

UDK: 637.13:637.045

## SERUM PROTEINI – TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA I MOGUĆNOST PRIMENE

SNEŽANA JOVANOVIĆ, MIROLJUB BARAĆ, OGNJEN MAĆEJ, TANJA VUČIĆ<sup>1</sup>

*IZVOD:* Visoka nutritivna vrednost izražena dobro izbalansiranim odnosom esencijalnih aminokiselina, kao i povoljne fizičko-hemijske osobine čine serum proteine vrlo interesantnim ingredijentima u prehrambenoj i drugim granama industrije. Serum proteini se najčešće koriste u cilju poboljšanja hranljive vrednosti finalnog proizvoda, kao i radi postizanja određenih tehnološko-funkcionalnih svojstava proizvoda, poput obrazovanja pene ili gela, obrazovanja i stabilizacije emulzije. Danas je poznata široka paleta proizvoda na bazi serum proteina, pri čemu su proteinski koncentрати, izolati i hidrolizati našli najširu primenu. Međutim, u savremenoj svetskoj literaturi sve je više podataka o značajnom terapeutskom efektu pojedinih manje zastupljenih serum proteina čak i pri lečenju i najtežih oboljenja, što otvara mogućnost razvoja industrije prečišćenih proteina surutke, koji imaju odbrambenu ulogu u organizmu i terapeutsku funkciju.

**Ključne reči:** serum proteini, funkcionalna svojstva, terapeutski efekat.

### UVOD

Pod pojmom serum proteina podrazumevaju se proteini koji zaostaju u serumu ili surutki nakon precipitacije kazeina pri pH 4.6 i temperaturi od 20°C. Serum proteini, ili proteini surutke čine približno 18-20% ukupnih proteina mleka. Po strukturi to su kompaktni globularni proteini, različitog aminokiselinskog sastava a time i različitih fizičko-hemijskih osobina.

Najvažniji serum proteini su β-laktoglobulin (β-Ig), α-laktalbumin (α-la), albumin krvnog seruma (BSA), proteozo-peptonska frakcija (PP) i imunoglobulini (Ig). Pored ovih proteina, u mlečnom serumu su prisutni i drugi proteini u malim količinama, kao što su laktoferin, laktolin, glikoprotein, krvni transferin, kao i oko 60 različitih indogenih enzima.

Sastav, struktura i osobine dominantnih serum proteina dobro su poznate i obrađene i u našoj literaturi (Jovanović i sar., 2003, 2005a, 2005b, Maćej i sar., 2007). Manje zastupljenim proteinima naši autori su se malo bavili, a u svetskoj literaturi im se

---

Pregledni rad / Review paper

<sup>1</sup>Dr Snežana Jovanović, vanredni profesor, Dr Miroljub Barać, docent, Dr Ognjen Maćej, redovni profesor, Tanja Vučić, dipl. ing. stručni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

poklanja sve veća pažnja. Naime, pozitivna terapijska svojstva manje zastupljenih serum proteina kao što su laktoferin, laktoperoksidaza i tzv. biološki aktivni peptidi čine ih vrlo interesantnim. Zbog toga će se u ovom radu dati kratak prikaz osnovnih karakteristika najzastupljenijih proteina mlečnog seruma, kao i detaljniji prikaz manje zastupljenih komponenti.

### Dominantni serum proteini

***β-laktoglobulin*** ( $\beta$ -lg) je najzastupljeniji protein mlečnog seruma kravljeg mleka.  $\beta$ -laktoglobulin predstavlja oko 50% ukupnih serum proteina i 12% ukupnih proteina mleka. Do skora se smatralo da je  $\beta$ -lg prisutan samo u mleku preživara, međutim danas se zna da i mleko nekih vrsta nepreživara sadrži ovaj protein.  $\beta$ -laktoglobulin je globularni protein molekulske mase 18.300 po monomeru. U mleku se javlja u 6 genetskih varijanti (A, B, A<sub>DR</sub>, B<sub>DR</sub>, C i D) (Gordon i Kalan, 1974), od kojih su varijante A i B najčešće zastupljene.

***α-laktalbumin*** je po zastupljenosti drugi serum protein kravljeg mleka. Čini oko 20% ukupnih serum proteina, ili 2-5% ukupnih azotnih materija mleka. Karakteriše se relativno malom molekulskom masom (oko 14.200) i javlja se u dve genetske varijante A i B, molekulske mase 14.146 i 14.174 (Swaisgood, 1993).  $\alpha$ -la je metaloprotein jer vezuje jedan jon  $Ca^{2+}$  po molu i to na mestu petlje koja sadrži četiri ostatka asparagina (Berliener i sar., 1991). Molekul  $\alpha$ -la u kompleksu sa jonima kalcijuma je izuzetno stabilan pri dejstvu povišenih temperatura (termički najstabilniji serum protein).

Kravlje mleko sadrži malu količinu ***BSA***. Ovaj protein predstavlja 6.6% proteina mlečnog seruma, odnosno 0.3–1.0% ukupnih azotnih materija mleka (Fox i McSweeney, 1998). U mleko dospeva preko krvi. Prema de Wit i Klarenbeek-u (1983), molekulska masa albumina krvnog seruma iznosi 66.000, mada Aslam i Hurley (1997) navode molekulska masu od 68.000. Sastoji se od 582 aminokiselinska ostatka. Sadrži 35 cisteinskih ostataka po molu; 34 cisteinska ostatka učestvuju u formiranju 17 disulfidnih intermolekulskih mostova, dok jedan egzistira kao slobodan i daje slobodnu –SH grupu (de Wit i Klarenbeek, 1983).

Mleko sadrži pet klasa ***imunoglobulina*** i to: imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin G (IgG), imunoglobulin D (IgD), imunoglobulin E (IgE) i imunoglobulin M (IgM). Mleko sadrži imunoglobuline u koncentraciji od 0.6-1 g/l, što predstavlja približno 3% ukupnih azotnih materija mleka. Međutim, njihov sadržaj u kolostrumu je znatno veći i može biti i do 100 g/l (Fox i McSweeney, 1998). Najzastupljeniji Ig mleka je imunoglobulin G, koji predstavlja 80% svih imunoglobulina (de Wit i Klarenbeek, 1983). IgG se u mleku javlja u vidu podklasa, IgG<sub>1</sub> i IgG<sub>2</sub>. Imunoglobulin G<sub>1</sub> je molekulske mase 160.000 i u mleku je zastupljen sa 0.04%, dok je IgG<sub>2</sub> zastupljen sa 0.005%. IgG se sastoji od dva teška (H) i dva laka polipeptidna lanca (L), međusobno povezana disulfidnim vezama.

***Proteozo-peptonsku frakciju (PP)*** čine termički stabilni fosfoglikoproteini. Ova frakcija obično se definiše kao frakcija proteina, koja zaostaje u serumu nakon termičke obrade mleka na 95°C u toku 20 minuta i pri pH 4.7. Proteini ove frakcije precipitiraju pod dejstvom 12% trihlorsirćetne kiseline (TCA). Proteozo-peptonska frakcija predstavlja 2–6% proteina obranog mleka, odnosno oko 1.1% ukupnih proteina mleka. Čine je četiri glavne komponente, koje su u literaturi označene kao proteozo-peptonska komponenta 3 (PP3), proteozo-peptonska komponenta 5 (PP5), proteozo-peptonska komponenta

ta 8-brza (PP8-brza) i proteozo-peptonska komponenta 8-sporna (PP8-sporna). Pored njih, ovu frakciju čine i neke druge znatno manje zastupljene komponente. Prema dosadašnjim saznanjima, PP komponente 5 i 8 predstavljaju produkte delimične hidrolize kazeina, odnosno predstavljaju fragmente kazeina. Komponente ove frakcije su malih molekulskih masa i kreću se u intervalu 4.100– 20.000.

### Manje zastupljeni serum proteini

Pored prethodno razmatranih proteina, u mleku je detektovan i ceo spektar drugih manje zastupljenih proteina kao što su: transferin, laktoferin,  $\beta_2$ -mikroglobulin, M1- i M2- glikoproteini,  $\alpha_1$ -kiseli glikoprotein, ceruloplazmin i tzv. folat-vezujući protein (Tabela 1).

Tabela 1. Neke osobine manje zastupljenih proteina mleka (Fox, 2003)  
Table 1. Some properties of minor proteins in milk (Fox, 2003)

Protein/ Protein	Molekulska masa/ Molecular mass (Da)	Koncentracija/ Concentration (mg/L)	Poreklo/ Source
$\beta_2$ -mikroglobulin/ $\beta_2$ -Microglobulin	11.636	9.5	Monociti/ Monocytes
Osteopontin/ Osteopontin	60.000	3–10	Mlečna žlezda / Mammary
Proteozo pepton 3/ Proteoso peptone 3	28.000	300	Mlečna žlezda / Mammary
Folat-vezujući protein/ Folate-binding protein	30.000	6-10	–
Vit. D-vezujući protein/ Vit. D-binding protein	52.000	16	Krv/Blood
Vit. B <sub>12</sub> -vezujući protein/ Vit. B <sub>12</sub> -binding protein	43.000	0.1–0.2	–
Angiogenin-1/ Angiogenin-1	14.577	4-8	Mlečna žlezda / Mammary
Angiogenin-2/ Angiogenin-2	14.522	–	–
Kininogen/ Kininogen	68.000/17.000	–	Krv/Blood
Laktoferin/ Lactoferrin	82.000	20–350	Mlečna žlezda / Mammary
Transferin/ Transferrin	77.000	–	Krv/ Blood
Ceruloplazmin/ Ceruloplasmin	132.000	–	Mlečna žlezda / Mammary
A <sub>1</sub> -kiseli glikoprotein/ A <sub>1</sub> - Acid glycoprotein	40.000	< 20	Krv/ Blood
Prosaposin/ Prosaposin	66.000	6.0	Mlečna žlezda/ Mammary
Enzimi/ Enzymes (~60)	Različita/ Various	U tragovima/ Trace	Krv, mlečna žlezda/ Blood, mammary

**Transferin** je protein koji vezuje jone gvožđa. Elektroforetski i imunohemijski identičan je transferinu krvnog seruma. Elektroforetske analize oba proteina ukazuju na izraženi polimorfizam, tako da se detektuju sa nekoliko proteinskih traka. Ovaj protein predstavlja glikoprotein; sadrži kovalentno vezani ugljenohidratni niz, koji se sastoji od N-acetilglukozamina, manoze, galaktoze i N-acetilneuraminske kiseline. Jedan mol transferina vezuje dva feri-mola jona (Jeness, 1982). Molekulska masa ovog proteina i kreće se u intervalu 75.000–77.000.

**Laktoferin** (Lf) je drugi protein koji ima sposobnost vezivanja jona gvožđa. Izolovan je još 1939. godine. Ovaj protein može biti izolovan iz kiselog kazeina, surutke i adsorpcionog sloja kapljica mlečne masti, što ukazuje na različitu distribuciju ovog proteina. Slično transferinu, ovaj protein se elektroforetskim tehnikama detektuje sa nekoliko traka. Molekul laktoferina sa vezanim jonima gvožđa je crvene boje, dok je u njihovom odsustvu bezbojan. Vezuje dva feri-mola jona po molu, i u ovoj formi ima molekulsku masu od 93.000. Međutim, u literaturi su prisutni i drugačiji podaci o njegovoj molekulskoj masi. Prema Leger i sar. (1977), molekulska masa ovog proteina je 77.000. Izo-električna tačka laktoferina je oko pH 9. To znači da je za razliku od većine drugih proteina u mleku u obliku katjona. Sastoji se od 689 aminokiselinskih ostataka. Posедуje tri disulfidne veze. Sadržaj ovog proteina u kravljem mleku varira. Smatra se da laktoferin ima nekoliko bioloških funkcija, kao što je poboljšanje usvajanja gvožđa i bakteriostatičko dejstvo, a ima i antikancerogenu aktivnost, kao i antibakterijsko, antivirusno i antiinflamatorno dejstvo (Fox i McSweeney, 1998, Fox, 2003). Generalno, sadržaj Lf u kravljem mleku je znatno niži od humanog mleka. U humanom mleku Lf predstavlja približno 20% ukupnih azotnih materija (Fox, 2003). S obzirom na biološku funkciju, obogaćivanje kravljeg mleka laktoferinom je od posebnog značaja u proizvodnji mleka za bebe. Delimičnom hidrolizom Lf pod dejstvom pepsina nastaje polipeptid laktofericin koji ima izraženije bakteriostatičko dejstvo, koje je nezavisno od prisustva gvožđa.

**$\beta_2$ -mikroglobulin** je protein koji je homolog konstantnom polipeptidnom nizu imunoglobulina IgG. Prvi put je izolovan DEAE-celuloznom hromatografijom iz kazeina precipitiranog u kiseloj sredini. Prvobitno je nazvan laktolin, ali naknadnom analizom kristala ovog proteina Groves i Greenberg (1977) su pokazali da je tako izolovan predstavljao stabilan tetramer  $\beta_2$ -mikroglobulina. Isti autori utvrdili su i primarnu strukturu ovog proteina. Sastoji se od 98 aminokiselinskih ostataka i ima molekulsku masu od 11.636. Međutim, forma ovog proteina zavisi od njegove koncentracije. Pri jako niskim koncentracijama u rastvoru prisutan je kao monomer, dok pri visokim koncentracijama podleže tetramer konverziji.

**M-1 glikoproteini** su proteini molekulske mase koja se kreće u intervalu 7.200 do 12.000. Frakcije molekulske mase do 7.200 sadrže 24%, dok frakcija molekulske mase od 12.000 sadrži 39% ugljenih hidrata. To su proteini negativno naelektrisani pri pH 4.5 i sadrže fosfatne grupe. Sadrže velike količine glutaminske kiseline, prolina i treonina, a ne sadrže cistein i triptofan. Molekuli krupnijih proteina ne sadrže histidin, tirozin i arginin. Ugljenohidratni niz M-1 glikoproteina sastoji se od galaktoze i glukozamina.

U kravljem kolostrumu detektovano je i prisustvo **M-2 glikoproteina** i  **$\alpha_1$ -kiselog glikoproteina**.  $\alpha_1$ -kiseli glikoprotein se sastoji od jednog polipeptidnog niza izgrađenog od 181 aminokiselinskog ostatka i pet heteropolisaharidnih grupa vezanih preko ostataka asparagina.

**Osteopontin** je visokofosforilovani kiseli glikoprotein. Proteinski deo se sastoji od 261 aminokiselinskog ostatka, tako da je proračunata molekulska masa proteinskog dela 29.283. Molekulska masa celog glikoproteina je oko 60.000. Sadrži 27 ostataka fosfoserina, jedan ostatak fosfotreonina i tri O-glikozilovana treonina. Posедуje i 50 potencijalnih mesta na kojima se mogu vezivati joni kalcijuma i magnezijuma. U uslovima normalnih fizioloških koncentracija na polovinu tih mesta su vezani joni ovih metala. Uloga ovog proteina u mleku nije poznata, ali se može pretpostaviti da mu je jedna od uloga vezivanje jona kalcijuma. Obzirom na niske koncentracije u kojim je prisutan u mleku, kapacitet vezivanja jona  $Ca^{2+}$  u mleku je mali u odnosu na kazein.

**Proteini koji vezuju vitamine.** Pored  $\beta$ -laktoglobulina, u mleku su prisutni i drugi proteini koji vezuju sledeće vitamine: retinol (vit. A), vitamin D, folnu kiselinu, riboflavin i kobalamin ( $B_{12}$ ). Njihova uloga još uvek nije dovoljno jasna. Smatra se da poboljšavaju resorpciju vitamina i da imaju antibakterijsko dejstvo, s obzirom da čine vitamine nedostupnim za bakterije. Koncentracija ovih proteina varira tokom laktacije, mada se još uvek nedovoljno zna o uticaju različitih faktora na njihov sadržaj u mleku.

Najveći deo folne kiseline i njenih derivata u kravljem mleku vezani su za specifičan protein (*engl. folate binding protein, FBP*). Prema Fox-u (2003), ovaj protein se sastoji od jednog polipeptidnog niza koji čine 222 aminokiselinska ostatka i računski dobijena molekulska masa mu je 25.825. Sadrži osam disulfidnih veza i dva ugljenohidratna niza vezana za ostatak asparaginske kiseline u položaju 49 i 141. Ugljenohidratni nizovi čine oko 10% ukupne mase molekula, tako da glikoprotein ima molekulska masu od 30.000. Ugljenohidratni niz ovog glikoproteina čini N-acetilglukozamin, N-acetilgalaktozamin, fukoza, manoza, galaktoza i salicilna kiselina. Nasuprot ovom, Salter i sar. (1972) su ga primenom afinitivne hromatografije na sefarozi sa vezanim folatima okarakterisali kao protein molekulske mase oko 35.000, koji je u mleku prisutan u koncentraciji od oko 8 mg/l. U oblasti pH 5.5 do 8.0 ovaj protein vezuje folnu kiselinu i njene derivate i to jedan mol folata po molu proteina. U sredini sa nižim pH vrednostima dolazi do raskidanja veze između njih.

U mleku nekih životinjskih vrsta utvrđeno je prisustvo proteina koji vezuje vitamin D, a koji je inače prisutan u krvnom serumu u koncentraciji od oko 2%. To je glikoprotein, molekulske mase 52.000, koji predstavlja homolog BSA. Koncentracija ovog proteina je različita u pojedinim fazama; u kolostrumu je najveća, a zatim opada. Slično BSA ovaj protein ima sposobnost vezivanja i masnih kiselina dugog lanca.

Sveže kravlje mleko sadrži i protein koji vezuje riboflavin. Molekulska masa ovog proteina je oko 38.000. Kompleks koji obrazuje sa riboflavinom karakteriše se dobrim antioksidativnim osobinama.

U kravljem mleku utvrđeno je prisustvo kininogena, i to u obliku dve forme: velike molekulske mase (>68.000) i male molekulske mase (16.000–17.000). Hidrolizom forme velike molekulske mase pod dejstvom specifičnog enzima nastaje biološki aktivni protein, bradikinin koji je detektovan u mlečnim žlezdama i koji se luči u mleko iz koga je i izolovan (Fox, 2003).

### Proizvodi na bazi serum proteina

Visoka nutritivna vrednost, povoljne fizičko-hemijske osobine koje daju dobra tehnološko-funkcionalna, kao i terapijska svojstva učinila su serum proteine vrlo ineresantnim u poslednjih dvadeset godina. Surutka koja je izvor ovih visokovrednih proteina uglavnom se koristi za ishranu životinja i to pre svega nepreživara (Jokić i sar., 1998). Međutim, razvojem i usavršavanjem savremenih separacionih postupaka stvorila se mo-

gućnost proizvodnje široke palete proizvoda, koja je bazirana na serum proteinima i mogućnost njihove mnogo šire primene.

Najznačajniji proizvodi na bazi proteina surutke, koji imaju veoma široku primenu u raznim granama prehrambene industrije, farmaceutskoj industriji i dr. su koncentraci proteina surutke (KPS), izolati proteina surutke (IPS) i hidrolizati proteina surutke (HPS). U tabeli 2. dat je pregled postojećih proizvoda, kao i mogućih proizvoda na bazi serum proteina i njihova primena. Pri tome treba istaći da potencijalni proizvodi predstavljaju uglavnom pojedine izolovane serum proteine.

Tabela 2. Proteinski proizvodi na bazi surutke i njihova primena (Bargeman, 2003)\*  
Table 2. Whey-basis protein products and their application (Bargeman, 2003)\*

Proizvod/Products	Primena i potencijalna primena/ Application and potential application
KPS-koncentrat proteina surutke/ WPC-whey protein concentrate	Sredstvo za poboljšanje nutritivnih i funkcionalnih osobina finalnog proizvoda
IPS-izolat proteina surutke/ WPI -whey protein isolate	Sredstvo za poboljšanje nutritivnih i funkcionalnih osobina finalnog proizvoda
HPS-hidrolizat proteina surutke/ HWP-hydrolyzed whey protein	Za poboljšanje nutritivnih i funkcionalnih osobina i u terapijske svrhe
$\beta$ -laktoglobulin/ $\beta$ - Lactoglobulin	Sredstvo za stabilizovanje emulzija, alternativa za kazeinate, belance jajeta i sredstvo za želiranje u prehrambenim proizvodima
$\alpha$ -laktalbumin/ $\alpha$ -Lactalbumin	Za obogaćivanje hrane za odojčad (Chatterton, 2001)
Glikomakropeptid/Glyco- macropeptide (GMP)	Terapijska primena (Coolbear i sar., 1998)
Imunoglobulini /Immunoglobulins IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> , IgA, IgM	Odbrambeni proteini, antimikrobna uloga i zaštita od infekcija (Mallèe i Steijns, 2001)
Laktoferin/ Lactoferrin	Odbrambeni protein, antimikrobna uloga, antivirusna zaštita, olakšava usvajanje gvožđa, antioksidativno sredstvo, antikancerogena svojstva. Primena u ishrani odojčadi, kozmetici, funkcionalnoj hrani i kao aditiv u prevenciji razvoja <i>E. Coli</i> i <i>Salmonelle</i> u svežem mesu (koristi se u SAD) (Mallèe i Steijns, 2001; Li-Chan i sar., 1995)
Laktoperoksidaza/ Lactoperoxidase	Antimikrobna zaštita i funkcija antioksidativnog proteina (Perraudin i Reiter, 1998), koristi se u proizvodnji zubne paste i sredstava za ispiranje usta i grla (Horton, 1998)
Faktori rasta/ Growth factors (TGF-beta, IGF-1, IGF-2, FGF-1, FGF-2, PDGF-BB)	Proteini koji podstiču rast (Mallèe i sar., 2001)

**Koncentrati proteina surutke (KPS)** se odlikuju vrlo širokim rasponom variranja sadržaja proteina, koji se kreće od 35-80% (Van der Horst, 2000). Za pripremu koncentrata proteina surutke koriste se različite tehnike, kao što su tehnike membranskog frakcionisanja (ultrafiltracija, reverzna osmoza, elektrodijaliza, dijaliza, mikrofiltracija), tehnike koje se zasnivaju na taloženju, ili kompleksiranju sa različitim reagensima i tehnike fizičke i hromatografske separacije. Sastav, kvalitet i funkcionalne karakteristike variraju i to u zavisnosti od kvaliteta i porekla surutke, postupaka pripreme, kao i od uslova i čuvanja (Van der Horst, 2000).

**Izolati proteina surutke (ISP)** karakterišu se visokim sadržajem proteina (većim od 90%). Proizvode se primenom tehnike jonske izmene i/ili filtracije tečne surutke. Primenom jonoizmenjivačke hromatografije mogu se dobiti izolati koji sadrže i do 95% proteina (Mullvihill, 1992). Izolati proteina surutke odlikuju se povoljnijim funkcionalnim karakteristikama u odnosu na koncentrate, obzirom da sadrže manje količine soli, laktoze i lipida. Ono što ograničava još uvek njihovu primenu je relativno visoka cena proizvodnje.

**Hidrolizati proteina surutke (HPS).** Delimična enzimska i hemijska hidroliza predstavlja vrlo efikasan način za dobijanje proteinskih preparata strogo definisanih funkcionalnih i nutritivnih osobina (Barać i sar., 2005, 2006). Delimičnom hidrolizom serum proteina pod strogo kontrolisanim uslovima moguće je dobiti proteinski proizvod specifičnih nutritivnih i funkcionalnih osobina, koji se može primeniti za pripremu dijetetske i visokovredne hrane za sportiste i određene grupe bolesnika.

### **Potencijalni proizvodi na bazi serum proteina**

U poslednjih deset godina posebna pažnja posvećena je razvoju i implementaciji industrijskih procesa proizvodnje prečišćenih serum proteina koji imaju odbrambenu funkciju u organizmu, poput laktoferina, laktoperoksidaze, imunoglobulina i faktora rasta. Izolovanje laktoferina i laktoperoksidaze iz surutke u industrijskim uslovima zasniva se na znatno višoj izoelektričnoj tački ovih proteina u odnosu na ostale serum proteine. Naime, pI laktoferina je 7.8–8.0, a laktoperoksidaze 9.2–9.9. Izoelektrična tačka ostalih proteina mleka i surutke je pri znatno nižim pH vrednostima, tako da su laktoferin i laktoperoksidaza pri pH 6.5 pozitivno naelektrisani.

Izolovanje laktoferina i laktoperoksidaze iz surutke u industrijskim uslovima razvili su Burling (1994), Kussendrager i sar. (1997), Sato i sar. (1996) i to na bazi primene jonoizmenjivačke (katjonske) hromatografije.

Izolovanje imunoglobulina u industrijskim uslovima podrazumeva primenu jonoizmenjivačke hromatografije i dalje prečišćavanje afinitivnom hromatografijom (Mallèe i Steijns, 2001). Olander i sar. (2001) su razvili postupak istovremenog izolovanja imunoglobulina, laktoferina i laktoperoksidaze. Proteini koji zaostanu u surutki nakon ovog procesa koriste se za proizvodnju izolata ili koncentrata proteina surutke.

### **Tehnološko-funkcionalna svojstva serum proteina**

Funkcionalne osobine proteina surutke su određene njihovim fizičkim, hemijskim i strukturno/konformacionim osobinama. One podrazumevaju veličinu i oblik molekula, aminokiselinski sastav i sekvencu, naelektrisanje i njegovu distribuciju, odnos hidrofili-

nosti i hidrofobnosti molekula, sadržaj sekundarnih struktura i njihovu distribuciju, tercijarnu i kvaternarnu organizaciju polipeptidnih segmenata i njihovu osjetljivost na spoljne uslove. Faktori poput načina pripreme proizvoda na bazi proteina surutke, uslovi sredine i interakcije sa komponentama sistema u koji se dodaju menjaju funkcionalne osobine proteina surutke (McCreae i sar., 1999, De Wit, 1998, Jovanović i sar., 2005a, 2005b). Obzirom da su serum proteini tipični globularni proteini, posebno bitan faktor koji određuje osobine, a time i moguću primenu serum proteina je stepen delovanja visokih temperatura. Uticaj delovanja visokih temperatura na serum proteine u mleku, surutki, proizvodima na bazi surutke, model sistemima ispitivao je veliki broj autora (Singh i Waugana, 2001, Jovanović i sar., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2005c, 2006, 2007, Spiegel i Huss, 2002). Pored toga, novija istraživanja Needs i sar. (2000) i Garcia-Risco i sar. (2000) pokazala su da delovanje visokih pritisaka sa ili u kombinaciji sa visokim temperaturama mogu značajno uticati na tehnološke funkcionalne osobine serum proteina.

Serum proteini i proizvodi tipa koncentrata i izolata proteina surutke odlikuju se visokom sposobnošću želiranja i vezivanja vode, emulgovanja, obrazovanja i stabilizacije pene.

### ***Sposobnost želiranja***

Proizvodi na bazi serum proteina, a pre svih koncentрати, odlikuju se visokom sposobnošću želiranja, što ih čini pogodnim aditivom u pekarskoj, industriji mesa, i industriji mleka. Želiranje je kompleksan proces, koji se odvija u dve faze. Prva faza je inicijalna faza, u toku koje dolazi do narušavanja strukture proteina, ili disocijacije proteina, koja omogućuje različite tipove interakcija (hidrofobne, elektrostatičke, vodonične i disulfidne) među denaturisanim proteinima u toku druge faze. Na osnovu ovih interakcija u drugoj fazi denaturisani proteini ili polipeptidni fragmenti agregiraju, što dovodi do obrazovanja gela. Proces želiranja određen je nizom faktora kao što su: rastvorljivost proteinskog proizvoda, dužina termičkog tretmana, visina temperature, pH, jonska snaga, koncentracija soli, proteina, šećera i lipida. Sposobnost želiranja proteinskih proizvoda na bazi surutke je različita. Većina koncentrata proteina surutke mogu da želiraju u vodenom rastvoru pri koncentraciji od 80–120 g/l proteina u temperaturnom intervalu od 60–90°C.

### ***Obrazovanje pene***

Proteini surutke imaju sposobnost formiranja stabilne pene. Naveću sposobnost obrazovanja pene poseduju nativni, nendenaturisani molekuli proteina, koji ne reaguju sa drugim površinski aktivnim supstancama u sistemu vazduh–voda. Sposobnost lupanja i sposobnost obrazovanja stabilne pene određena je nizom faktora, a pre svega stepenom denaturacije proteina, koncentracijom proteina, koncentracijom  $\text{Ca}^{2+}$  i drugih jona, temperaturom, pH vrednošću sredine i sadržajem masti (Popović-Vranješ i Vujčić, 1997). Kao sredstvo za obrazovanje pene, proteini surutke mogu se koristiti za pripremu lupanih preliva, hrskavih keksa i deserata.



### **Emulgovanje**

Jedna od značajnih osobina proteina surutke je njihova sposobnost da obrazuju i stabilizuju emulzije (McCreae i sar., 1999). Ova osobina zasniva se na njihovoj sposobnosti smanjenja površinskog napona komponenti koloidnog sistema hrane. Posebno dobro izraženu površinsku aktivnost i dobre emulgujuće osobine, kao i sposobnost obrazovanja pene ispoljava proteozo-peptonska frakcija 3, što se delom objašnjava malom molekulskom masom, a delom visokim sadržajem ugljenih hidrata (Compagna i sar., 1998).

U literaturi je prisutan veliki broj istraživanja koja se odnose na identifikovanje optimalnih uslova pod kojim se proteini surutke individualno, ili u smeši ponašaju kao emulgatori (McCreae i sar., 1999). Važni faktori koji određuju emulgujuće osobine proteina surutke su: koncentracija i rastvorljivost proteina, pH, jonska jačina, način pripreme proteinskog proizvoda, uslovi čuvanja i prisustvo drugih komponenti npr. laktoze (McCreae i sar., 1999).

### **Terapeutska svojstva serum proteina**

Istraživanja sprovedena u poslednjih petnaest godina pokazala su da serum proteini pored visoke nutritivne vrednosti koja se ogleda u izbalansiranom odnosu esencijalnih aminokiselina, ispoljavaju i značajna terapeutska svojstva čime mogu u velikoj meri doprineti tome da se finalni proizvod okarkateriše kao funkcionalna hrana. Naime, pored antimikrobne i zaštitne uloge pojedinih serum proteina kao što su imunoglobulini, laktoferin i laktoperoksidaza, istraživanja Papenburg i sar. (1990) su pokazala da primena serum proteina u ishrani doprinosi sprečavanju razvoja pojedinih oblika kancera. Antikancerogeno svojstvo pripisuje se laktoferinu (Tsuda i sar., 2000) i  $\alpha$ -laktalbuminu (Sternhagen i Allen, 2001). Pored toga, surutka predstavlja i značajan izvor tzv. biološki aktivnih peptida, koji najvećim delom predstavljaju produkte razgradnje glikomakropeptida koji ispoljavaju povoljne terapeutske efekte (Fox, 2003).

### **LITERATURA**

- ASLAM M., HURLEY, W. L.: Proteolysis of milk proteins during involution of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, (80)2004–2010(1997).
- BARAĆ, M., STANOJEVIĆ, S., JOVANOVIĆ, S. (2005): Characterization of alkali-modified soy protein concentrate. *Acta Periodica Technologica APTEF*, 36, 1-266, 11-21.
- BARAĆ, M., JOVANOVIĆ, S., STANOJEVIĆ, S., PEŠIĆ, M: Effect of limited hydrolysis on traditional soy protein concentrate. *Sensors*, 6(9)1087-1101(2006).
- BARGEMAN, G.: Separation technologies to produce dairy ingredients in Dairy processing, Ed. Smit, G. CRC Press, New York, 366-390(2003).
- BERLINER, L. J., MEINHOLTZ, D. C., HIRAI, Y.: Functional implications resulting from disruption of the calcium binding loop in bovine  $\alpha$ -lactalbumin. *J. Dairy Sci.*, (74) 2394-402(1991).

- BURLING, H.: Isolation of bioactive components from cheese whey. *Scandinavian Dairy Information*, 8(3)54–56(1994).
- CHATTERTON, D. E. W.: Alpha-lactalbumin: an ingredient for enriching infant formulas. *Industrial Proteins*, 9(3), 13–15(2001).
- COMPAGNA, S., VITOUX, B., HUMBERT, G., GIRARDET, J. M., LINDEN, G., HAERTLE, T., GAILLARD, J. L.: Conformational studies of a synthetic peptide from the putative lipid-binding domain of bovine milk component PP3. *J. Dairy Sci.* (81)3139–3148(1998).
- COOLBEAR, K. P., ELGAR, D. F., PRITCHARD, M., AYERS, J. S.: Process for isolating glycomacropptide from dairy products with phenylalanine impurity of 0.5%w/w. Int. Patent WO 98 14071(1998).
- DE WIT, J. N.: Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, (81)597-608(1998).
- DE WIT, J. N., KLARENBEK, G.: Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, 67 (11)2701-2710(1983).
- FOX, P. F.: The major constituents of milk in Dairy processing. Ed. Smith, G., 5-38 (2003).
- FOX, P. F., McSWEENEY, P. L. H: Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional, London, Weinheim, New York(1998).
- GARCIA-RISCO, M. R., OLANO, A., RAMOS, M., LOPEZ-FANDINO, R.: Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *J. Dairy Sci.*,83(10) 2184–2189(2000).
- GORDON, W. G., KALAN, E. B.: Proteins of milk in *Fundamentals of dairy chemistry*, Chapter 3, 87-124. Second edition. Ed. Webb, B. H., Johnson, A. H., Alford, J. A., The AVI Publishing company, Inc., Westport, Connecticut(1974).
- GROVES, M. L., GREENBERG, R.: Bovine homologue of 02-microglobulin isolated from milk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (77) 320-327(1977).
- HORTON, B.: The whey processing industry into the 21st century. *IDF Special Issue 9804*, 12–25(1998).
- JENNESS, R.: Interspecies comparison of milk proteins in *Developments in Dairy Chemistry*. Vol. I: Proteins. Ed. Fox, P.F. Applied Science Publishers, New York,(1982).
- JOKIĆ, A. M., MAČEJ, O., MARKOVIĆ, D., SIMOVIĆ, D., JOVANOVIĆ, S., MIKULJANAC, A.: Production of fermented ammoniated whey. 1 st International Confernece of the Chemical Societies of the South-East European Countries Chemical Science and Industry. Book of Abstracts, volume II. Greece, PO 690(1998).
- JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M., MAČEJ, O.: Serum proteini mleka. *Preh. ind.-Mleko i mlečni proizvodi*, 14 (1-2)62-68(2003).
- JOVANOVIĆ, S., MAČEJ, O., BARAĆ, M.: Influence of curd particles drying temperature on the composition of curd made of milk in which coaggregates were formed. *J. Agricult. Sci.*, 49(1) 65-73(2004a).
- JOVANOVIĆ, S., MAČEJ, O., DENIN ĐURĐEVIĆ, J.: Influence of curd particles washing on the composition of curd made of milk in which coaggregates were formed. *J. Agricult. Sci.*, 49 (1)75-86(2004b).
- JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M., MAČEJ, O.: Whey proteins-properties and possibility of application. *Dairy*, 55(3) 215-233(2005a).

- JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M., MAĆEJ, O., DENIN ĐURĐEVIĆ, J.: PAGE analysis of milk proteins altered by high thermal treatment. *Acta alimentaria*, 34 (2)105-112(2005b).
- JOVANOVIĆ, S., MAĆEJ, O., BARAĆ, M.: Karakteristike sireva na bazi koagregata i koprecipitata. *Biotehnologija u stočarstvu*, 21(1-2)147-173(2005c).
- JOVANOVIĆ, S., MAĆEJ, O., BARAĆ, M., VUČIĆ, T.: Distribucija sastojaka mleka pri proizvodnji polutvrđih sireva na bazi koagregata proteina mleka. *Preh. ind.-Mleko i mlečni proizvodi*, 17(1-2)68-72(2006).
- JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M., MAĆEJ, O., VUČIĆ, T., LAČNJEVAC, Č.: SDS-PAGE Analysis of Soluble Proteins in Reconstituted Milk Exposed to Different Heat Treatments, *Sensors* (7)371-383(2007).
- KUSSENDRAGER, K. D., KIVITS, M. G. C., VERVER, A. B.: Process for isolating lactoferrin and lactoperoxidase from milk and milk products and products obtained by such process. US Patent, (5)596,082(1997).
- LARSON, B. L.: Immunoglobulins of the mammary secretions in *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins*. Ed. Fox, P. F. Elsevier Applied Science, London, 231-54(1992).
- LEGER, D., VERBERT, A., LOUCHEUX, M.-H., SPIK, G.: Study of the molecular weight of human lactotransferrin and serotransferrin. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, (17) 737-747 (1977).
- LI-CHAN, E., KUMMER, A., LOSSO, J. N., KITTS, D. D., NAKAI, S. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Res. Internat.*, 28(1)9-16(1995).
- MCCRAE C. H., LAW A. J. R., LEAVER, J.: Emulsification properties of whey proteins in their natural environment: effect of whey protein concentration at 4 and 18% milk fat. *Food Hydrocolloids* (13)389-399(1999).
- MAĆEJ, O., JOVANOVIĆ, S., BARAĆ, M.: Proteini mleka. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun, Beograd (2007).
- MALLÉE, L. F., STEIJNS, J. M.: Defence proteins in milk. *Industrial Proteins*, 9(3)16–19(2001).
- MALLÉE, L. F., HENDRICS, A. W., KIVITS, M. G. C.: Process for obtaining growth factor preparations (TGF-beta and IFG-1) from milk products having low natural cross-contamination. Int. Patent WO 01 25.276 (2001).
- MULVIHILL, D. M.: Production, functional properties and utilization of milk proteins in *Advanced Dairy Chemistry. Vol. 1: Proteins*, (Ed. Fox, P.F.), Elsevier Applied Science, London, . 369-404(1992).
- NEEDS, E. C, STENNING, R. A, GILL, A. L., FERRAGUT, V., RICH, G. T.: High-pressure treatment of milk: effects on casein micelle structure and on enzymic coagulation. *J. Dairy Res.*, 67(1)31–42(2000).
- PAPENBURG, R., BOUNOUS, G., FLEISZER, D., GOLD, P.: Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *J. Internat. Soc. Oncodevelopmental Biology and Medicine*, (11)129–136(1990).
- PERRAUDIN, J. P., REITER, B.: The role of lactoperoxidase in reducing the activity of free radicals. *IDF Special Issue 9804*, 326–332(1998).
- POPOVIĆ-VRANJEŠ, A., VUJIČIĆ, I. F.: Tehnologija surutke. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad (1997).
- OLANDER, M. A., JAKOBSEN, A. L., HANSEN, M. B., LIHME, A.: Fractionation of high-value whey proteins. *Scandinavian Dairy Information*, 2/01, 22–25(2001) .

- SALTER, D. N., FORD, J. E., SCOTT, K. J., ANDREWS, P.: Isolation of the folatebinding protein from cows' milk by the use of affinity chromatography. *FEBS Lett.*,(20)302-306(1972).
- SATO, K., UCHIDA, T., DOSAKO, S. I., KAWASAKI, Y.: Separation of lactoperoxidase, secretory component and lactoferrin from milk or whey with cation exchange resin. US Patent 5,516,675(1996).
- SINGH, H., WAUNGANA, A.: Influence of heat treatment of milk on cheesemaking properties. *Int. Dairy J.* (11) 543–551(2001).
- SPIEGEL, T., HUSS, M.: Whey protein aggregation under shear conditions-effects of pH-value and removal of calcium. *Int. J. Food Sci. Technol.* (37)559–568(2002).
- STERNHAGEN, L. G., ALLEN, J. C.: Growth rates of a human colon adenocarcinoma cell line are regulated by the milk protein alpha-lactalbumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* (501)115-120(2001).
- SWAISGOOD, H. E.: Review and update of casein chemistry. *J. Dairy Sci.*, 76(10)3054-3061(1993).
- TSUDA, H., SEKINE, K., USHIDA, Y., KUHARA, T., TAKASUKA, N., IGO, M., HAN, B. S., MOORE, M. A.: Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutation Research*, (462)227–233(2000) .
- VAN DER HORST, H. C.: Membrane processing in mechanisation and automation in dairy technology, Eds. Tamime, A. Y. and Law, B. A., Sheffield Academic Press, Sheffield, UK (2000).

## **WHEY PROTEINS-TECHNOLOGICAL-FUNCTIONAL PROPERTIES AND APPLIANCE POSSIBILITY**

SNEŽANA JOVANOVIĆ, MIROLJUB BARAĆ, OGNJEN MAČEJ, TANJA VUČIĆ

### **Summary**

High nutritional value expressed with well ballanced essential amino acid ratio, as well as favorable physico-chemical properties, make whey proteins very interesting ingredients for food industry and other industry branches. Whey proteins are mostly used for the improvement of nutritive value of the final product, as well as for the attaining certain technological-functional properties of product, such as foam or gel forming and emulsion forming and stabilization. Wide palette of products based on whey proteins is well know and whey protein concentrates, isolates and hydrolysates have the widest appliance. However, in recent world literature, more and more data show significant therapeutic effect of some less represented whey proteins, even in a medical treatment of the most serious illnesses. Refined whey proteins have defensive role in organism and therapeutic function, which opens possibility of refined whey protein industry development.

**Key words:** whey proteins, functional properties, therapeutic effectmake whey proteins very interesting ingredients