistemom da se omota oko proteina ili je moguća zaštita kao što je i u slučaju disaharida koji pokazuju baroprotektivan učinak (Dumay i sur., 1994). Kod guar gume i većeg lanca, ultrazvuk ima destruktivan utjecaj jer dolazi do fragmetacije velikog lanca čime to prevladava moguću polimerizaciju. Poznato je da se ne odvija degradacija molekula, ispod određene molekularne mase. Vjeruje se da ultrazvučna degradacija, za razliku od kemijske ili toplinske dekompozicije, nije slučajan proces, te da se cijepanje odvija otprilike u centru molekule, te da se velike molekule brže degradiraju (Grönroos, 2004 i 2008). Što je veća inicijalna dinamička viskoznost brže se odvija degradacija, te isto što je veća koncentracija polimera veća je degradacija.

## **5.6. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA pH VRIJEDNOSTI PROTEINSKIH SUSPENZIJA**

Nije došlo do značajnih promjena pH vrijednosti modelnih suspenzija proteina sirutke (slika 59). Kod netretiranih izolata proteina sirutke pH suspenzije iznosi 7, dok je nakon tretmana pH 7,1 ili 7,2. Kod netretiranih koncentrata proteina sirutke pH suspenzije iznosi 6,1, a nakon tretmana je pH 6,1 ili 6,2. Kod netretiranog laktalbumina pH suspenzije iznosi 7,1, a nakon tretmana je pH 7,2. Kod netretiranih hidrolizata proteina sirutke pH suspenzije iznosi 7,3, a nakon tretmana je pH 7,2 ili 7,3. Na slici 60. prikazan je utjecaj različitih tretmana ultrazvukom i različitih vremena tretiranja na destiliranu vodu. Iz krivulje se vidi da je najveći utjecaj tretmanom ultrazvučnom sondom od 20 kHz tijekom 30 minuta. U tretiranom mediju koji je voda odlazi do stvaranja radikala,  $H\cdot$  i  $\cdot OH$  ( $H_2O \rightarrow H\cdot + \cdot OH$ ) (Henglein, 1993). Stvoreni OH radikali mogu utjecati na kvalitetu nekih tvari u hrani, te se mogu koristiti u poboljšavanju funkcionalnosti određenih prehrambenih dodataka. Za razliku od utjecaja na destiliranu vodu, nije došlo do promjena pH vrijednosti u sistemu s proteinima sirutke.

## 5.7. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA ELEKTROPROVODLJIVOST PROTEINSKIH SUSPENZIJA

Vrijednosti električne provodljivosti su se značajno ( $p < 0,05$ ) povećale kod svih uzoraka, sa najvećim povećanjem nakon tretmana sondom od 20 kHz kroz 30 minuta kod izolata (1,61 mS/cm na 1,92 mS/cm) i koncentrata proteina sirutke (3,87 mS/cm na 4,62 mS/cm), a kod  $\alpha$ -laktalbumina (2 mS/cm na 2,27 mS/cm) i hidrolizata proteina sirutke (4,44 mS/cm na 5,05 mS/cm) tretmanom sonde od 20 kHz kroz 15 minuta (slika 61). Postoji velik broj radova, kojima se dokazalo stvaranje slobodnih radikala tijekom sonifikacije (Petrier i sur., 1992; Makino i sur., 1983; Hart i Henglien, 1985), koji vode do povećanja elektroprovodljivosti. Visoke lokalne temperature i tlakovi koji rezultiraju kavitacijom, vode ka stvaranju slobodnih radikala i drugih supstancija, tako da ultrazvuk može inducirati stvaranje oksidanata. To može poboljšati, neke analitičke procedure bazirane na reakcijama oksidacije, pošto se neke tvari koje su elektron akceptori mogu stvoriti u sonificiranom mediju (stvaranje vodikovog peroksida iz  $H^+$  i  $OH^-$  radikala). Isto tako, djelovanjem ultrazvuka dolazi do odmatanja proteinske molekule i promjene tercijarne i kvaterne strukture, te hidrofobne grupe iz unutrašnjosti molekule dolaze na površinu te dolazi do povećanja elektroprovodljivosti. S druge strane došlo je do smanjenja električne provodljivosti primjenom ultrazvučne kupelji od 40 kHz i 500 kHz kroz 15 i 30 minuta kod svih uzoraka. Ovo smanjenje može se objasniti prisutnošću ionskih agregata koji nisu uključeni u proces provodljivosti, te sa povećanom viskoznošću koja će isto tako rezultirati u smanjenoj provodljivosti (Bohnke i sur., 1993; Southall i sur., 1996). To se isto tako može objasniti činjenicom da je aktivna kavitacijska površina u slučaju kupelji veća od one u slučaju sonde (56 puta veća).

## 5.8. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA PROMJENE TEMPERATURA PROTEINSKIH SUSPENZIJA TIJEKOM TRETMANA

Ultrazvučna snaga, koja se smatra mehaničkom energijom, djelomično se gubi u obliku topline kada ultrazvučni val prolazi kroz medij (Thompson i Doraiswamy, 1999). Mjerenja temperatura prikazana su na slici 63. Najveće povećanje temperatura nakon tretmana ultrazvukom je nakon tretmana sondom od 20 kHz, gdje je došlo do povećanja temperature sa 23 °C na 42–46 °C te sondom od 30 kHz gdje je došlo do najvećeg povećanja temperature kod tretiranja uzoraka WPC30UZ10 + G sa 19,4 °C na 47,8 °C i IP30UZ10 + C sa 18,4 °C na 43,8 °C što je još uvijek ispod temperature denaturacije proteina (Giroux i Britten, 2004). Nakon tretmana ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz, temperatura je porasla sa 23 °C na 34 °C odnosno 29 °C. To je logično jer je i energija koja se unosi u sistem najveća tretmanom sondama od 30 kHz i 20 kHz, za razliku od kupelji, a višak energije oslobađa se u obliku topline što rezultira porastom temperature. Isto tako iz slike 64, se vidi da je najveći prosječan porast temperature nakon tretmana sondom od 30 kHz kroz 10 minuta (25,4 °C i 28,4 °C) te sondom od 20 kHz kroz 30 minuta (21,7 °C), zatim kupelji od 40 kHz (8,7 °C), a najmanji tretmanom kupelji od 500 kHz (5,2 °C). Ovo se može objasniti činjenicom, da su suspenzije tretirane sondama izložene većem ultrazvučnom intenzitetu, a i drugačiji je način tretmana. Kod tretmana sondama, sonda je uronjena direktno u suspenzije čime se poboljšava kontakt između vrha sonde koji stvara mehaničke vibracije i uzoraka. Kod tretiranja kupeljima, suspenzije su uronjene u kupelji, te nije došlo do direktnog kontakta sa tretirajućom površinom. Na slici 65. vidi se utjecaj ultrazvuka na porast temperature destilirane vode nakon tretmana različitih frekvencija i duljina tretiranja. Najveći je porast nakon tretmana sondom od 20 kHz kroz 30 minuta, gdje je porast od 18 °C na 35 °C. Blaži je porast nakon tretmana ultrazvučnom kupelji frekvencije 40 kHz kroz 30 min od 18 °C na 25 °C, te nakon tretiranja ultrazvučnom kupelji od 500 kHz kroz 30 min gdje je porast od 18 °C na 22 °C.

Iz slike 66. vidi se da je nakon dodataka metil celuloze i guar gume, i tretiranja ultrazvukom od 30 kHz došlo do porasta temperature suspenzije. Najveći porast kod suspenzija izolata proteina sirutke bez dodataka je nakon tretiranja od 10 min (porast 24,5 °C), nakon dodatka metil celuloze i tretiranja 10 min porast je 25,4 °C, a nakon dodatka guar gume 24 °C. Iz slike 67. vidi se da je došlo do porasta temperatura suspenzija nakon tretiranja ultrazvukom. Najveći porast kod suspenzija koncentrata proteina sirutke bez dodataka je

nakon tretiranja od 10 min (porast 26,8 °C), nakon dodatka metil celuloze i tretiranja 10 min porast je 24,2 °C, a nakon dodatka guar gume 28,4 °C.

## 5.9. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA REOLOŠKA SVOJSTVA PROTEINSKIH SUSPENZIJA

Reološka svojstva važna su za ponašanje proteina sirutke u sistemima hrane, jer na to utječu interakcije proteina s vodom. Reološka svojstva ispitivanih suspenzija proteina izražena su koeficijentom konzistencije i indeksom tečenja, te su adekvatno opisana Ostwald de Waele-ovim zakonom budući da je koeficijent regresije za navedene suspenzije bio izrazito visok (0,99) (tablica 22).

Određivanje reoloških svojstva pokazalo je da suspenzije imaju nenenewtonski karakter, odnosno da ih karakterizira dilatantan tip tečenja ( $n > 1$ , tablica 22). Najveću prividnu viskoznost (kod brzine smicanja  $1290 \text{ s}^{-1}$ ) imao je 10%-tni modelni sustav netretiranih hidrolizata proteina sirutke (8 mPa s), dok je najmanja prividna viskoznost zabilježena kod 10%-tnog modelnog sustava  $\alpha$ -laktalbumina (6 mPa s). Također je uočeno, da sve suspenzije hidrolizata proteina sirutke imaju veći koeficijent konzistencije u odnosu na suspenzije izolata proteina sirutke, što je povezano s većom sposobnošću za protein-protein međudjelovanje nakon enzimske hidrolize, a to dovodi do agregacije i povećanja viskoznosti (Herceg i Lelas, 2005.; Timasheff, 1993). Također, za očekivati je da se neke konformacijske promjene, koje su posljedica enzimske hidrolize, manifestiraju djelomičnim odmotavanjem proteinske uzvojnice čime se oslobađaju nova mjesta za vezanje vode, a direktna posljedica je povećanje viskoznosti sustava (Michel i sur., 2001). Male vrijednosti prividnih viskoznosti (oko 7 mPa s<sup>n</sup>), omogućuje njihovu primjenu kao dodataka sa izvrsnom tehnološkom i funkcionalnom, te nutritivnom vrijednošću u tekuće namirnice kao teksturalne dodatke (Patočka i sur., 2006). Zanimljivo je primijetiti da se nakon tretiranja ultrazvukom nije promijenio tip tečenja. Sve suspenzije pokazuju i dalje nenenewtonski karakter, odnosno da ih karakterizira dilatantan tip tečenja. Isto tako nije došlo do statistički ( $p > 0,05$ ) značajnog povećanja koeficijenta konzistencije ( $k$ ) modelnih suspenzija pripremljenih s izolatima, hidrolizatima,  $\alpha$ -laktalbuminom i koncentratima proteina sirutke. Na slikama 68-71 prikazane su krivulje ovisnosti napona smicanja (Pa) u ovisnosti o brzini smicanja (1/s). Iz krivulja se vidi da je jedino do nekih vidljivih promjena viskoznosti došlo kod suspenzija koncentrata proteina sirutke.

### 5.9.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA REOLOŠKA SVOJSTVA MODELNIH SUSTAVA PROTEINA SIRUTKE I DODATAKA

Nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, kod svih uzoraka je došlo do utjecaja na reološke značajke ispitivanih suspenzija. Reološka svojstva ispitivanih suspenzija proteina izražena su koeficijentom konzistencije i indeksom tečenja, te su adekvatno opisana Ostwald de Waele-ovim zakonom budući da je koeficijent regresije za navedene suspenzije bio izrazito visok (0,99) (tablice 23 i 24). Na slikama 72-75 prikazane su krivulje ovisnosti napona smicanja (Pa) u ovisnosti o brzini smicanja (1/s). Određivanje reoloških svojstva pokazalo je da suspenzije imaju nenevtonski karakter, odnosno da ih karakterizira dilatantan tip tečenja ( $n > 1$ ), uz izuzetak modelnih suspenzija koji su pripremljeni s guar gumom i izolatima proteina sirutke i tretirani kroz 3 i 5 min (pseudoplastični sustav,  $n < 1$ ) te modelnih suspenzija koncentrata proteina sirutke i dodatka guar gume tretiranih 5 min. Nakon tretiranja uzoraka padaju vrijednosti indeksa tečenja kod svih uzoraka. Tretiranjem ultrazvukom od 30 kHz nije došlo do značajne ( $p > 0,05$ ) promjene prividne viskoznosti, osim kod sustava pripremljenih s guar gumom. Najveću prividnu viskoznost (kod brzine smicanja  $1290 \text{ s}^{-1}$ ) imao je modelni sustav izolata proteina sirutke s dodatkom guar gume i tretmanom od 5 min ( $18 \text{ mPa s}^n$ ) i te isti modelni sustav s koncentratima proteina sirutke ( $16 \text{ mPa s}^n$ ), dok je najmanja prividna viskoznost nakon tretmana ultrazvukom zabilježena kod 10%-tnog modelnog sustava tretiranih izolata i koncentrata proteina sirutke bez dodataka (6 i 7  $\text{mPa s}$ ). Međutim, došlo je do statistički značajnih ( $p < 0,05$ ) promjena koeficijenta konzistencije ( $k$ ) tretiranih modelnih sustava s najvećim povećanjem kod sustava s dodatkom guar gume (kod izolata proteina sirutke:  $34,87 \text{ mPa s}^n$  i  $69,51 \text{ mPa s}^n$ , te koncentrata proteina sirutke  $31 \text{ mPa s}^n$ ). Također je uočeno, da sve tretirane suspenzije proteina sirutke imaju veći koeficijent konzistencije. Gubitak tercijarne strukture globularnih proteina sirutke tijekom denaturacije uzrokovane kavitacijom, vodi do povećanja volumena koji je zauzet proteinima. Smatra se da se viskoznost povećava ako je više denaturiranih proteina prisutno u suspenziji. Došlo je do stvaranja agregata što vodi do povećanja otpora tečenju, koje vodi do povećanja prividne viskoznosti ispitivanih sustava. Odmatanje proteina kao što su globularni proteini sirutke praćeno je bubrenjem, te povećanjem hidrodinamičkog radijusa molekula proteina, te većeg intermolekularnog zapletanja, što sve vodi do povećanja viskoznosti (Rattray i Jelen, 1995). To povećanje viskoznosti može se objasniti sposobnošću novo stvorenih globula proteina sirutke, da vežu veće količine vode pošto su hidrofilni dijelovi amino kiselina okrenuti prema vanjskom djelu proteinske globule (Ipsen i sur., 2000).

## 5.10. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA TEMPERATURE FAZNIH PROMJENA PROTEINSKIH SUSPENZIJA

Ispitivanje temperatura faznih promjena vrlo je bitno za razumijevanje pojava koje se dešavaju tijekom zamrzavanja namirnica. Diferencijalnom metodom ispitan je utjecaj tretmana ultrazvukom na modelne sustave proteina sirutke. Došlo je do značajnog ( $p < 0,05$ ) snižavanja inicijalnih temperatura zamrzavanja modelnih suspenzija nakon tretiranja ultrazvukom, s najvećim utjecajem sonde od 20 kHz (tablice 25 – 30). Ultrazvuk uzrokuje brže i jednoličnije stvaranje centara kristalizacije, te bolji kontakt aminokiselina i vode zbog promjena u konformaciji proteina. Manje čestice proteina smanjuju vrijeme između inicijacije i kristalizacije, te kompletnog stvaranja leda. To je uzrok akustične kavitacije koja se sastoji od stvaranja, rasta i naglog kolapsa malih mjehurića ili praznina u tekućini (Simal i sur., 1998), gdje kavitacijski mjehurići djeluju kao nukleusi za rast kristala ili raspadom već prisutnih nukleusa (Mason, 1998). Isto tako, djelovanjem ultrazvuka dolazi i do smanjenja molekularne mase proteina, te izlaganja velikog broja nabijenih ogranaka amino kiselina koji vežu veće količine vode u usporedbi s netretiranim modelnim uzorcima (Lelas i Herceg, 2002). Broj nabijenih amino kiselinskih ogranaka čvrsto je povezano sa količinom vode, te utječe na temperature zamrzavanja. Veće sniženje temperature zamrzavanja primijećeno je kod uzoraka koncentrata proteina sirutke (tablica 26), zbog prisutnosti drugih komponenti kao što su masti i laktoza prema Raoult-ovom zakonu. Oni mijenjaju količinu zamrznute vode, kod dane temperature, te inhibiraju rast kristala leda (Hartel, 1998). Utjecaj ultrazvuka na snižavanje temperature zamrzavanja, proizlazi iz već ranije spomenutih promjena u konformaciji proteina. Kad su dijelovi proteinske molekule odmotani, grupe koje su sposobne stvarati vodikove veze mogu stvoriti bolji kontakt sa vodenom fazom i utjecati na količinu vezane (nesmrzljive) vode. Snižavanje temperature zamrzavanja zbog povećane hidrofobnosti i izloženosti hidrofobnih grupa zbog proteinske denaturacije prije su izloženi od Wagner i An'ón (1985). Nije primijećen utjecaj na temperature odmrzavanja.



### 5.10.1. UTJECAJ DJELOVANJA ULTRAZVUKA NA TEMPERATURE FAZNIH PROMJENA MODELNIH SUSTAVA PROTEINA SIRUTKE I DODATAKA

Dodatkom saharoze, mlijeka u prahu, guar gume i metil celuloze te nakon tretmana ultrazvukom došlo je do statistički značajnog ( $p < 0,05$ ) snižavanja temperatura zamrzavanja i odmrzavanja (tablice 29 i 30). Najveće sniženje temperature zamrzavanja je kod modelnih sustava pripremljenih s proteinima i dodatkom metil celuloze  $-0,98$  °C na  $\sim -2,23$  °C, a temperature odmrzavanja kod sustava pripremljenih s proteinima i dodatkom guar gume. Ovaj fenomen je već otprije poznat nakon dodataka ugljikohidrata (Goff i Sahagian, 1996; Hartel, 1998; Tolstoguzov, 2002), te se može objasniti činjenicom da dodaci utječu na nukleaciju i rast kristala leda. Direktni kontakt proteina i vode je termodinamički nepovoljan u prisutnosti šećera (Arakawa i Timasheff, 1982), te je u direktnoj korelaciji s poboljšanjem hidrofobnih interakcija (Phillips i sur., 1994). Ova promjena u sistemu uzrokuje smanjenje interakcija između vode i proteina (Barone i sur., 1992). Djelovanje ultrazvuka na modelne sustave uzrokuje smanjenje u veličini čestica, a to vodi do vezanja veće količine vode na oslobođene hidrofilne dijelove amino kiselina, te snižavanja temperature zamrzavanja (Arakawa i sur., 1990; Xie i Timasheff, 1997). Manje čestice proteina imaju veću slobodnu površinu, te se sposobni za stupanje i stvaranje vodikovih veza s molekulama vode (Lupano i Gonzalez, 1999). Djelovanjem ultrazvuka na polimere (guar guma), dolazi i do uplitanja njihovih lanaca oko rastućih kristala leda, te i to vodi ka sniženju temperatura zamrzavanja (Tolstoguzov, 2002). Dolazi i do razbijanja lanca polimera, a u nekim slučajevima i do polimerizacija kraćih lanaca u ovisnosti o primijenjenom intenzitetu te vrsti molekule i njenoj koncentraciji na koju se djeluje ultrazvukom.

## **6. ZAKLJUČCI**

- ☀ Ispitivanjem je utvrđeno da tretmani ultrazvukom imaju različite utjecaje na fizikalna i funkcionalna svojstva istraživanih sustava.
- ☀ Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje promjena nekih tradicionalnih tehnoloških postupaka proizvodnje pojedinih prehrambenih proizvoda sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava, te povećanja mikrobiološke i kemijske stabilnosti.
- ☀ Upotreba ultrazvuka predstavlja kraći proces koji traje nekoliko minuta, te posljedično tome troši i manje energije u odnosu na tradicionalne tehnološke postupke koji traju i nekoliko sati.
- ☀ Upotreba sonde od 20 kHz kroz 15 min predstavlja najbolju metodu za poboljšanje funkcionalnih svojstava topljivosti, pjenjenja, emulgiranja, te termofizičkih svojstava modelnih sustava proteina sirutke.
- ☀ Na osnovu rezultata utvrđeno je da nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 500 kHz ne dolazi do promjena u ispitivanim svojstvima topljivosti, pjenjenja, emulgiranja, raspodjele veličine čestica, pH vrijednosti, reoloških svojstava i termofizičkih svojstava modelnih sustava proteina sirutke.
- ☀ Na osnovu dobivenih rezultata utvrđeno je da djelovanjem ultrazvuka od 20 kHz i ultrazvučne kupelji od 40 kHz kod svih uzoraka proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke, dolazi do smanjenja veličina čestica, suženja njihove raspodjele, te značajnog povećanja specifične slobodne površine.
- ☀ Djelovanjem ultrazvuka od 20 kHz i ultrazvučne kupelji od 40 kHz utvrđeno je značajno smanjenje molekularne mase i frakcioniranja proteina, osim kod hidrolizata proteina sirutke. Prema dobivenim rezultatima, duži tretman ne pokazuje veće cijepanje proteinskih lanaca.

- ☀ Nakon ultrazvučnih tretmana sondom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz utvrđeno je značajno poboljšanje kapaciteta pjenjenja i stabilnosti pjena kod svih uzoraka. Statistički nije dokazana značajna promjena kapaciteta pjenjenja kod hidrolizata proteina sirutke. Nakon tretmana ultrazvučnom kupelji od 40 kHz utvrđen je najveći porast stabilnosti pjena kod uzoraka hidrolizata proteina sirutke.
- ☀ Na osnovu rezultata tretiranja ultrazvukom od 30 kHz utvrđena su narušena svojstva izolata proteina sirutke. Najveći pad kapaciteta pjenjenja utvrđen je nakon tretmana modelne suspenzije izolata proteina sirutke kroz 5 min, te dodatkom guar gume (10 min) i metil celuloze (3 min) u modelne sustave. Nakon ultrazvučnog tretiranja uzoraka sa dodatkom mlijeka u prahu i saharoze utvrđen je statistički značajan porast kapaciteta pjenjenja kod uzoraka izolata proteina sirutke.
- ☀ Na osnovu dobivenih rezultata utvrđen je porast kapaciteta pjenjenja kod suspenzija koji su pripremljeni s koncentratima proteina sirutke, dodatkom guar gume te dodatkom saharoze i mlijeka u prahu. Kod dodatka metil celuloze dolazi do pada kapaciteta pjenjenja, osim nakon tretmana od 10 minuta gdje dolazi do povećanja kapaciteta pjenjenja.
- ☀ Nakon tretiranja ultrazvukom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, na osnovu dobivenih rezultata utvrđeno je povećanje indeksa aktiviteta emulzije (IAE) kod svih uzoraka. Statistički značajno povećanje IAE utvrđeno je kod uzoraka koncentrata proteina sirutke, zatim izolata proteina sirutke,  $\alpha$ -laktalbumina te hidrolizata proteina sirutke.
- ☀ Nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz nastale emulzije pokazivale su značajno veću stabilnost, osim kod uzoraka s  $\alpha$ -laktalbuminom.

- ☀ Na osnovu dobivenih rezultata, utvrđen je značajan pad indeksa aktiviteta emulzija (IAE) i stabilnosti emulzija nakon tretiranja suspenzija izolata proteina sirutke sondom od 30 kHz pripremljenih s dodacima metil celuloze, guar gume, saharoze i mlijeka u prahu. Za emulzije pripremljene s koncentratima proteina sirutke i dodacima metil celuloze, mlijeka u prahu i guar gume, utvrđeno je povećanje IAE, a za sve suspenzije koncentrata proteina sirutke pripremljenih s dodacima pad stabilnosti emulzija.
- ☀ Dobiveni rezultati nakon tretmana ultrazvukom od 20 kHz pokazuju povećanje topljivosti kod uzoraka koncentrata proteina sirutke i  $\alpha$ -laktalbumina u usporedbi s netretiranim, dok ne dolazi do značajne promjena topljivosti kod uzoraka izolata proteina sirutke i hidrolizata proteina sirutke. Upotrebom ultrazvučnih kupelji od 40 kHz i 500 kHz ne dolazi do značajnog utjecaja na topljivost.
- ☀ Nakon dodataka guar gume i metil celuloze u modelne sustave pripremljene s izolatima proteina sirutke, ne dolazi do značajnog smanjenja topljivosti nakon tretiranja sondom od 30 kHz. Međutim, tretiranjem 10 % suspenzija izolata proteina sirutke bez dodataka utvrđen je značajan pad topljivosti proteina sirutke s istim tretmanima i vremenima tretiranja. Nakon dodataka guar gume i metil celuloze u modelne sustave pripremljene s koncentratima proteina sirutke utvrđeno je značajno smanjenje topljivosti nakon tretiranja sondom od 30 kHz. Isto tako i tretiranje 10 % suspenzija koncentrata proteina sirutke bez dodataka pokazalo je značajan pad topljivosti proteina sirutke s istim tretmanima i vremenima tretiranja.
- ☀ Nije došlo do značajnih promjena pH vrijednosti modelnih suspenzija proteina sirutke.
- ☀ Utvrđeno je značajno povećanje vrijednosti električne provodljivosti kod svih uzoraka, sa najvećim povećanjem nakon tretmana sondom od 20 kHz. S druge strane utvrđeno je smanjenje električne provodljivosti primjenom ultrazvučnih kupelji od 40 kHz i 500 kHz kroz 15 i 30 minuta kod svih uzoraka.

- ☀ Nakon tretiranja modelnih sustava ultrazvukom od 20 kHz, te ultrazvučnim kupeljima od 40 kHz i 500 kHz, na osnovu dobivenih rezultata utvrđeno je da ne dolazi do promjene tipa tečenja. Sve suspenzije pokazuju i dalje nenevtonski karakter, odnosno karakterizira ih dilatantan tip tečenja ( $n > 1$ ). Isto tako ne dolazi do statistički značajnog povećanja koeficijenta konzistencije ( $k$ ) modelnih suspenzija.
- ☀ Najveće vrijednosti prividne viskoznosti i koeficijenta konzistencije, nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz, utvrđene su kod modelnog sustava izolata proteina sirutke s dodatkom guar gume i tretmanom od 5 min, te kod istog modelnog sustava s koncentratima proteina sirutke. Najmanja prividna viskoznost nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz zabilježena je kod 10%-tnog modelnog sustava tretiranih izolata i koncentrata proteina sirutke bez dodataka.
- ☀ Utvrđene su statistički značajne promjene koeficijenta konzistencije ( $k$ ) tretiranih modelnih sustava s najvećim povećanjem kod sustava s dodatkom guar gume. Također je uočeno, da sve tretirane suspenzije proteina sirutke s dodacima imaju veći koeficijent konzistencije u odnosu na netretirane uzorke.
- ☀ Utvrđeno je značajno ( $p < 0,05$ ) snižavanje inicijalnih temperatura zamrzavanja modelnih suspenzija nakon tretiranja ultrazvukom od 20 kHz i ultrazvučnom kupelji od 40 kHz, s najvećim utjecajem sonde od 20 kHz. Nije utvrđen utjecaj na temperature odmrzavanja.
- ☀ Dodatkom saharoze, mlijeka u prahu, guar gume i metil celuloze u modelne sustave, te nakon tretmana ultrazvukom od 30 kHz utvrđeno je statistički značajno ( $p < 0,05$ ) snižavanje temperatura zamrzavanja i odmrzavanja. Najveće sniženje temperature zamrzavanja je kod modelnih sustava pripremljenih s koncentratima proteina sirutke i dodatkom metil celuloze, a temperature odmrzavanja kod sustava pripremljenih s koncentratima proteinima sirutke i dodatkom guar gume.

## **7. LITERATURA**

- ◆ Adebowale K.O. i Lawal O.S.(2003) Foaming, gelation and electrophoretic characteristics of mucuna bean proteins concentrates. *Food Chemistry*, **83**, 237–246.
- ◆ Alber, T. (1989) Stabilization Energies of Protein Conformation. U: *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (G.D. Fasman, ured.), 161-192, Plenum.
- ◆ Albertsson, P.-A. (1971) *Partition of cell particles and macromolecules*, New York, Wiley.
- ◆ Apenten, R. K. O., Buttner, B., Mignot, B., Pascal, D., Povey, M. J. W. (2000) Determination of the adiabatic compressibility of bovine serum albumen in concentrated solution by a new ultrasonic method. *Food Hydrocolloids*, **14**, 83–91.
- ◆ Arakawa, T. i Timasheff, S. N. (1982) Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, **21**, 6536–6544.
- ◆ Arakawa, T., Bhat, R., i Timasheff, S. N. (1990) Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry*, **29**, 1924–1931.
- ◆ Baianu, I. C. (1990) *Physical Chemistry of Food Processes*, **1**, AVI
- ◆ Barone, G., Del Vecchio, P., Giancola, C. i Notaro, G. (1992) Conformational stability of proteins and peptide–peptide interactions in the presence of carbohydrates. *Thermochimica Acta*, **199**, 189–196.
- ◆ Behrend, O. i Schubert, H. (2001) Influence of hydrostatic pressure and gas content on continuous ultrasound emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, **8**, 271–276.
- ◆ Berg, J.M, Tymoczko, J.L i Stryer, L. (2001) *Biochemistry*, 5 izdanje, W.H. Freeman, 2001; ISBN 0-7167-3051-0. <http://bcs.whfreeman.com/biochem5/>
- ◆ Besseling, N.A.M. (1997) Theory of Hydration Forces Between Surfaces, *Langmuir* **13**, 2113-2122.



- 
- ◆ Bird, J. (1996) The application of membrane systems in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **49**, 16-23.
  - ◆ Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., van Vliet, T., van der Linden, E., i van Aken, G. A. (2004) Dextran-induced depletion flocculation in oil-in-water emulsions in the presence of sucrose. *Food Hydrocolloids*, **18(5)**, 857–863.
  - ◆ Bohnke, O., Frand, G., Rezrazi, M., Rousselot, C., Truche, C. (1993) Fast ion transport in new lithium electrolytes Gelled with PMMA. 2. Influence of lithium salt concentration. *Solid State Ionics*, **66**, 105.
  - ◆ Bos, M., i van Vliet, T. (2001) Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, **91**, 437–471.
  - ◆ Branden, C., i Tooze, J. (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York.
  - ◆ Britten, M., Giroux, H., Gaudin, V. (1994) Effect of pH during heat processing of partially hydrolyzed whey protein. *Journal of Dairy Science*, **77 (3)**, 676–684.
  - ◆ Bryant, C. M., i McClements, D. J. (1998) Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science and Technology*, **9**, 143–151.
  - ◆ Brownlow, S., Cabral, J.H.M., Cooper, R., Flower, D.R., Yewdall, S.J., Polikarpov, I., North, A.C.T., Sawyer, L. (1997) Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure*, **5**, 481–495.
  - ◆ Buckin, V., i Smyth, C. (1999) High-resolution ultrasonic resonator measurements for analysis of liquids. *Seminar on Food Analysis*, **4**, 113–130.
  - ◆ Butz, P., i Tauscher, B. (2002) Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, **35 (2/3)**, 279– 284.

- 
- ◆ Bylund, G. (1995) *Dairy processing handbook*, Tetra Pak, Processing Systems AB, Lund Sweden, 17.
  - ◆ Caessens, P.W., De Jongh, H.H., Norde, W., Gruppen, H. (1999) The adsorption-induced secondary structure of beta-casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochimica Biophysica Acta*, **1430**, 73–83.
  - ◆ Cano, M. P. (1996) *Vegetables, U: Freezing Effects on Food Quality*, Jeremiah L E (ured.), Marcel Dekker, Inc.: New York, USA, 247-298.
  - ◆ Cao, Y. H., Dickinson, E., i Wedlock, D. J. (1990) Creaming and flocculation in emulsions containing polysaccharide. *Food Hydrocolloids*, **4**, 185–195.
  - ◆ Ciccolini, L., Taillandier, P., Wilhem, A. M., Delmas, H., i Strehaiano, P. (1997) Low frequency thermosonication of saccoromices cerevisiae suspensions: Effects of temperature and ultrasonic power. *Chemical Engineering Journal*, **65**, 145-149.
  - ◆ Cheftel, J.C., Ciq, J.L., Lorient, D. (1985) Amino acids, peptides and proteins. U: Fanema, O.R. (ured.), *Food Chemistry*, vol. 2. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 245–369.
  - ◆ Clarkson, J. R., Cui, Z. F., Darton, R. C, Clarkson, J. R., i Coll, J. (1999) Protein denaturation in foam: II. Surface activity and conformational change. *Journal of Colloid and Interface Science*, **215(2)**, 333–338.
  - ◆ Coke, M., Wilde, P. J., Russell, E. J. i Clark, D.C. (1990) The influence of surface composition and molecular diffusion on the stability of foams formed from protein detergent mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science*, **138**, 489-503.
  - ◆ Corradini, C. (1998) Functional properties of whey proteins in foods. *Scienza e Technca Lattiero Casearia*, **49**, 204-213.
  - ◆ Cornec, M., Kim, D.A. i Narsimhan, G. (2001) Adsorption dynamics and interfacial properties of  $\alpha$ -lactalbumin in native and molten globule state conformation at air-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, **15**, 303–313.

- ◆ Crawford, A. E. (1963) A practical introduction to ultrasonic cleaning. *Ultrasonics*, **1**, 65.
- ◆ Dalgleish, D.G., i Hunt, J.A. (1995) Protein – Protein Interactions in Food Materials. U: *Ingredient interactions. Effects on food quality* (Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G.W., Tannenbaum, S.R., Walstra, P., Whitaker, J.W., ured.), Marcel Dekker Inc.: New York, 199-231.
- ◆ Damodoran, S. (1996) Amino acids, peptide and proteins, U: *Food Chemistry*, Fennema. O R. (ured.), Marcel Dekker.Inc., New York, 15-21.
- ◆ Damodoran, S. (1997) Food proteins: an overview. In *Food Proteins and their Applications*; Damadoran, S., Paraf, A. (ured.); Marcel Dekker Inc., New York, 1-24.
- ◆ Delaney, R.A.M. (1976) Composition, properties and uses of whey protein concentrates. *Journal of the Society of Dairy Technology*, **29**(2), 91-101.
- ◆ Delgado, E. i Sun, Da-Wen (2001) Heat and Mass Transfer Models for Predicting Freezing Processes – A Review. *Journal of Food Engineering*, **47**, 157-174.
- ◆ Dickinson, E. (1992) Introduction to Food Colloids, Oxford University Press, London.
- ◆ Dickinson, E., Ma, J., i Povey, M. J. W. (1994) Creaming of concentrated oil-in-water emulsions containing xanthan. *Food Hydrocolloids*, **8**, 481–497.
- ◆ Dickinson, E. (1996) Biopolymer interactions in emulsion systems: influences on creaming, flocculation and rheology. *ACS Symposium Series*, **650**, 197–207.
- ◆ Dickinson, E. (2003) Hydrocolloids at the interfaces and the influence on the properties of dispersed system. *Food Hydrocolloids*, **17**, 25-39.
- ◆ Dickinson, E., i Eriksson, L. (1991) Particle flocculation by adsorbing polymers. *Advances in Colloid and Interface Science*, **34**, 1–29.

- 
- ◆ Dickinson E., Galazka V.B. (1991) Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of  $\beta$ -lactoglobulin with polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, **5**, 281–296.
  - ◆ Dickinson, E., i Stainsby, G. (1982) Colloids in food. London: Applied Science.
  - ◆ Doi, E. (1993) Gels and Gelling of Globular Proteins, *Trends in Food Science & Technology*, **4**, 1-5.
  - ◆ Dumay, E.M., Kalichevsky, M.T., Cheftel, J.C. (1994) High pressure unfolding and aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin and the baroprotective effects of sucrose. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **42**, 1861–1868.
  - ◆ Earnshaw, R. G., Appleyard, J. i Hurst, R. M. (1995) Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, **28**, 197-219.
  - ◆ Ensminger, D. E. (1986) Acoustic Dewatering, Battelle Press, Columbus, Ohio.
  - ◆ Ensminger, D. E. (1998) Acoustic and electroacoustic methods of dewatering and drying. *Drying Tecnology*, **6**, 473.
  - ◆ Evans, D.F. i Wennerstrom, H. (1994) The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet, VCH Publishers, Inc.
  - ◆ Fellows, P. (2000) *Food Processing Technology - Principles and Practice (2 izdanje)*, Woodhead Publishing, Cambridge, UK.
  - ◆ Fennema, O.R. (1996) Water and Ice. U: *Food Chemistry* (O.R. Fennema, ured.), (3 izdanje). Marcel Dekker, Inc.: New York, 17-94.
  - ◆ Floros, J. D. i Liang, H. (1994) Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials: High-intensity ultrasound accelerates diffusion and can be used to improve food processes. *Food Technology*, **79**.

- ◆ Foegeding, E. A., Davis, J. P., Doucet, D., McGuffey, M. K. (2002) Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science Technology*, **13**, 151-159.
- ◆ Fuchs, F. J. (1999) Ultrasonic cleaning: fundamental theory and application. Applications Engineering, Blackstone-Ney Ultrasonics Inc., Jamestown, New York, USA.
- ◆ Galazka, V.B., Dickinson, E., Ledward, D.A. (2000) Influence of high pressure processing on protein solution and emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **5**, 182–187.
- ◆ Gallego-Juarez, J. A. (1988) High power ultrasonic transducers for use in gases and interphases. U: *Power Sonic and Ultrasonic Transducers Design*, Hamonic, B. and Decarpigny, J. N. (ured.), Springer-Verlag: Heidelberg, Germany, 175-184.
- ◆ Gallego-Juarez, J. A. (1998) Some applications of air-bone power ultrasound to food processing, U: *Ultrasound in Food Processing*, Povey, M. J. W. i Mason, T. J. (ured.), Blackie Academic & Professional: Glasgow, UK, 127-143.
- ◆ Gašparević-Ivanek, V. (1999) *Proteini sirutke*, [www.tegobe.com/casopisi](http://www.tegobe.com/casopisi), pristupljeno svibanj, 2008.
- ◆ Genetics Home Reference (2008) A service of the U.S. National Library of Medicine, <<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/igg>>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ Giroux, H. J., i Britten, M. (2004) Heat treatment of whey proteins in the presence of anionic surfactants. *Food Hydrocolloids*, **18**, 685–692.
- ◆ Goff, H. D., i Sahagian, M. E. (1996) Freezing of dairy products. In L. E. Jeremiah (ured.), *Freezing affects on food quality*, New York: Marcel Dekker, 299–335.
- ◆ Goh, N. K., Teah, A., i Chia, L. S. (1994) Investigations of the effects of ultrasound on some metal and nonmetal systems. *Ultrasonics Sonochemistry*, **1**, 41.

- ◆ Grönroos, A., Pirkonen, P., Kyllönen, H. (2008) Ultrasonic degradation of aqueous carboxymethylcellulose: Effect of viscosity, molecular mass, and concentration. *Ultrasonics Sonochemistry*, **15**, 644–648.
- ◆ Grönroos, A., Pirkonen, P., Ruppert, O. (2004) Ultrasonic depolymerization of aqueous carboxymethylcellulose. *Ultrasonics Sonochemistry*, **11**, 9–12.
- ◆ Güzey, D., Gülseren, I., Bruce, B. i Weiss, J. (2006) Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, **20(5)**, 669-677.
- ◆ Harper, W. J. (1976) Whey protein. *Dairy Industries International*, **43**, 33.
- ◆ Hart, E.J., i Henglien, A. (1985) Free radical and free atom reactions in the sonolysis of aqueous iodide and formate solutions. *Journal of Physical Chemistry*, **89**, 4342–4347.
- ◆ Hartel, R.W. (1998) Phase transition in ice-cream. U: Rao, M.A., Hartel, R.W. (ured.), Phase Transition in Foods, Chemical, Structural and Rheological Changes. Marcel Dekker, New York, USA, 327–368.
- ◆ Hayashi, R., Kawamura, Y., Kunigi, S. (1987) Introduction of High Pressure to Food Processing: Preferential Proteolysis of  $\beta$ -lactoglobulin in Milk Whey. *Journal of Food Science*, **52**, 1107-1108.
- ◆ Henglein, A. (1993) Physicochemical properties of small metal particles in solution: “Microelectrode” reactions, chemisorption, composite metal particles, and the atom-to metal transition. *Journal of Physical Chemistry*, **97**, 5457–5471.
- ◆ Herceg, Z. i Lelas, V. (2005) The influence of temperature and solid matter content on the viscosity of whey protein concentrates and skim milk powder before and after tribomechanical treatment, *Journal of Food Engineering*, **66**, 433-438
- ◆ Herceg, Z., Lelas, V., Škreblin, M. (2002) Rheological properties of tribomechanically treated whey proteins. *Food Technology and Biotechnology*, **40**, 145–156.

- ◆ Horiuchi, T., Fukushima, D., Sugimoto, H., Hattori, T. (1978) Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability. *Food Chemistry*, **3**, 35–42.
- ◆ Howell, N.K. (1992) Protein-Protein Interactions. U: *Biochemistry Food Proteins* (B.J.F. Hudson, ured.), Elsevier Applied Science: London, 35-74.
- ◆ Hvidt, A. i Westh, P. (1992) Stabilization and Destabilization of Protein Conformations. U: *Protein Interactions* (H. Visser, ured.), VCH Publishers: London, 327-343.
- ◆ Ipsen, R., Otte, J., Dominguez, E., Qvist, K.B. (2000) Gelation of whey protein induced by proteolysis or high pressure treatment. *Australian Journal of Dairy Technology*, **55**, 49–52.
- ◆ Israelachvili, J. (1992) Intermolecular and Surface Forces (2 izdanje), Academic Press
- ◆ Jang, H.D., i Swaisgood, H.E. (1990) Disulphide bond formation between thermally denatured  $\beta$ -lactoglobulin and  $\kappa$ -casein micelles. *Journal of Dairy Science*, **73**, 900.
- ◆ Jayaprakasha, H.M. i Brueckner, H. (1999) Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. *Journal of Food Science and Technology*, **36**, 189-204.
- ◆ Jovanović, S., Barać, M., Maćej, O. (2005) Serum proteini - osobine i mogućnost primjene. *Mljekarstvo*, **55**, 215-233.
- ◆ Keil, F. J. i Swamy, K. M. (1999) Reactors for sonochemical engineering – present status. *Reviews in Chemical Engineering*, **15(2)**, 85-155.
- ◆ Kilara, A. i Harwalker, V.R. (1996) Denaturation. U: *Food Proteins: Properties and Characterization* (S. Nakai i H.W.Modler, ured.), VCH Publishers, Inc: Dublin, 71-135.
- ◆ Kim, S.M., i Zayas, J.F. (1991) Effects of Ultrasound Treatment on the Properties of Chymosin. *Journal of Food Science*, **56**, 926-930.

- ◆ Kim, H.-J., Decker, E. A., i McClements, D. J. (2003) Influence of sucrose on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51(3)**, 766–772.
- ◆ Kinsella, J.E. (1982) Relationships Between Structure and Functional Properties of Food Proteins. U: *Food Proteins* (P.F. Fox i J.J. Condon, ured.), Applied Science: Dublin, 51-103.
- ◆ Kinsella, J.E. i Whitehead, D.M. (1989) Proteins in Whey: Chemical, Physical and Functional Properties. *Advances in Food & Nutrition Research*, **33**, 343-438.
- ◆ Koning, M.M.G. i Visser, H. (1992) *Protein Interactions* (H.Visser, ured.), VCH Publishers: Oxford, 1-24.
- ◆ Kovačević, Dragan (1997) Određivanje termofizikalnih svojstava smrznute hrane. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- ◆ Krešić, Greta (2005) Utjecaj visokog tlaka na funkcionalna svojstva proteina sirutke. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- ◆ Lelas, V., Herceg, Z. (2002) Influence of tribomechanical treatment on the phase transition temperatures of whey proteins model systems. U: Proceedings of the international conference on innovation in food processing technology and engineering, Bangkok, Thailand, 24–34.
- ◆ Lekkerkerker, H. N. W., Poon, W. C. K., Pusey, P. N., Stroobants, A., i Warren, P. B. (1992) Phase behaviour of colloid polymer mixtures. *Europhysics Letters*, **20(6)**, 559–564.
- ◆ Leman, J. (1999) Emulsification properties of alpha-lactalbumin. *Natural Sciences*, **3**, 35-43.
- ◆ Leighton, T. G. (1998) The principles of cavitation. U: *Ultrasound in Food Processing*. Povey, M. J. W. i Mason, T. J. (ured.), Blackie Academic & Professional: London.



- 
- ◆ Li, B i Sun, D-W. (2002) Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing. *Journal of Food Engineering*, **55(3)**, 277-282.
  
  - ◆ Lieske, B. i Konrad, G. (1996) Physicochemical and functional properties of whey protein as affected by limited papain proteolysis and selective ultrafiltration. *International Dairy Journal*, **6**, 13–31.
  
  - ◆ Lima, M. i Sastry, S. K. (1990) Influence of fluid rheological properties and particle location on ultrasound-assisted heat transfer between liquid and particles. *Journal of Food Science*, **55**, 1112-1115.
  
  - ◆ Lopez-Malo, A., Jimenez-Fernandez, M. i Palou, E. (2001) Penicillium digitatum spores inactivation by combining thermoultrasonication treatments and antimicrobial agents. *IFT 2001 Annual Meeting Technical Program Abstracts*, 151.
  
  - ◆ Ludwig, I., Krause, W. i Hajos, G. (1995) Functional properties of enzymatically modified milk proteins. *Acta Alimentaria*, **24**, 289–296.
  
  - ◆ Lumry, R. i Rajender, S. (1970) Enthalpy-Entropy Compensation Phenomena in Water Solutions of Proteins and Small Molecules: a Ubiquitous Property of Water. *Biopolymers*, **9**, 1125-1227.
  
  - ◆ Lupano, C. E. i Gonzalez, S. (1999) Gelatination of whey protein concentrate-cassava starch in acidic conditions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **47**, 918–923.
  
  - ◆ Maier, H., Anderon, M., Karl, C., Magnuson, K., Whistler, R.L. (1992) Guar, locust bean, tara and fenugreek gums. U: *Industrial gums*, (Whistler, R.L., BeMiller, J.N., ured.), 205-215.
  
  - ◆ Makino, K., Mossoba, M.M. i Riesz, P. (1983) Chemical effects of ultrasound an aqueous solutions. Formation of hydroxyl radicals and hydrogen atoms. *Journal of Physical Chemistry*, **87**, 1369.

- ◆ Malvern Instruments Ltd. (2008) Mastersizer/MS2000/mastersizer  
<<http://www.malvern.com/LabEng/products/Mastersizer/MS2000/mastersizer2000.htm>>.  
Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ Manas, P., Pagan, R., Raso, J., Sala, F.J. i Condon, S. (2000) Inactivation of Salmonella Typhimurium, and Salmonella Senftenberg by ultrasonic waves under pressure. *Journal of Food Protection*, **63** (4), 451–456.
- ◆ Margulis, M.A. i Maltsev, A.N. (1969) Comparative Calorimetric Method for Measurements of Acoustical Power. *Russian Journal of Physical Chemistry*, **43**, 1055-1059. (Translation of Zh.Fiz. Khim.)
- ◆ Margulis, M.A. i Margulis, I.M. (2003) Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. *Ultrasonics Sonochemistry*, **10**, 343–345.
- ◆ Martino, Otero, Sanz i Zaritzky (1998) Size and location of ice crystals in pork frozen by high-pressure-assisted freezing as compared to classical methods. *Meat science*, **50**(3), 303-313.
- ◆ Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing - the way forward. U: *Ultrasound in Food Processing*. Povey, M. J. W. i Mason, T. J. (Ured.), Blackie Academic & Professional: London.
- ◆ Mason, T.J. i Luche, J.L. (1996) Ultrasound as a new tool for synthetic chemists. In: van Eldik, R. and Hubbard, C.D., Editors, 1996. *Chemistry under extreme or non classical conditions*, John Wiley & Sons, Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, New York, pp. 317–380.
- ◆ Mason, T.J., Paniwnyk, L. i Lorimer, J. P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, **3**, 253.
- ◆ Masson, P. (1992) Pressure denaturation of proteins. U: *High pressure and biotechnology*, (Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K., Masson, P., ured.), Colloques INSERM, John Libbey Eurotext Ltd.: Montrouge, **224**, 89-99.

- 
- ◆ McClements, D. J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, **6**, 293.
  - ◆ McClements, D. J. (1997) Ultrasonic Characterization of Foods and Drink: Principles, Methods and Applications. *Journal of Critical Review in Food Science and Nutrition*, **37**, 1-46.
  - ◆ McClements, D. J. (2001) Estimation of steric exclusion and differential interaction contributions to protein transfer free energies in aqueous cosolvent solutions. *Food Hydrocolloids*, **15**, 355–363.
  - ◆ McSwiney, M., Singh, H. i Campanella, O. (1994) Thermal Aggregation and Gelation of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, **8**, 441-453.
  - ◆ Messens, W., Van Camp J., Huyghebaert A. (1997) The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 107–112.
  - ◆ Michel, M., Leser M.E., Syrbe A., Clerc M.F., Bauwens I., Bovetto L., van Schack M.L., Watzke H.J. (2001) Pressure effects on whey protein-pectin mixtures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **34**, 41–52.
  - ◆ Miles, C.A., Morley, M.J., Hudson, W.R., Mackey, B.M. (1995) Principles of separating microorganisms from suspensions using ultrasound. *Journal of Applied Bacteriology*, **78**, 47– 54.
  - ◆ Mishra, S., Mann, B., i Joshi, V. K. (2001) Functional improvement of whey protein concentrate on interaction with pectin. *Food Hydrocolloids*, **15**, 9–15.
  - ◆ Mohanty, B., Mulvihill, D. M., i Fox, P. F. (1988) Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate. *Food Chemistry*, **28(1)**, 17–30.

- 
- ◆ Morel, M.-H., Dehlon, P., Autran, J.C., Leygue, J.P., Bar-L'Helgouac'h, C. (2000) Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chemistry*, **77**, 685–691.
  
  - ◆ Morris, E.R., Cutler, A.N., Ross-Murphy, S.B., Rees, D.A., Price, J. (1981) The fine structures of carob and guar galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, **1**, 5-21.
  
  - ◆ Morr, C.V. (1985) Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates. *Journal Food Science*, **50**, 1406-1411.
  
  - ◆ Morr, C.V. i Foegeding, E.A. (1990) Composition and Functionality of Commercial Whey and Milk Protein Concentrates and Isolates: A Status Report. *Food Technology*, **44**, 100-112.
  
  - ◆ Morr, C.V. i Ha, E.Y.W. (1993) Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **33**, 431–476.
  
  - ◆ Moulton, K.J. i L.C. Wang (1982) A pilot-plant study of continuous ultrasonic extraction of soybean protein. *Journal Food Science*. **47**, 1127.
  
  - ◆ MTT Agrifood Research Finland (2008) Finnish research institute in the agriculture and food sector, <[https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www\\_en](https://portal.mtt.fi/portal/page/portal/www_en)>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
  
  - ◆ Murray (1997) Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, **125**, 73.
  
  - ◆ Nakai, S. i Li-Chan, E. (1988) Hydrophobic Interactions in Food Systems, CRC Press, 33-38.

- 
- ◆ Nagasawa, K., Ohgata, K., Takahashi, K., i Hattori, M. (1996) Role of the polysaccharide content and net charge on the emulsifying properties of b-lactoglobulin–carboxymethyldextran conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 2538–2543.
  
  - ◆ Nakamura, T., Sado, H., Syukunobe, Y. (1993) Production of Low Antigenic Whey Protein Hydrolysates by Enzymatic Hydrolysis and Denaturation with High Pressure. *Milchwissenschaft*, **48**, 141-145.
  
  - ◆ Neelkanth Polymers (2008) The company is part of K.C. India Group of companies and Nolaram Group, <<http://www.npguar.com/aboutguar.htm>>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
  
  - ◆ Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N. i Berdutina, A. V. (2000) Properties and Uses of Protein Hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*; **36(5)**, 452--459.
  
  - ◆ Ngapo, Babare, Reynolds, i Mawson (1999) A preliminary investigation of the effects of frozen storage on samples of pork. *Meat science*, **53(3)**, 169-177.
  
  - ◆ Nyborg, W. L. (1965) *Acoustic Streaming*, **2B**, Academic Press, New York.
  
  - ◆ Ordonez, J.A., Sanz, B., Hernandez, P.E., Lopez-Lorenzo, P. (1984) A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermotolerant streptococci. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 175– 177.
  
  - ◆ Patocka, G., Cervenokova, R., Narine, S., Jelen, P. (2006) Rheological behaviour of dairy products as affected by soluble whey protein isolate. *International Dairy Journal*, **16**, 399–405.
  
  - ◆ Paulsson, M., i Visser, H. (1992) *Protein Interactions* (Visser, H., ured.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 117.
  
  - ◆ Pearce, K. N., i Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidometric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 716-723.

- 
- ◆ Phillips, L. G., Whitehead, D. M., i Kinsella, J. (1994). Structure–function properties of food proteins. London: Academic Press.
  - ◆ Phull, S.S., Newman, A.P., Lorimer, J.P, Pollet, B. i Mason, T.J. (1997) The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. *Ultrasonics Sonochemistry*, **4**, 157-164.
  - ◆ Pine, S.H. (1994) *Organska kemija*, 3. izd. (preveli Bregovec I. i sur.) Školska knjiga, Zagreb, 840.
  - ◆ Petrier, C., Jeunet, A., Luche, J.L., Reverdy, G. (1992) Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound. *Journal of the American Chemical Society*. **114**, 3148.
  - ◆ Poole, S. (1989) The foam-enhancing properties of basic biopolymers. *International Journal of Food Science and Technology*, **24**, 121-137.
  - ◆ Povey, M. J. W., i Mason, T. J. (1998) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London.
  - ◆ Qin, B.Y., Bewley, M.C., Creamer, L.K., Baker, H.M., Baker, E.N., Jameson, G.B. (1998) Structural basis of the Tanford transition of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochemistry*, **37**, 14014–14023.
  - ◆ Rahman, M.S. (1999) Light and sound in food preservation. U: *Handbook of Food Preservation*. Rahman, M.S. (Ured.), Marcel Dekker: New York, 673–686.
  - ◆ Raso, J., Pagan, P., Condon, S., i Sala, F. J. (1998) Influence of temperature and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 465.
  - ◆ Rattray, W., Jelen, P. (1995) Viscous behaviour of whey protein concentrate dispersions. *International Dairy Journal*, **5**, 673–684.

- 
- ◆ Roberts, R. T. (1993) High intensity ultrasonics in food processing. *Chemistry and Industry*, FEB, **15(4)**, 119–121.
  
  - ◆ Sala, F. J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P. i Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation*. Gould, G. W. (Ured.), Blackie Academic & Professional: London.
  
  - ◆ Sastry, S. K., Shen, G. Q., i Blaisdell, J. L. (1989) Effect of ultrasonic vibration on fluid-toparticle convective heat transfer coefficients. *Journal of Food Science*, **54**, 229.
  
  - ◆ Scherba, G., Weigel, R. M., i W.D. O'Brien, J. (1991) Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 2079.
  
  - ◆ Schmidt, R.H., Packard, V.S., Morris, H.A. (1984) Effect of processing on whey protein functionality. *Journal of Dairy Science*, **67**, 2723–2733.
  
  - ◆ Schorsch, C., Garnier, C., Doublier, J.L. (1997) Viscoelastic properties of xanthan/galactomannan mixtures: Comparison of guar gum with locust bean gum. *Carbohydrate Polymers*, **34**, 165-175.
  
  - ◆ Semenova, M. G., Antipova, A. S., i Belyakova, L. E. (2002) Food protein interactions in sugar solutions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, **7**, 438–444.
  
  - ◆ Senapati, N. (1991) *Ultrasound in Chemical Processing, Advances in Sonochemistry 2*, JAI Press, London.
  
  - ◆ Shimada, K. i Cheftel, J.C. (1989) Sulfhydryl Group/Disulfide Bond Interchange Reactions during Heat-Induced Gelation of Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 161-168.
  
  - ◆ Simal, S., Benekito, J., Sanchez, E. S. i Rossello, C. (1998) Use of ultrasound to increase mass transport rates during osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, **36**, 323-336.

- ◆ Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, **150**, 70-76.
- ◆ Southall, J.P., Hubbard, H.V.St A., Johnston, S.F., Rogers, V., Davies, G.R., McIntyre, J.E., Ward, I.M. (1996) Ionic conductivity and viscosity correlations in liquid electrolytes for incorporation into PVDF gel electrolytes. *Solid State Ionics*, **85**, 51.
- ◆ Suslick, K. S. (1988) *Ultrasounds: its Chemical, Physical and Biological Effects*. VHC Publishers, New York.
- ◆ Tesch, S., Gerhards, Ch., i Schubert, H. (2002) Stabilization of emulsions by OSA starches. *Journal of Food Engineering*, **54(2)**, 167–174
- ◆ Thakur, B. R., i Nelson, P. E. (1997) Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Die Nahrung*, **41**, 299.
- ◆ The Dow Chemical Company (1995-2008) Trademark of The Dow Chemical Company ("Dow"), <<http://www.dow.com>>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ The Ohio State University (2008) Department of Food Science & Technology, <[http://fst.osu.edu/degree\\_programs.htm](http://fst.osu.edu/degree_programs.htm)>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ Thompson, L. H. i Doraiswamy, L. K. (1999) Sonochemistry: science and engineering. *Industry Engineering and Chemistry Research*, **38**, 1215-1249.
- ◆ Timasheff, S.N. (1993) The control of protein stability and association by weak interactions with water. *Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure*, **22**, 67-97.
- ◆ Tolstoguzov, V. (2002) Thermodynamic aspects of biopolymer functionality in biological systems, foods and beverages. *Critical Reviews in Biotechnology*, **22(2)**, 89–174.



- ◆ Tratnik, L.J. (1998) Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 345-380.
- ◆ Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., Paquin, P. (1992) Emulsifying properties of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *Journal of Food Science*, **57**, 601–604, 634.
- ◆ USDEC - U.S. Dairy Export Council (2008), <[www.usdec.org/](http://www.usdec.org/)>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ Vanapalli, S. A., Palanuwech, J., i Coupland, J. N. (2002) Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 204, 227.
- ◆ Vassilenko, K.S. i V.N. Uversky (2002) Native-like secondary structure of molten globules. *Biochimica Biophysica Acta*, **1594**, 168–177.
- ◆ Vercet, A., Lopez, P., i Burgos, J. (1997) Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. *Journal of Dairy Science*, **80**, 29.
- ◆ Wikipedia (2008) a multilingual, Web-based, free content encyclopedia project, <<http://en.wikipedia.org/wiki/>>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
- ◆ Villamiel, M. i de Jong, P. (2000a) Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Tryptocase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering*, **45**, 171-179.
- ◆ Villamiel, M. i de Jong, P. (2000b) Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**, 472-478.
- ◆ Vrij, A. (1976) Polymers at interfaces and the interactions in colloidal systems. *Pure and Applied Chemistry*, **48**, 471–483.

- 
- ◆ Wagner, J.R., An'ón, M.C. (1985) Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. *Journal of Food Technology*, **25**, 718–721.
  - ◆ Wallonia international portal (2008) Walloon companies on the web, <[http://www.entreprises-wallonnes.com/index\\_en.php](http://www.entreprises-wallonnes.com/index_en.php)>. Pristupljeno, 10. lipnja 2008.
  - ◆ Wang, L.C. (1975) Ultrasonic extraction of proteins from autoclaved soybean flakes. *Journal of Food Science*, **40**, 549–551.
  - ◆ Wang, L. i Wang, Ya-Jane (2004) Rice starch isolation by neutral protease and high-intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science*, **39** (2), 291-296.
  - ◆ Webb, B. H., Johnson, A. H., Alford, J. A. (1974) *Fundamental of Dairy Chemistry*. The AVI Publusing Company, INC., Westport
  - ◆ Webb, M. F., Maaem H. A., Schmidt, K. A. (2002) Food protein functionality in a liquid system. *Journal of Food Science*, **67**, 2896-2902.
  - ◆ Withers, P. M. (1996) Ultrasonic, acoustic and optical techniques for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment. *Trends in Food Science and Technology*, **7**, 293–298.
  - ◆ de Wit, J.N. i van Kessel, Th. (1996) Effects of ionic strength on the solubility of whey protein products. A colloid chemistry approach. *Food Hydrocolloids*, **10**, 143–149.
  - ◆ Werner, H. (1981) Whey proteins. *Dairy Industries International*, **46**, 33.
  - ◆ Xie, G., i Timasheff, S. N. (1997) Mechanism of the stabilizing of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Science*, **6**, 211–221.
  - ◆ Zadow, J. G. (1986) Utilization of Milk Components Whey. U: *Modern Dairy Technology*, **1** (Robinson, R. K., ured.), London.

- ◆ Zayas, J. F. (1997) *Funcionality of proteins in food*. Berlin: Springer- Verlag.
  
- ◆ Zhu H., i Damodaran S. (1994) Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 846–855.

## ŽIVOTOPIS

Anet Režek Jambrak, dipl. inž. rođena je 26.12.1980. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila je u Zagrebu. 1998. godine upisala je Prehrambeno-biotehnološki fakultet, studij: Prehrambene tehnologije, smjer: Nutricionizam. Diplomirala je 2002. godine s prosjekom ocjena 4,37, te je bila među 10 % najuspješnijih studenata u godini diplomiranja.

Zaposlila se u svibnju 2003. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, u Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Laboratoriju za procesno-prehrambeno inženjerstvo kao stručni suradnik putem Vladinog programa poticajnog zapošljavanja „S faksa na posao“ na projektu *“Razvoj novih funkcionalnih proizvoda i njihova stabilnost”*, Ministarstva znanosti i tehnologije, nositelj projekta, prof. dr. sc. Vesne Lelas. Na 1. sjednici vijeća 29.10.2003. izabrana u suradničko zvanje mlađi asistent. U kolovozu 2004. godine zaposlena je na određeno vrijeme u statusu znanstvenog novaka na istom projektu. Poslijediplomski doktorski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, smjer Nutricionizam – upisala je 2004. godine. Trenutno radi na projektu *“Nove tehnike procesiranja u proizvodnji funkcionalne hrane”*, Ministarstvo znanosti i tehnologije, nositelj projekta, prof. dr. sc. Vesne Lelas.

Sudjelovala je u izvođenju vježbi i seminara na kolegijima: Procesi konzerviranja prehrambenih proizvoda, Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo I, Procesi pripreme hrane i Fizikalna svojstva složenih sustava - hrane, te u izradi diplomskih radova, te drugih poslova u vezi projekta.

Za vrijeme svojeg znanstvenog rada dobitnica je stipendije za znanstveno usavršavanje u Velikoj Britaniji u trajanju od 2 mjeseca. Boravila je tijekom 11. i 12. mjeseca 2005. godine u Coventry-u, Velika Britanija, na Coventry University, Sonochemistry Centre, Faculty of Health and Life Sciences. Radila je na području primjene ultrazvuka u prehrambenom procesiranju, s naglaskom na proučavanju funkcionalnih svojstava proteina sirutke i sušenja odabranog povrća.

Dobitnica je godišnje nagrade Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu za mlade znanstvenike i umjetnike za 2007. godinu. Dobitnica je potpore Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za mlade znanstvenike za 2005. godinu. Dobitnica je stipendije “British Scholarship Trust”-a za znanstveno-stručno usavršavanje u Velikoj Britaniji, te je dobitnica stipendije Vlade Francuske Republike za znanstveno-stručno usavršavanje u Compiègn-u, Francuska, *Université de Technologie de Compiègne*, u trajanju od 2 mjeseca. Područje istraživanja: Primjena pulsirajućeg električnog polja u ekstrakciji sokova i stabilnosti teksture voća i povrća.

Članica je Društva sveučilišnih nastavnika i drugih znanstvenika u Zagrebu, te Kluba prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista – PBN

Autorica je desetak znanstvenih i stručnih radova od kojih je 6 radova iz skupine a1, 2 rada iz skupine a2, 2 rada iz skupine a3, te 2 stručna rada.

Sudjelovala je na znanstvenim skupovima održanim u RH (2) i inozemstvu (4).