

Izoterme sorpcije vode dehidratiranih proteina sirutke

Suzana Rimac Brnčić*, Vesna Lelas, Zoran Herceg, Marija Badanjak

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb

Prispjelo - Received: 08.01.2010.
Prihvaćeno - Accepted: 22.02.2010.

Sažetak

Izoterme sorpcije vode opisuju odnos između udjela vode suhog materijala (hrane) i relativne vlažnosti okoline. U skladu s dobivenim podacima optimiraju se uvjeti procesa sušenja, pakiranja i skladištenja hrane koji će omogućiti maksimalno zadržavanje njene arome, boje, teksture te nutritivne i biološke vrijednosti. Svrha ovoga rada bila je utvrditi ravnotežnu koncentraciju vode i aktiviteta vode, te vrijednost monosloja dva komercijalna izolata proteina sirutke u prahu prije i nakon tribomehaničke mikronizacije, odnosno enzimske hidrolize. Istovremeno je bilo potrebno odabrati jednadžbu koja najbolje odgovara eksperimentalnim podacima. Ravnotežna koncentracija vode u ispitivanim uzorcima određena je standardnom gravimetrijskom metodom pri 20 °C u rasponu aktiviteta vode od 0,11 do 0,75. Vrijednosti monosloja izračunate su primjenom dva modela: Brunauer-Emmett-Teller (BET) i Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB). Rezultati su pokazali da tribomehanički tretirani izolati proteina sirutke, odnosno hidrolizati proteina imaju niže vrijednosti monosloja, ali i veći pripadajući aktivitet vode. To znači da se, iako imaju manji udio vode, mogu čuvati u uvjetima veće relativne vlažnosti zraka u odnosu na netretirane uzorke. BET model pokazao se prikladnim kod određivanja monosloja u području aktiviteta vode od 0,11-0,54, dok je GAB model moguće primijeniti za područje aktiviteta do 0,75.

Ključne riječi: proteini sirutke, izoterme sorpcije vode

Uvod

Veliki broj prehrambenih proizvoda jest u obliku praha, od sirovina kao što su brašno, šećer, začini pa do gotovih proizvoda kao što su instant kava ili mlijeko u prahu. Tijekom njihove proizvodnje i skladištenja može doći do niza nepoželjnih fizikalno-kemijskih promjena kao što su ljepljivost, zgrudnjavanje, stvaranje aglomerata, gubitak hlapljivih spojeva, posmeđivanje, oksidacija i slično, koje u konačnici dovode do ekonomskih gubitaka.

Izoterme sorpcije vode opisuju odnos između sadržaja vlage suhog materijala (hrane) i relativne vlažnosti okoline. U skladu s dobivenim podacima

optimiraju se uvjeti procesa sušenja, pakiranja i skladištenja hrane koji će omogućiti maksimalno zadržavanje njene arome, boje, teksture te nutritivne i biološke vrijednosti.

Izoterme sorpcije vode važne su iz više razloga. Termodinamički promatrano, izoterme sorpcije daju informaciju o entalpijama sorpcije i desorpcije te načinu vezanja vode na suhu tvar. Na strukturnoj razini pomažu u razumijevanju uloge veličine čestica, amorfnog stanja te specifičnih područja sorpcije vode. S druge strane, tehnološki, izoterme sorpcije vode korisne su u predviđanju trajnosti (upotrebljivosti), kontroli procesa sušenja te sprečavanju ljepljivosti praškastih proizvoda.

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 4836 083; E-mail: srimac@pbf.hr

Proteini sirutke, zbog svoje nutritivne vrijednosti (velikog udjela esencijalnih aminokiselina, aminokiselina koje sadrže sumpor te aminokiselina razgranatog lanca) i poželjnih funkcionalnih svojstava, sve se više upotrebljavaju u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda. Da bi se poboljšala funkcionalna, ali i nutritivna svojstva proteina sirutke, primjenjuju se različiti kemijski, enzimski i fizikalni postupci.

Istraženi su različiti kemijski postupci modifikacije proteina sirutke kao što su acilacija, esterifikacija, amidacija, redukcijska alkilacija, sulfitoliza, lipofilizacija, glikolizacija, fosforilacija (Schwenke, 1997.). Međutim, istraživanja su pokazala da pojedine kemijske modifikacije proteina sirutke dovode do slabijeg *in vitro* metabolizma (Lieske i Konrad, 1994.) koji može imati i toksične fiziološke efekte te da konačni produkti metabolizma mogu dovesti i do neželjenih popratnih reakcija.

Funkcionalna svojstva proteina sirutke mogu se modificirati i primjenom različitih enzima bilo da je riječ o međusobnom povezivanju u veće polimere ili o hidrolizi na peptide i polipeptide. Enzimska hidroliza do sada je najviše istraživana metoda modifikacije proteina. Enzimi mogu katalizirati mnoge kemijske reakcije modifikacije proteina kao npr. glikolizaciju, hidroksilaciju i metilaciju (Watanabe i Arai, 1982.). Enzimski modificirani proteini godinama su već prisutni u mnogim prehrambenim proizvodima. Najviše korišteni enzimi u proizvodnji hidrolizata proteina sirutke su pepsin, tripsin i kimotripsin, koji su također probavni enzimi čovjeka. Enzimska modifikacija proteina sirutke kontroliranom proteolizom utječe na funkcionalna svojstva u cijelom pH području, te pri ostalim uvjetima obrade. Hidroliza peptidnih veza povećava broj nabijenih grupa i hidrofobnost, smanjuje molekulsku masu i mijenja molekulsku konfiguraciju (Phillips i Beuchat, 1981). Promjene funkcionalnih svojstava znatno ovise o stupnju hidrolize. Tribomehanička obrada materijala primjenjuje se više od 60 godina u obradi različitih čvrstih anorganskih materijala u dinamičkim uvjetima, pri čemu dolazi do značajnih promjena u fizikalno-kemijskim i funkcionalnim značajkama materijala. Istraživanja su vršena s praškastim koncentratima proteina sirutke različitih udjela proteina i laktoze, s izolatima proteina sirutke, beta-laktoglobulinom te s hidrolizatima proteina sirutke. Dobiveni rezultati pokazali su da se tribomehaničkom obradom mije-

njaju reološka svojstva, topljivost, svojstva pjenjenja i emulgiranja, probavljivost, temperature faznih promjena te da dolazi do djelomične hidrolize proteina sirutke (Herceg i sur., 2001.; Herceg i sur., 2002.; Herceg i sur., 2004.a; Herceg i sur., 2004.b; Herceg i sur., 2005.; Krešić i sur., 2008.).

Proteini sirutke prema strukturi su kompaktni globularni proteini s relativno podjednakom raspodjelom niza nepolarnih (hidrofobnih), polarnih (neutralnih) te nabijenih ili nenabijenih aminokiselinskih ostataka. Intramolekularno nabrana struktura tih proteina rezultat je disulfidnih veza (S-S) između ostataka cisteina koje su unutar molekule prekrivene uglavnom hidrofobnim ostacima. Zbog toga ti proteini ne čine čvrste agregate između sebe ili s drugim proteinima, što ih čini podložnima da pod utjecajem mehaničke obrade mijenjaju svoju strukturu.

Svrha ovoga rada bila je utvrditi ravnotežnu koncentraciju vode i aktiviteta vode, te vrijednost monosloja izolata proteina sirutke u prahu prije i nakon tribomehaničke mikronizacije, odnosno enzimske hidrolize, kako bi se utvrdilo utječu li ovi načini obrade na njihove uvjete skladištenja. Istovremeno je bilo potrebno odabrati jednadžbu koja najbolje odgovara eksperimentalnim podacima.

Materijali i metode

U ovom radu ispitivanja su provedena s izolatom proteina sirutke BiPRO (Proizvođač: Davisco Foods International, Le Suer, SAD) i izolatom proteina sirutke RT-90 (Proizvođač: Main Street Ingredients, La Crosse, SAD) te komercijalnim hidrolizatom proteina sirutke BioZate 5 (Proizvođač: Davisco Foods International, Le Suer, SAD) i komercijalnim hidrolizatom RT-80 (Proizvođač: Main Street Ingredients, La Crosse, SAD). Njihov kemijski sastav deklarirao je proizvođač i prikazan je u tablici 1.

Tribomehanički tretirani proteini sirutke dobiveni su propuštanjem izolata proteina sirutke (BiPro, RT Cornerstone) kroz patentirani uređaj za tribomehaničku mikronizaciju čestica (Lelas, 1998., Patent: PCT/1B99/00757). Uređaj se sastoji od kućišta u kome su smještene dva rotorska diska okrenuta jedan prema drugome (slika 1). Diskovi se neovisno okreću u suprotnim smjerovima brzinom od 40.000 okretaja u minuti. Na diskovima su pričvršćena dva ili više koncentričnih vijenaca udarnih zatika i ventilatorskih lopatica, te utori koji

Tablica 1. Kemijski sastav izolata i hidrolizata proteina sirutke

Table 1. Chemical composition of whey protein isolates and whey protein hydrolysates

Uzorak Sample	Proteini Protein (%)	Laktoza Lactose (%)	Masti Fat (%)	Voda Water (%)	Pepeo Ash (%)
Izolat proteina sirutke BiPRO Whey protein isolate BiPRO	92,0	1,0	0,3	5,0	2,0
Izolat proteina sirutke RT-90 Whey protein isolate RT-90	90,0	0,8	0,5	4,2	2,5
Hidrolizat izolata proteina sirutke Biozate 5 Whey protein hydrolysate Biozate 5	90,0	0,1	0,5	5,0	4,5
Hidrolizat koncentrata proteina sirutke RT-80 Whey protein hydrolysate RT-80	81,0	5,0	6,0	4,0	4,0

zadiru u lopatice suprotnog diska, sprečavajući tako nekontrolirani prolaz materijala koji se obrađuje. Pri tome se stvaraju turbulentna zračna strujanja uslijed čega dolazi do ubrzanja materijala koji se obrađuje te međusobnih sudara i trenja među česticama pod određenim kutom. U uređaju, pod dinamičkim uvjetima relativnim kretanjem jedne čestice po površini druge, dolazi do oštećenja površine čestica i sloja materijala koji je smješten neposredno ispod površine čestica.

Ravnotežna koncentracija vode u ispitivanim uzorcima određena je standardnom gravimetrijskom

metodom pri 20 °C u rasponu aktiviteta vode od 0,11 do 0,75. Izvaže se 3 g uzorka u staklene posudice koje se smještaju u eksikatoru s pripremljenim humidostatima (tablica 2). Po uspostavljanju ravnotežne vlažnosti nakon 14 dana odredi se udio vode u uzorku te relativna vlažnost zraka u posudi pomoću digitalnog ručnog termo-higrometra (Testo 650, Njemačka). Uz pomoć dobivenih podataka za aktivitet vode i odgovarajuće koncentracije vode, grafički se prikaže izoterma sorpcije. Iz dobivene izoterme sorpcije odredi se vrijednost monosloja kao točka prve infleksije krivulje.

Slika 1. Laboratorijski uređaj za tribomehaničku aktivaciju

Fig. 1. Laboratory equipment for tribomechanical activation



Tablica 2. Aktiviteti vode zasićenih otopina soli pri različitim temperaturama (Labuza, 1968.)
 Table 2. Water activity for saturated solutions of different salts at various temperatures (Labuza, 1968)

Zasićena otopina soli Saturated salt solution	Aktivitet vode pri Water activity at		
	5 °C	20 °C	35 °C
LiCl	0,113	0,113	0,113
MgCl ₂	0,336	0,329	0,321
K ₂ CO ₃	0,431	0,432	0,436
Mg(NO ₃) ₂	0,589	0,541	0,499
NaCl	0,757	0,754	0,749

Vrijednosti monosloja izračunate su primjenom dva modela: Brunauer-Emmett-Teller (BET) i Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB).

Linearizacija izoterme sorpcije u ovom radu provedena je prema dva modela:

Brunauer-Emmett-Teller (BET) model

$$m/m_0 = a_w/G / [(1-a_w)(1-a_w+a_wG)] \quad /1/$$

Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) model

$$m/m_0 = a_w/GK / [(1-a_wK)(1-a_wK+a_wGK)] \quad /2/$$

gdje je:

m - udio vode (%)

m_0 - udio vode kod monosloja (g/100 g suhe tvari)

a_w - aktivitet vode

G i K - konstante

Izračunavanje vrijednosti koncentracije vode monosloja: prema BET modelu, transformacijom jednadžbe /1/ dobiva se jednadžba linearne transformacije izoterme:

$$a_w / [(1-a_w)m] = a + ba_w \quad /3/$$

te se linearnom regresijom odrede koeficijenti a i b pomoću kojih se izračuna vrijednost monosloja:

$$m_0 = 1/(a+b) \quad /4/$$

Prema GAB modelu, jednadžba /2/ se prevede u kvadratni oblik:

$$a_w/m = Aa_w^2 + Ba_w + C \quad /5/$$

te se metodom najmanjih kvadrata odrede koeficijenti A , B i C pomoću kojih se izračuna vrijednost monosloja:

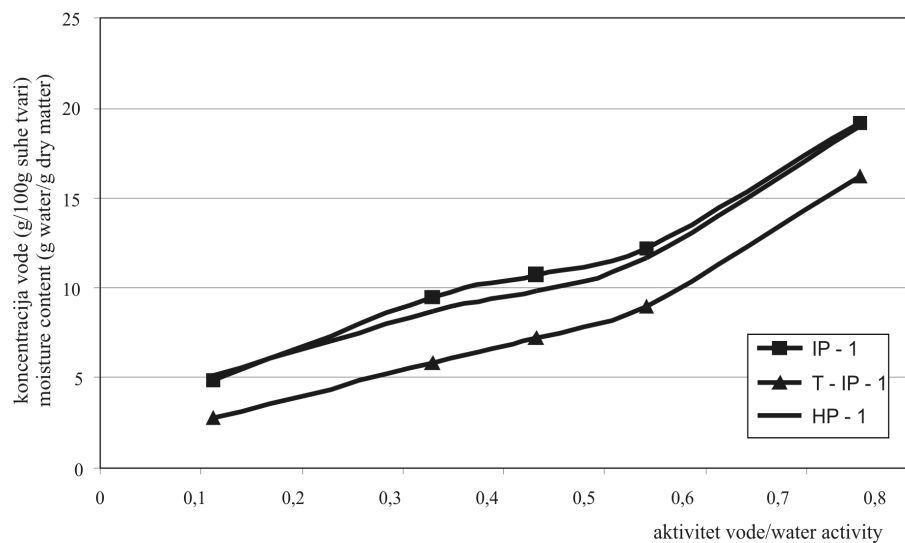
$$m_0 = 1/(B^2-4AC)^{0,5} \quad /6/$$

Rasprava

Pri skladištenju praškastih prehrambenih materijala često dolazi do njihovog lijepljenja i zgrudnjavanja (aglomeriranja). S obzirom da je voda jedan od čimbenika odgovornih za te procese, izoterme sorpcije predstavljaju korisno sredstvo za razumijevanje povezanosti vlage praha i njihove stabilnosti. Izoterme sorpcije opisuju ravnotežu između udjela vode u prahu i relativne vlažnosti okoline. Na osnovu izoterme sorpcije praškastih materijala mogu se dobiti podaci i o njihovim strukturnim obilježjima, kao što su specifična površina, volumen pora, raspodjela veličine pora. U skladu s dobivenim podacima optimiraju se uvjeti pakiranja i skladištenja koji će omogućiti maksimalno zadržavanje arome, boje, teksture te nutritivne i biološke stabilnosti. Između ostalog, važno je znati do koje mjere osušiti materijal kako bi se izbjegla aglomeracija praha, te također poznavati odnose između udjela vode u materijalu i vlažnosti okoline tijekom procesa stvaranja novog proizvoda.

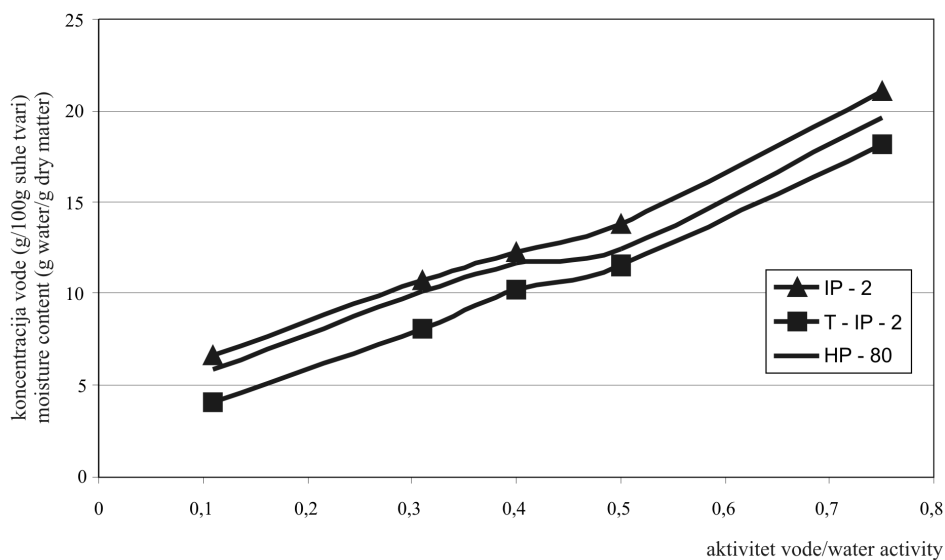
U literaturi se može pronaći nekoliko metoda kojima se mogu predvidjeti izoterme za višekomponentne prahove. Najčešće upotrebljavana metoda je ona koja koristi aditivan model koji je i korišten u ovom radu. Ovaj model pretpostavlja da se količina adsorbirane vode pri bilo kojoj vrijednosti aktiviteta vode može predvidjeti vaganjem dodatka vlage koju bi komponente apsorbirale same, uz pretpostavku da ne dolazi do interakcija između komponenata.

Na temelju podataka o količini adsorbirane vode pri različitim aktivitetima vode (0,11; 0,32; 0,43; 0,54; 0,75) na 20 °C prikazane su izoterme sorpcije ispitivanih tretiranih i netretiranih izolata proteina sirutke na slikama 2 i 3.



Slika 2. Izoterme sorpcije vode tribomehanički i enzimski tretiranih te netretiranih izolata proteina sirutke BiPRO (IP-1 - izolat proteina sirutke BiPRO, T-IP-1 - tribomehanički tretiran izolat proteina sirutke BiPRO, HP-1 - hidrolizat Biozate 5)

Fig. 2. Moisture sorption isotherm of tribomechanically and enzymatic treated and untreated BiPRO whey protein isolates (IP-1 - whey protein isolate BiPRO, T-IP-1 - tribomechanically treated whey protein isolate BiPRO, HP -1 - hydrolysate Biozate 5)



Slika 3. Izoterme sorpcije tribomehanički i enzimski tretiranih te netretiranih izolata proteina sirutke RT-90 (IP-2 - izolat proteina sirutke RT-90, T-IP-2- tribomehanički tretiran izolat proteina sirutke RT-90, HP-2 - hidrolizat koncentrata proteina sirutke RT-80)

Fig. 3. Moisture sorption isotherm of tribomechanically and enzymatic treated and untreated RT-90 whey protein isolates (IP-2 - whey protein isolate RT-90, T-IP-2 - tribomechanically treated whey protein isolate RT-90, HP-80 - hydrolysate RT-80)

Tablica 3. Vrijednosti monosloja (g vode/100 g suhe tvari) i pripadajući aktiviteti vode prema BET i GAB modelu te koeficijenti korelacije

Table 3. Monolayer moisture content values (g water/100 g solid matter), water activities according to BET and GAB models and correlation coefficients

Uzorak Sample	BET m_0	GAB m_0	BET a_w	GAB a_w	BET r^2	GAB R^2
IP-1	6,05	8,21	0,16	0,28	0,992	0,992
T-IP-1	4,55	5,14	0,24	0,26	0,999	0,999
HP-1	5,58	6,62	0,13	0,19	0,997	0,998
IP-2	6,65	8,59	0,11	0,20	0,996	0,996
T-IP-2	5,89	8,18	0,20	0,32	0,996	0,996
HP-80	6,26	8,41	0,13	0,24	0,993	0,994

Pomoću dva matematička modela (BET, GAB) izračunate su vrijednosti monosloja. Budući da BET model daje najbolje rezultate za vrijednosti aktiviteta $0,05 < a_w < 0,5$ korišten je i GAB model koji daje dobre rezultate za vrijednosti aktiviteta vode i do 0,9. Vrijednosti monosloja, pripadajući aktiviteti vode i koeficijenti korelacije prikazani su u tablici 3.

Nativni proteini sirutke imaju intramolekularnu nabranu strukturu, koja nastaje zahvaljujući disulfidnim mostovima između ostataka cisteina i omogućuje zauzimanje konformacije u kojoj se hidrofobni dijelovi molekula nalaze unutar kompaktne globule, dok vanjski dio globule čine hidrofilni ostaci aminokiselina (Tratnik, 1998.). Djelovanjem tribomehaničke mikronizacije i enzimske hidrolize dolazi do veće izloženosti većeg broja hidrofobnih skupina koje su prije bile skrivene unutar proteinske globule, a što se manifestira porastom površinske hidrofobnosti proteinskih molekula, čime se potpomažu protein-protein interakcije, a slabe protein-voda interakcije (Rimac Brnčić, 2006.).

Netretirani izolati proteina sirutke prema BET modelu imali su vrijednost monosloja 6,05, odnosno 6,65 mg vode/100 g suhe tvari, što je u skladu s rezultatima Fostera i suradnika (2005.) koji su utvrdili vrijednost monosloja od 6,82 mg vode/100 g suhe tvari. Hidrolizati proteina sirutke imali su nižu vrijednost monosloja dok je najniža vrijednost monosloja utvrđena kod tribomehanički tretiranih izolata proteina sirutke.

Vrijednosti monosloja prema GAB modelu očekivano su više u odnosu na one dobivene prema BET modelu, s obzirom da su u ovom modelu uzeti u obzir i podaci za aktivitet vode veći od 0,5. Kao što se vidi u tablici 3, oba modela vrlo dobro odgo-

varaju eksperimentalnim podacima, budući da je koeficijent korelacije za navedene uzorke izrazito visok (0,992-0,999).

Izražajnija higroskopnost i veća sklonost praha aglomeriranju je i posljedica različitog kemijskog sastava, što se posebice odnosi na udio laktoze. Laktoza može biti u dva stanja, amorfnom i kristalnom (Ibach i Kind, 2007.). Amorfna laktoza je termodinamički nestabilna i higroskopna, absorbira vlagu iz okoline što dovodi do sljepljivanja čestica proteina sirutke. Uzorci s većim udjelom laktoze imali su višu vrijednost monosloja.

Zaključci

Rezultati su pokazali da tribomehanički tretirani izolati proteina sirutke, odnosno hidrolizati proteina, imaju niže vrijednosti monosloja, ali i veći pripadajući aktivitet vode. To znači da se, premda imaju manji udio vode, mogu čuvati u uvjetima veće relativne vlažnosti zraka u odnosu na netretirane uzorke.

BET model pokazao se prikladnim kod određivanja monosloja u području aktiviteta vode od 0,11-0,54, dok je GAB model moguće primijeniti za područje aktiviteta do 0,75.

Moisture sorption isotherms of dehydrated whey proteins

Summary

Moisture sorption isotherms describe the relation between the moisture content of the dry material (food) and relative humidity of the surrounding environment. The data obtained are important

in modelling of drying process conditions, packaging and shelf-life stability of food that will provide maximum retaining of aroma, colour and texture as well as nutritive and biological value. The objective of this research was to establish the equilibrium moisture content and water activity, as well as monolayer value of two commercial powdered whey protein isolates before and after tribomechanical micronisation and enzymatic hydrolysis, respectively. At the same time it was necessary to evaluate the best moisture sorption isotherm equation to fit the experimental data. The equilibrium moisture contents in investigated samples were determined using standard gravimetric method at 20 °C. The range of water activities was 0.11 to 0.75. The monolayer moisture content was estimated from sorption data using Brunauer-Emmett-Teller (BET) and Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) models. The results have shown that tribomechanically treated whey protein isolates as well as protein hydrolyzates had lower monolayer moisture content values as well as higher corresponding water activity. Therefore, in spite of the fact that they have lower moisture content, they can be storage at higher relative humidity compared to untreated samples. BET model gave better fit to experimental sorption data for a water activity range from 0.11-0.54, while GAB model gave the closest fit for a water activity to 0.75.

Key words: whey protein, water sorption isotherm

Literatura

1. Foster, K.D., Bronlund, J.E., Paterson, A.H.J. (2005): The prediction of moisture sorption isotherms for dairy powders. *International Dairy Journal* 15, 411-418.
2. Herceg, Z., Lelas, V., Rimac, S. (2001): Reološka svojstva koncentrata proteina sirutke prije i nakon tribomehaničke mikronizacije. *Mljekarstvo* 51, 105-118.
3. Herceg, Z., Lelas, V., Rimac Brnčić, S. (2002): Utjecaj tribomehaničke mikronizacije i dodatka hidrokoloida na entalpiju i prividnu specifičnu toplinu modelnih otopina proteina sirutke, *Mljekarstvo* 52, 19-33.
4. Herceg, Z., Lelas, V., Brnčić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2004a): Fine milling and micronization of organic and inorganic materials under dynamic conditions. *Powder technology* 139, 111-117.
5. Herceg, Z., Lelas, V., Brnčić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2004): Tribomechanical micronization and activation of whey protein concentrate and zeolite, *Sadhana* 29 (1), 13-26.
6. Herceg, Z., Lelas V. (2005): The influence of temperature and solid matter content on the viscosity of whey protein concentrate and skim milk powder before and after tribomechanical treatment, *Journal of Food Engineering* 66, 433-438.
7. Ibach, A., Kind, M. (2007): Crystallization kinetics of amorphous lactose, whey permeate and whey powders, *Carbohydrate Research* 342, 1357-1365.
8. Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Rimac Brnčić, S. (2008): Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins, *Journal of Food Engineering* 87, 64-73.
9. Labuza, T.P. (1968): Sorption phenomena in foods. *Food Technology* 22, 263-272.
10. Lelas, T. (1998): PATENT: PCT/IB 99/00757, Vorrichtung zum Mikronisieren von Materialien und neuartige Verwendungsmöglichkeiten derartig mikronisierter Materialien, Geneve.
11. Lieske, B., Konrad, G. (1994): Thermal modification of sodium caseinate. 2. Influence of temperature and pH on nutritive properties. *Milchwissenschaft* 49, 71-74.
12. Philips, R.D., Beuchat, L.R. (1981): Enzyme modification of proteins. In: *Protein Functionality in Foods*, J.P. Cherry, Editor, *American Chemical Society Symposium Series 147*, ACS, Washington, DC (1981), pp. 275-298.
13. Rimac Brnčić, S. (2006): Disertacija. Fizikalno kemijska svojstva proteina sirutke u funkciji različitih postupaka obrade.
14. Schwenke, K.D. (1997): Enzyme and chemical modification of proteins, U: *Food Proteins and Their Applications*, (Damodaran, S. ured.), Marcel Dekker Inc, New York, 393-423.
15. Tratnik, L.J. (1998): Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 30-43; 345-379.
16. Watanabe, M., Arai, S. (1982): Proteinaceous surfactants prepared by covalent attachment of L-leucine *n*-alkyl esters to feed proteins by modification with papain. U: *Modification of proteins. Food, Nutritional and Pharmacological Aspects*, American Chemical Society, Washington, 199.