

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Tanja Ž. Krunić

**PROIZVODNJA I PRIMENA
BIOAKTIVNIH PROTEINA I PEPTIDA
SURUTKE**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY**

Tanja Ž. Krunic

**PRODUCTION AND APPLICATION OF
BIOACTIVE PROTEINS AND PEPTIDES
FROM WHEY**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2017

Mentor:

dr Marica Rakin, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-melalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Maja Vukašinović-Sekulić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-melalurški fakultet

dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,
Tehnološko-melalurški fakultet

dr Zorica Radulović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu,
Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane:

PROIZVODNJA I PRIMENA BIOAKTIVNIH PROTEINA I PEPTIDA SURUTKE

REZIME

Bioaktivni peptidi predstavljaju granu naučne oblasti koja se veoma brzo razvija. Tokom istraživanja proteina uočeno je da neki proteini nakon digestije ispoljavaju bioaktivnosti koje ne poseduju u svojoj nativnoj formi. To je bio podsticaj za istraživanje uticaja enzimske hidrolize na bioaktivnost proteina. Trenutni naučni stav je da svaki protein može posedovati fragmente koji ispoljavaju neku od mnogih bioaktivnosti. Bioaktivni peptidi dobijeni enzimskom hidrolizom surutke ispoljili su mnoge pozitivne efekte na ljudsko zdravlje. U zavisnosti od bioaktivnosti koju peptidi poseduju, mogu se primeniti kao dodaci u različite prehrambene proizvode ili kao sastojci nekih medikamenata. Ovaj rad bavi se produkcijom bioaktivnih peptida iz proteina surutke, korišćenjem kontrolisane enzimske hidrolize i njihovom primenom u prehrambenoj industriji u cilju dobijanja funkcionalne hrane.

U novije vreme, postoji rast interesovanja potrošača za hranu koja nije samo izvor osnovnih nutrienata, već koja pozitivno utiče na zdravlje i kvalitet života. Surutka je upravo bogat izvor proteina i peptida koji mogu biti iskorišćeni za proizvodnju funkcionalne hrane. Obogaćivanje fermentisanih proizvoda sa odabranim bioaktivnim proteinima i peptidima surutke predstavlja praktično rešenje formulacije funkcionalnog proizvoda koji zadovoljava zahteve potrošača današnjice.

Cilj ovoga rada jeste ispitivanje uticaja enzimske hidrolize na antioksidativni kapacitet, ACE inhibitornu aktivnost i tehnološka svojstva proteina surutke. Koncentrat proteina surutke je hidrolizovan dejstvom tri enzima: tripsina, termolizina i proteinaze k. Upotrebom ultrafiltracione metode dobijeni hidrolizati su podeljeni na 4 frakcije: F1 (peptidi molekulske mase veće od 30 kDa), F2 (peptidi molekulske mase između 10 kDa i 30 kDa), F3 (peptidi molekulske mase između 3 kDa i 10 kDa) i F4 (peptidi molekulske mase manje od 3 kDa). Enzimskom hidrolizom koncentrata proteina surutke oslobđaju se peptidi koji poseduju značajno viši ($p < 0,05$) antioksidativni kapacite i ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na native proteine iz kojih su dobijeni. Peptidna frakcija F4 hidrolizata dobijenog pomoću protinaze k i ukupan hidrolizat proteinaze k

ispoljavaju najvišu ACE inhibitornu aktivnost i antioksidativnu aktivnost od svih ispitivanih uzoraka. Ovi uzorci su dalje korišćeni kao dodatak u prehrambene proizvode (fermentacioni napitak na bazi surutke, jogurt i masni krem) sa ciljem obogaćivanja proizvoda i prevođenja istih u funkcionalnu hranu. Pored bioaktivnosti, tehnološka svojstva proteina (kapacitet i stabilnost stvaranja pene, emulgujuća svojstva, rastvorljivost, hidrofobnost, kapacitet vezivanja vode i ulja, svarljivost) imaju važnu ulogu u odabiru uzorka koji će biti korišćen kao dodatak prehrambenom proizvodu. Proteini surutke su pokazali takva tehnološka svojstva (odličnu rastvorljivost, dobro vezivanje vode i ulja, dobra emulgujuća svojstva i sposobnost stvaranja pene) da predstavljaju dobar izbor proteina koji je moguće koristiti u mnogim proizvodima kao dodatak ili zamenu za druge proteine. Takođe, enzimskom hidrolizom pored redukcije molekulske mase proteina i povećanja bioaktivnosti, dolazi do poboljšanja tehnoloških svojstava uzorka. Najbolja tehnološka svojstva pokazao je hidrolizat dobijen pomoću tripsina. Hidrolizat koji poseduje najbolja tehnološka svojstva korišćen je kao dodatak u mlečnu čokoladu u cilju proizvodnje proteinski obogaćenih čokoladnih barova i kao nosač za inkapsulaciju BMK korišćene za fermentaciju napitka na bazi surutke.

Istraživanjem mogućnosti poboljšanja kvaliteta i funkcionalnosti proizvoda dodatkom bioaktivnih peptida dokazano je da dodatka bioaktivnih peptida u masni krem značajno doprinosi povećanju antioksidativnog kapaciteta (1,23 puta) i ACE inhibitorne aktivnosti (2,35 puta u slučaju dodatka ukupnog hidrolizata i 2,77 puta u slučaju dodatka frakcije) proizvoda. Parametri su pokazali stabilnost tokom dva meseca koliko su praćeni. Bioaktivni peptidi dodati u fermentacioni napitak na bazi surutke i na bazi mleka pre fermentacije doveli su do unapređenja stabilnosti proizvoda tokom 28 dana čuvanja u frižideru, do značajnog povećanja antioksidativnog kapaciteta i ACE inhibitorne aktivnosti napitka. Dodatak frakcije hidrolizata od 3 % u obrano mleko pre fermentacije dovodi do produkcije napitka sa najboljim karakteristikama (antioksidativni kapacitet, ACE inhibitorna aktivnost i stabilnost). U slučaju napitka na bazi surutke najbolji rezultati postignuti su dodatkom 5 % frakcije hidrolizata kao i 5% ukupnog hidrolizata. Dodatkom 6 % hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina u mlečnu čokoladu, značajno je povećan antioksidativni kapacitet proizvoda, dok promena reoloških svojstava i raspodela veličine čestica nije značajno uticala na promenu senzornih svojstava proizvoda.

Tokom ispitivanja mogućnosti poboljšanja stabilnosti i probiotskog karaktera fermentisanog napitka na bazi surutke upotrebom različitih nosača (alginat, hitozan, WPC i hidrolizat WPC-a pomoću tripsina) za inkapsulaciju BMK, pokazano je da primena proteina surutke (nehidrolizovanog i hidrolizovanog) poboljšava stabilnost proizvoda tokom 28 dana čuvanja u frižideru, kao i da doprinosi povećanju probiotskog karaktera proizvoda (testirano u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta tokom 4h).

Inkapsulacija probiotskih sojeva pomoću nosača koji sadrže proteine surutke je pogodna pri fermentaciji napitka na bazi surutke, jer omogućava dobar rast bakterija i zadovoljavajuće parametre proizvoda, a ujedno osigurava dobru zaštitu probiotskim bakterijama u gastrointestinalnom traktu. Ovako inkapsulirana kultura može se koristiti i u nemlečnim proizvodima koji su sve popularniju usled problema laktoza-intolerancije.

Potencijal proteina i peptida surutke u proizvodnji funkcionalne hrane dokazan je mnogo puta do sada, ali za sada nema masovne proizvodnje ovakvih proizvoda, osim u slučaju suplemenata namenjenih bodibilderima. Bioaktivni proteini surutke su pogodni za obogaćivanje prehrambenih proizvoda usled jednostavne procedure dobijanja i izdvajanja. Dobra tehnološka svojstva proteina surutke i hidrolizata doprinose mogućnosti njihove široke primene u proizvodnji hrane.

Ključne reči: protein surutke, bioaktivni peptidi, enzimska hidroliza, proteinaza k, tripsin, termolizin, fermentacija, probiotici, funkcionalna hrana, komercijalna ABY 6 kultura

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo.

Uža naučna oblast: Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija.

UDK broj : 577.122.5:543.645.6:637.344

PRODUCTION AND APPLICATION OF BIOACTIVE PROTEINS AND PEPTIDES FROM WHEY

SUMMARY

Bioactive peptides are a rapidly developing field of research. During the research it was observed that some peptides which do not show a particular bioactivity become bioactive after ingestion and passing through the gastrointestinal system. That was the stimulus for the development of research on the effect of enzymatic hydrolysis of the bioactive properties of proteins. According to the current state of scientific knowledge, every protein can contain fragments that possess some of many bioactivities. Bioactive peptides, derived by enzymatic hydrolysis of whey protein, have demonstrated characteristics as health-promoting agents. Depending on these activities bioactive peptides derived from whey protein can be used as ingredients for various food and medical preparations. This paper research's production of bioactive peptides by controlled enzymatic hydrolysis from whey protein and peptide applications in food and beverages to create functional food.

Contemporary, consumers have a growing interest in foods which are not only a source of basic nutrition, but which can also promote health and quality of life. Whey is a rich source of biologically active protein and peptide which can be used in the production of functional food. New manufacturing technologies such as supplementation of fermented product with specific bioactive peptides concentrated from hydrolysates of whey proteins seem to provide a practical solution for the time being.

The aim of this study was to investigate the effects of enzymatic hydrolysis of whey proteins on their antioxidant potential, ACE inhibitory activity and technological properties. Whey protein concentrate (WPC) was hydrolysed by enzymes: Trypsin, Thermolysin and Proteinase K. Using ultrafiltration through three molecular cut-off membranes (30 kDa, 10 kDa and 3 kDa), the hydrolysates were separated into four fractions; F1 (peptides with MW higher than 30 kDa), F2 (peptides with MW among 10 kDa and 30 kDa), F3 (peptides with MW among 3 kDa to 10 kDa) and F4 (peptides with MW lower than 3 kDa). Hydrolysis of WPC with enzymes produced peptides with significantly ($p < 0.05$) higher antioxidant and ACE inhibitory activity than WPC.

Fractions HPK-F4 and HPK showed the highest ACE inhibitory activity and antioxidant capacity. Those fraction and hydrolysate were used for enriched whey based fermentation beverage, yoghurt and filling cream for confectionery industry. Bioactivity is not the only important characteristic of peptide that intends to be used in the food industry. Besides bioactivity, other properties of the proteins and peptides important for their practical application in food products were determined such as technological properties: foaming capacity and stability emulsification, solubility, hydrophobic, digestibility. Technological properties are the most important and limiting factors for application peptide in food manufacturing. Whey protein hydrolysates are suitable in food applications due to excellent solubility, emulsion activity, stability, and foaming capacity. It seemed that the enzymatic hydrolysis reduced molecular weight of WPC, increased bioactivity, foaming properties as well as digestibility and emulsion properties of proteins. The best technological properties showed hydrolysate obtained by Trypsin (HT). HT was used to enrich chocolate and as carrier for encapsulation of LAB used for fermentation of whey based substrate.

When examining the possibilities of improving different products by adding bioactive peptides (HPK and HPK-F4), it has been shown that addition of peptides in filling cream significantly increase antioxidant capacity (1.23 times) and ACE inhibitory activity (2.35 times when HPK was added and 2.77 times when HPK-F4 was added) of filling cream. Those parameters stay stable during two month of monitoring. Bioactive peptides derived from whey protein, that have been added in probiotic fermented products (yoghurt and whey based beverage) before fermentation were improved the stability of the probiotic products during 28 days of storage in refrigerator and significantly increased antioxidant capacity and ACE inhibitory activity of beverages. Addition of 3 % HPK-F4 in skim milk before fermentation has been shown that produced yoghurt with great antioxidant capacity, ACE inhibitory activity and product stability. For whey based substrate, it has been shown that addition of 5 % HPK as well as 5 % HPK-F4 produce beverage with the most desirable characteristics. The antioxidant capacity of milk chocolate was significantly increased by the addition of 6% of the hydrolysate (obtained by using Trypsin). Changes of rheological properties and the particle size distribution did not affect the sensory properties of the product.

When examining the possibilities of improve stability and probiotic properties of whey based beverages using different carriers (alginate, chitosan, WPC and HT) for encapsulation of lactic acid bacteria, it has been shown that addition of native and hydrolysed whey proteins significantly improve stability of whey based beverages during 28 days of storage in refrigerator and significantly improve probiotic properties of beverage (tested in simulated gastrointestinal conditions for 4h).

Probiotic bacteria encapsulated with whey peptides as carrier are suitable for the production of whey based products because they allow satisfactory growth of probiotic culture and parameters of the product, and also protect probiotic bacteria during their transit through the gastrointestinal tract. Using whey protein and peptide for probiotics encapsulation is good whey to use it in non-dairy food, too. Non-dairy probiotic foods are becoming popular as they do not pose problems of lactose intolerance.

The potential of whey proteins and peptides for the formulation of functional foods has been long demonstrated, but they are still not mass produced except as a dietary supplement for bodybuilders. Bioactive peptides are suitable for application in food, due to simple procedure to produce and separate it. Also, good technological properties of whey protein and hydrolysates, contribute their wide use in food manufacturing.

Key words: whey protein, bioactive peptide, enzymatic hydrolysis, Proteinase K, Trypsin, Thermolysin, fermentation, probiotics, functional food, commercial ABY 6 culture,

Scientific area: Technological Engineering.

Specialized scientific field: Biotechnological Engineering and Biotechnology.

UDK : 577.122.5:543.645.6:637.344

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. TEORIJSKI DEO..... | 3 |
| 2.1. Proteini surutke | 3 |
| 2.1.1. Produkcija bioaktivnih peptida iz proteina surutke | 13 |
| 2.1.1.1. Hidroliza proteina delovanjem proteolitičke starter kulture | 14 |
| 2.1.1.2. Kontrolisana enzimska hidroliza proteina surutke..... | 15 |
| 2.1.2. Tehnološka svojstva proteina surutke | 19 |
| 2.1.2.1. Rastvorljivost..... | 19 |
| 2.1.2.2. Kapacitet vezivanja vode i ulja | 19 |
| 2.1.2.3. Sposobnost stvaranja pene i emulgovanja | 20 |
| 2.2. Primena proteina surutke | 22 |
| 2.2.1. Definicija i klasifikacija funkcionalne hrane | 22 |
| 2.2.2. Prehrambeni proizvodi sa bioaktivnim proteinima..... | 27 |
| 2.2.2.1. Produkcija bioaktivnih peptida tokom procesa proizvodnje napitka..... | 28 |
| 2.2.2.2. Dodatak bioaktivnih peptida surutke u proizvode sa ciljem poboljšanja karakteristika proizvoda | 30 |
| 2.2.2.3. Proteini surutke kao nosači u prehrambenim proizvodima..... | 32 |
| 2.2.2.3.1. Imobilizacija | 32 |
| 2.2.2.3.2. Najčešće korišćeni nosači za inkapsulaciju probiotskih kultura | 34 |
| 2.2.2.3.2.1. Alginat | 34 |
| 2.2.2.3.2.2. Hitozan | 36 |
| 2.2.2.3.2.3. Proteini surutke..... | 36 |
| 2.2.2.3.3. Ekstruzija | 37 |
| 2.2.2.3.4. Primena imobilisanih jedinjenja u prehrambenim proizvodima | 38 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DEO | 40 |
| 3.1. Materijali | 40 |
| 3.1.1. Mikroorganizmi | 40 |
| 3.1.2. Enzimi | 40 |
| 3.1.3. Materijali..... | 40 |
| 3.1.4. Supstance p.a čistoće | 41 |
| 3.1.5. Uređaji..... | 42 |
| 3.2. Metode | 43 |
| 3.2.1. Hidroliza proteina surutke | 43 |
| 3.2.2. Određivanje stepena hidrolize DH (<i>engl. Degree of Hydrolysis</i>) | 44 |
| 3.2.3. Određivanje prosečne dužine peptidnog lanca hidrolizata APCL (<i>engl. Average Peptide Chain Length</i>) | 44 |
| 3.2.4. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u | 44 |
| 3.2.5. Sušenje i čuvanje uzoraka | 46 |
| 3.2.6. Tehnološka svojstva hidrolizata | 46 |
| 3.2.6.1. Rastvorljivost, WSI (<i>engl. Water solubility index</i>) | 46 |
| 3.2.6.2. Kapacitet vezivanja vode, WHC (<i>engl. Water Holding Capacity</i>) | 47 |

| | |
|--|----|
| 3.2.6.3. Kapacitet vezivanja ulja, OAC (<i>engl. Oil Absorption Capacity</i>) | 47 |
| 3.2.6.4. Stvaranje pene, FC (<i>engl. Foam Capacity</i>) i stabilnost pene, FS (<i>engl. Foam Stability</i>) | 47 |
| 3.2.6.5. Emulgirajuća svojstva | 48 |
| 3.2.6.6. Digestibilnost | 48 |
| 3.2.6.7. Hidrofobnost | 49 |
| 3.2.7. Ultrafiltracija hidrolizata | 49 |
| 3.2.8. Određivanje karakterističnih proteina u uzorcima gel-elektroforezom (SDS-PAGE) | 51 |
| 3.2.9. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanje antioksidativne aktivnosti | 53 |
| 3.2.9.1. Određivanje slobodno-radikalskog kapaciteta (DPPH test) | 53 |
| 3.2.9.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta pomoću inhibicije ABTS radikala | 54 |
| 3.2.9.3. Odrđivanje redukcionog snage (FRAP) (<i>engl. Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) | 55 |
| 3.2.10. ACE inhibitorna aktivnost peptidnih frakcija i fermentisanih uzoraka | 55 |
| 3.2.11. Primena proteina surutke u formulaciji funkcionalnih proizvoda | 56 |
| 3.2.11.1. Priprema podloga za gajenje mikroorganizama | 56 |
| 3.2.11.1.1. Priprema MRS bujona | 56 |
| 3.2.11.1.2. Priprema M17 bujona | 56 |
| 3.2.11.1.3. Priprema MRS agara | 56 |
| 3.2.11.1.4. Priprema M17 agara | 57 |
| 3.2.11.1.5. Priprema MRS agara sa maltozom kao izvorom ugljenika | 57 |
| 3.2.11.2. Priprema sirovina | 57 |
| 3.2.11.2.1. Priprema surutke u prahu | 57 |
| 3.2.11.2.2. Priprema prirodne surutke | 57 |
| 3.2.11.2.3. Priprema mešavine surutke i mleka | 58 |
| 3.2.11.3. Priprema nosača za imobilizaciju | 58 |
| 3.2.11.3.1. Priprema alginata | 58 |
| 3.2.11.3.2. Priprema hitozana | 58 |
| 3.2.11.3.3. Priprema proteina surutke za imobilizaciju | 58 |
| 3.2.11.3.4. Priprema hidrolizata proteina surutke za imobilizaciju | 59 |
| 3.2.11.4. Priprema mikroorganizama | 59 |
| 3.2.11.4.1. Priprema komercijalne ABY 6 kulture za fermentaciju slobodnom kulturom | 59 |
| 3.2.11.4.2. Priprema komercijalne ABY 6 kulture za fermentaciju imobilisanom kulturom | 59 |
| 3.2.11.4.2.1. Postupak imobilizacije komercijalne ABY 6 kulture u alginatne čestice | 60 |
| 3.2.11.4.2.2. Postupak imobilizacije komercijalne ABY 6 kulture u alginatno-proteinske čestice | 61 |
| 3.2.11.4.2.3. Postupak oblaganja alginatnih čestica hitozanom | 61 |
| 3.2.11.5. Primena i ispitivanje inkapsulirane kulture | 62 |
| 3.2.11.5.1. Fermentacija slobodne i inkapsulirane kulture | 62 |
| 3.2.11.5.2. Liofilizacija | 62 |
| 3.2.11.5.3. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR) | 62 |
| 3.2.11.5.4. Optička mikroskopija | 62 |
| 3.2.11.5.5. Mehaničke karakteristike nosača sa inkapsuliranom kulturom | 63 |
| 3.2.11.5.6. Parametri kvaliteta | 63 |
| 3.2.11.5.6.1. Određivanje pH vrednosti | 63 |
| 3.2.11.5.6.2. Određivanje titracijske kiselosti | 63 |
| 3.2.11.5.6.3. Određivanje broja živih ćelija kod fermentacije slobodnom kulturom | 63 |
| 3.2.11.5.6.4. Određivanje broja živih ćelija kod fermentacije inkapsuliranom kulturom | 64 |
| 3.2.11.5.6.4.1. Određivanje broja živih ćelija inkapsulirane kulture | 64 |
| 3.2.11.5.6.5.2. Određivanje broja živih ćelija kulture koja se nalazi slobodna u medijumu | 64 |

| | |
|---|----|
| 3.2.11.5.6.5.3. Curenje kulture iz čestica tokom fermentacije | 64 |
| 3.2.11.5.6.6. Određivanje probiotskog karaktera | 65 |
| 3.2.11.5.6.7. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja | 65 |
| 3.2.11.6. Dodatak peptida surutke u supstrat za fermentaciju radi ispitivanja uticaja peptida na tok fermentacije | 66 |
| 3.2.11.6.1. Fermentacija mleka sa dodatkom peptida | 66 |
| 3.2.11.6.2. Fermentacija supstrata na bazi surutke sa dodatkom peptida | 67 |
| 3.2.11.6.3. Parametri kvaliteta fermentisanog napitka sa dodatkom proteina | 67 |
| 3.2.11.6.3.1. Određivanje pH vrednosti | 67 |
| 3.2.11.6.3.2. Određivanje titracijske kiselosti | 67 |
| 3.2.11.6.3.3. Određivanje broja živih ćelija | 67 |
| 3.2.11.6.3.4. Antioksidativni kapacitet fermentisanog proizvoda | 67 |
| 3.2.11.6.3.4.1. Određivanje slobodno-radikalskog kapaciteta RSC (<i>engl. Radical Scavenging Capacity</i>) pomoću DPPH radikala | 67 |
| 3.2.11.6.3.4.2. ABTS test | 68 |
| 3.2.11.6.3.4.3. FRAP test | 68 |
| 3.2.11.6.3.5. Određivanje ACE inhibitorne aktivnosti fermentisanog proizvoda | 68 |
| 3.2.11.6.3.6. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja | 68 |
| 3.2.11.6.3.7. Probiotski karakter proizvoda | 69 |
| 3.2.11.7. Dodatak bioaktivnih peptida u masni krem | 69 |
| 3.2.11.7.1. Antioksidativni kapacitet masnog krema | 69 |
| 3.2.11.7.2. ACE inhibitorna aktivnost masnog krema | 69 |
| 3.2.11.8. Dodatak hidrolizata proteina surutke u mlečnu čokoladu | 70 |
| 3.2.11.8.1. Raspodela veličine čestica | 70 |
| 3.2.11.8.2. Određivanje teksturalnih osobina čokolade | 71 |
| 3.2.11.8.3. Određivanje reoloških osobina čokolade | 72 |
| 3.2.11.8.4. Određivanje antioksidativnih svojstava čokolade | 72 |
| 3.2.11.8.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola | 72 |
| 3.2.11.8.4.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala | 72 |
| 3.2.11.8.4.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala | 73 |
| 3.2.11.8.5. Senzorne i teksturna svojstva čokolade | 73 |
| 3.2.12. Statistička obrada eksperimentalnih podataka | 73 |

4. REZULTATI I DISKUSIJA..... 74

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Dobijanje i svojstva proteina i peptida surutke | 74 |
| 4.1.1. Stepen hidrolize i tehnološka svojstva hidrolizata | 74 |
| 4.1.1.2. Rastvorljivost | 75 |
| 4.1.1.2. Kapacitet vezivanja vode | 77 |
| 4.1.1.3. Kapacitet vezivanja ulja | 78 |
| 4.1.1.4. Hidrofobnost | 78 |
| 4.1.1.4. Sposobnost stvaranja pene i stabilnost pene | 80 |
| 4.1.1.5. Emulgujuća svojstva | 82 |
| 4.1.1.6. Digestibilnost | 84 |
| 4.1.1.7. Zaključak | 85 |
| 4.1.2. Ultrafiltracija i biološka svojstva proteina surutke, hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija hidrolizata | 87 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.2.1. Antioksidativna aktivnost hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija | 90 |
| 4.1.2.2. ACE inhibitorna aktivnost hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija | 98 |
| 4.1.2.3. Zaključak..... | 103 |
| 4.2. Primena proteina i peptida surutke | 107 |
| 4.2.1. Dodatak bioaktivnih peptida surutke u različite prehrambene proizvode | 107 |
| 4.2.1.1. Stabilnost bioaktivnih peptida u masnom kremu koji se koristi kao punjenje za različite konditorske proizvode | 107 |
| 4.2.1.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije, karakteristike proizvoda i probiotski karakter fermentisanog napitka | 108 |
| 4.2.1.2.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na fermentisani napitak na bazi mleka | 108 |
| 4.2.1.2.1.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije napitka na bazi mleka.. | 109 |
| 4.2.1.2.1.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na stabilnost fermentisanog napitka na bazi mleka..... | 115 |
| 4.2.1.2.1.3. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi mleka | 121 |
| 4.2.1.2.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na fermentisani napitak na bazi surutke | 122 |
| 4.2.1.2.2.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije napitka na bazi surutke | 122 |
| 4.2.1.2.2.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na stabilnost fermentisanog napitka na bazi surutke | 128 |
| 4.2.1.2.2.3. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke..... | 132 |
| 4.2.1.2.3. Zaključak..... | 133 |
| 4.2.1.3. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na kvalitet mlečne čokolade | 134 |
| 4.2.1.3.1. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na antioksidativni kapacitet mlečne čokolade .. | 138 |
| 4.2.1.3.2. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na senzorna svojstva mlečne čokolade | 139 |
| 4.2.1.3.3. Zaključak..... | 140 |
| 4.2.2. Primena proteina surutke kao nosača za inkapsulaciju mešane probiotske kulture pri proizvodnji fermentisanog proizvoda na bazi surutke..... | 140 |
| 4.2.2.1. Uticaj dodatka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za imobilizaciju mešane probiotske kulture na karakterisitke čestica i fermentativnu aktivnost kulture | 141 |
| 4.2.2.2. Uticaj dodatka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za inkapsulaciju mešane jogurtne kulture na stabilnost fermentisanog napitka na bazi surutke | 149 |
| 4.2.2.3. Uticaj dodatka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za inkapsulaciju mešane jogurtne kulture na probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke | 153 |
| 4.2.2.4. Zaključak..... | 156 |
| 5. ZAKLJUČAK | 157 |
| 6. LITERATURA | 164 |

1. UVOD

Predmet istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije odnosi se na proizvodnju bioaktivnih peptida surutke kao i njihovu primenu u cilju obogaćivanja postojećih proizvoda i prevođenja istih u funkcionalnu hranu.

Surutka koja nastaje u procesima proizvodnje sira i kazeina predstavlja glavni sporedni proizvod industrije mleka koji spada u jedan od najslabije iskorišćenih sporednih proizvoda prehrambene industrije u Srbiji. Osnovni problem industrije mleka je što se svega 10 – 20 % mleka iskoristi za dobijanje sira ili kazeina, dok 80 – 90 % mleka otpada na surutku. Surutka predstavlja jedan od najvećih rezervoara proteina koji je van ljudske upotrebe. Proteini surutke, a pre svega fragmenti proteina, pokazuju raznovrsne bioaktivne karakteristike, kao što su antimikrobne i antiviralne karakteristike, stimulatивно delovanje na imunitet, antikancerogene i antihipertenzivne karakteristike kao i druga pozitivna delovanja na organizam.

U poslednje dve decenije razvoj separacionih metoda zasnovanih na selektivno propustljivim membranama, doveo je do povećanja zastupljenosti i raznovrsnosti proteina i peptida surutke kao dodataka hrani. Peptidi dobijeni enzimskom hidrolizom proteina surutke imaju mnogo raznovrsniju i izraženiju biološku aktivnost od nativnih proteina iz kojih su dobijeni. Zbog svega nabrojanog proteini surutke, a posebno njihovi hidrolizati i peptidne frakcije postaju interesantni za nova istraživanja.

U radu će biti korišćen koncentrat proteina surutke i enzimi: proteinaza k, termolizin i tripsin. Pristupiće se hidrolizi proteina u trajanju od jednog sata uz praćenje stepena hidrolize kao bitnog parametra, zatim ultrafiltraciji hidrolizata pomoću celuloznih membrana (veličine pora 30 kDa, 10 kDa, 3 kDa i 1 kDa) i određivanju bioaktivnosti dobijenih frakcija (antioksidativni kapacitet i inhibitorna aktivnost angiotenzin I konvertujućeg enzima - ACE inhibitorna aktivnost) kao i hidrolizata. Kao bitan parametar koji određuje moguću primenu proteina i peptida pristupiće se određivanju tehnoloških svojstava dobijenih hidrolizata i nehidrolizovanog koncentrata proteina surutke. Na osnovu utvrđenih svojstava ispitivanih hidrolizata i peptidnih frakcija, razmotriće se mogućnost njihove primene u različite prehrambene proizvode, sa ciljem prevođenja konvencionalnih proizvoda u funkcionalne proizvode. Peptidi će biti korišćeni kao dodatak u fermentacioni napitak na bazi surutke, jogurt, masni krem i

čokoladu, ali i kao nosači za inkapsulaciju BMK (bakterija mlečne kiseline) u cilju povećanja probiotskog svojstva proizvoda.

Unapređenje postojećih i proizvodnja novih funkcionalnih proizvoda neophodna je kako bi pomogla ljudskom organizmu u borbi protiv štetnih agenasa kojima je svakodnevno izložen usled savremenog tempa i načina života. Jedno od efikasnijih rešenja vezanih za proizvodnju novih funkcionalnih proizvoda jeste proizvodnja funkcionalnih fermentisanih napitaka na bazi surutke. Proizvodnjom ove vrste napitaka u okviru samo jednog procesa iskorišćavaju se svi potencijali surutke kao sirovine i dobija se jeftin, zdrav i potpuno prirodan proizvod.

U ovom radu pristupiće se ispitivanju upotrebe proteina surutke i hidrolizata proteina surutke kao nosača za inkapsulaciju starter kulture koja je korišćena za fermentaciju napitka na bazi surutke, a sa ciljem poboljšanja stabilnosti i probiotskog svojstava proizvoda. Takođe, ispitiće se dodatak hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću proteinaze k, kao i frakcije ovog hidrolizata koja obuhvata peptide molekulske mase ispod 3kDa u fermentacioni supstrat, u različitim koncentracijama, a u cilju poboljšanja funkcionalnih karakteristika napitka. Pratiće se sledeći parametri: probiotsko svojstvo proizvoda (preživljavanja probiotske kulture u uslovima koji vladaju u gastrointestinalnom traktu), dugotrajnost proizvoda (vijabilnost BMK tokom čuvanja u frižideru), pH, titracijska kiselost, antioksidativna svojstava napitka i ACE inhibitorna aktivnost napitka. Prethodno navedeni hidrolizat i frakcija biće dodavani u masni krem u cilju povećanja antioksidativnog kapaciteta i ACE inhibitorne aktivnosti masnog krema. Ovi parametri biće praćeni tokom dva meseca čuvanja proizvoda. Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina biće dodavan u čokoladu sa ciljem proizvodnje proteinski obogaćenih čokoladnih barova. Nakon obogaćivanja čokolade peptidima, pristupiće se analizi svojstava proizvoda: antioksidativni kapacitet, raspodela čestica, reološka svojstva i ocenjivanju senzornih svojstva proizvoda.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Proteini surutke

Mleko predstavlja hranu koja u potpunosti zadovoljava potrebe za hranljivim materijama novorođenih sisara i predstavlja jedinu hranu u prvoj fazi njihovog života. Mleko je takođe poznato kao hrana koju odrasli sisari, sa izuzetkom čoveka ne konzumiraju. Mnogi naučnici smatraju da nije u „ljudskoj prirodi“ da konzumira mleko u odrasloj dobi, a taj stav je potkrepljen saznanjima da je veliki broj odraslih jedinki sisara pa i ljudi laktoza intolerantan, ali i da je prisutno otežano varenje kazeina. Mleko pored laktoze i kazeina sadrži mnoge bioaktivne materije, koje su u velikom procentu peptidnog karaktera i ulaze u sastav proteina mleka. Odličan izvor bioaktivnih komponenti mleka je surutka, koja zaostaje kao nus proizvod u industriji sira. Surutka sadrži sve bioaktivne komponente kao i mleko, ali ne sadrži teško svarljivi kazein. Kravlje mleko prosečno sadrži 3,5 % proteina, od čega 80,0 % kazeina i oko 20,0 % proteina surutke. U tradicionalnoj proizvodnji sira, bez obzira na način koagulacije mleka, proteini surutke u celosti prelaze u surutku, s obzirom da su neosetljivi na dejstvo kiselina i enzima, što nije slučaj kod surutke dobijena u proizvodnji sira iz ultrafiltriranog ili termički obrađenog mleka. U poslednje dve decenije razvoj separacionih metoda zasnovanih na selektivno propustljivim membranama, dovelo je do povećanja zastupljenosti i raznovrsnosti proteina surutke kao dodatka hrani. (Madureira i sar., 2007).

Proteini surutke su pretežno globularni termolabilni molekuli sa visoko zastupljenom strukturom α -heliksa. Slatka surutka osim proteina sadrži i glikomakropeptid (GMP) koji nastaje pri enzimskoj hidrolizi κ -kazeina (Bylund, 1995). Tačan sastav proteina surutke zavisi od više faktora: vrste surutke (slatka preko pH 5.6 ili kisela ispod pH 5.1 koja se dobija uglavnom u seoskim gazdinstvima), tipa mleka (ovčije, kozije, kravlje), perioda godine, perioda laktacije, vrste hrane korišćene u ishrani životinje. (Tavares i Malcata, 2013). U novije vreme kada pričamo o proteina surutke uglavnom se podrazumeva da je u pitanju slatka surutka, u slučaju da se radi o proteinima iz kisele surutke to se po pravilu naglasi. Sastav proteina surutke dat je u tabeli 1.

Tabela 1. Primarna struktura i osnovne karakteristike proteina surutke (Sharma and Shah, 2010; Zydney, 1998)

| Protein | Koncentracija, g/L | Molekulska težina, kDa | Broj amino kiselina |
|---|--------------------|---------------------------|---------------------|
| β-laktoglobulin | 1,3 | 18.277 | 162 |
| α-laktalbumin | 1,2 | 14.175 | 123 |
| serum albumin | 0,4 | 66.267 | 582 |
| imunoglobulin | 0,7 | 25.000 + 50.000 do 70.000 | - |
| Laktoferin | 0,1 | 80.000 | 700 |
| Laktoperoksidaze | 0,03 | 70.000 | 612 |
| Glukomakropeptid | 1,2 | 6.700 | 64 |

Proteini surutke spadaju u nutritivno najvrednije proteine zahvaljujući svom sastavu koji karakteriše veliki udeo esencijalnih aminokiselina. Takođe, proteini surutke imaju znatno veću biološku vrednost od kazeina i drugih proteinima animalnog porekla, uključujući i proteine jaja koji su dugo smatrani referentnim. Iskoristljivost proteina surutke u organizmu usko je povezana sa odnosom aminokiselina cistin/metionin koji je kod proteina surutke oko 10 puta veći nego kod kazeina. Pojedinačno proteini surutke kao i njihovi fragmenti pokazuju raznovrsna bioaktivna svojstva, kao što su antimikrobna i antiviralna svojstva, stimulatívno deluju na imunisistem, poseduju antikancerogenu aktivnost, antihipertenzivnu, antioksidativnu kao i druga pozitivna delovanja na organizam (Madureira i sar., 2007; Tavares i Malcata, 2013) Takodje, proteini surutke imaju odlična tehnološka svojstva, poput dobre rastvorljivosti, viskoznosti, sposobnosti želiranja i emulgovanja, pa se njihovi koncentraciji veoma često koriste u prehrambenoj industriji

β -laktoglobulin (β -LG) je kvantitativno najzastupljeniji protein surutke i čini oko 50-60% od ukupnog sadržaja proteina i prvi je otkriven 1934. (Fox 1998, Creamer 2003). β -laktoglobulin se sintetiše u mlečnim žlezdama preživara, ima više različitih struktura (A, B, C, D, DR, DYAK/E, F,H,G,I,W i X), a najčešća je β -laktoglobulin A. Izolovan je slabo rastvoran i male jonske jačine. Čine ga 162 aminokiseline, kvaterarna struktura zavisi od pH vrednosti, uglavnom je u obliku dimera. Pri vrednosti pH između 7,0 i 5,2 je oktamer, a pri pH vrednostima između 3,5 i 5,2 je monomer, sa dva cisteinska ostatka po monomeru na pH vrednosti 3,0 i pH vrednosti većoj od 8. Monomer β -LG ima slobodnu tiol grupu i dva disulfidna mosta, što mu daje specifičnu rigidnu strukturu.

β -LG je teško svarljiv. Pogotovo je otporan na hidrolizu pepsinom, što doprinosi velikoj zastupljenosti alergijske reakcije na ovaj protein. Za razliku od goveđeg β -LG-a, ovčiji je visoko osjetljiv na pepsin i lakše svarljiv. Zbog mogućnosti vezivanja velike količine vode utiče na povećanje viskoznosti i želatinoznu strukturu namirnica u kojima se nalazi. (Madureira i sar., 2007; Tavares i Malcata, 2013)

Deluje pozitivno na imunitet novorodjenčeta i učestuje u metabolizmu fosfora u mlečnim žlezdama. Aminokiseline sadržane u ovom proteinu su visoko važne, pored toga što pozitivno deluju na razvoj mišića, sadržaj esencijalne amino kiseline cisteina je visok, a ona podstiče sintezu glutationa, čiji pozitivan učinak na imunitet je široko poznat. β -LG utiče na imunitet i indirektno, vezivanjem retinske kiseline čiji je pozitivan uticaj na proliferaciju limfocita i aktivnost T-ćelija dokazan in vitro (Marshall, 2004). β -LG pokazuje prebiotičke karakteristike i utiče pozitivno na rast probiotičkih kultura *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* u crevima.

Prilikom varenja β -laktoglobulina otpuštaju se četiri peptidna fragmenta koja deluju baktericidno na Gram pozitivne bakterije. β -LG zajedno sa laktoferinom i α -laktalbuminom ima inhibitornu aktivnost prema virusu HIV-1. Dok laktoferin snažno inhibira HIV-1 reverznu transkriptazu, ali slabo inhibira HIV-1 proteazu i integrazu, β -LG i α -laktalbumin inhibiraju HIV-1 proteazu i integrazu, ali ne inhibiraju HIV-1 reverznu transkriptazu. Određene modifikacije β -LG daju moguće HIV-1 inhibitore, koji negativno deluju i na herpes simplex virus tipa 1 i 2. Ovo doprinosi verovanju da proteini surutke uz blage modifikacije mogu biti upotrebljeni za suzbijanje širenja genitalnog herpesa i HIV-a. (Marshall, 2004; Morris i Fitzgerald, 2008)

β -LG vezuje male hidrofobne ligande, kao što su, retinol, masne kiseline, triaminoglicerol, alifatični ketoni, aromatične komponente, vitamin D, holesterol, palmitinska kiselina, kalcijum i protoporfirin IX (Chatterton 2006). Konkretno, ovaj protein olakšava varenje mlečne mast tako što vezuje slobodne masne kiseline oslobodjene od strane lipaza u ustima, vezujući ove ligande on ih zbog svoje stabilnosti pri niskim pH vrednostima, prenosi kroz intestinalni trakt do receptora koji se nalaze na crevima novorodjenčeta. Takođe, pozitivno utiče na smanjenje nivoa holesterola u krvi i krvni pritisak. (Morris i Fitzgerald, 2008).

α -Laktalbumin (α -LA) je drugi po važnosti protein surutke, sadržan je u količini od oko 20% m/m ukupnih proteina surutke i u potpunosti se sintetizira u mlečnim žlezdama, gde služi kao koenzim u sintezi laktoze (Fox 1998). Sadrži 123 aminokiseline i predstavlja kalcijum metaloprotein globularne strukture, koja je stabilizovana sa 4 disulfidna mosta pri pH 5.4-9.0. Do sada su poznate tri varijacije α -laktalbumina, A, B i C pri čemu je B varijacija najčešća. Hromatografskim metodama i elektroforezom utvrđeno je da je termostabilniji od β -LG (pH 6.7) uz to da je njegova razgradnja reverzibilna do 75 °C (Tavares i Malcata, 2013).

Ovaj protein se najviše koristi kao dodatak hrane za bebe, jer je po aminokiselinskom sastavu najbliži proteinima u humanom mleku (Morris i Fitzgerald, 2008). α -laktalbumin predstavlja prebiotik, dokazano stimuliše rast određenih „dobrih“ bakterija u crevima. Takođe, u svom nativnom obliku, ali i hidrolizovan, podstiče stvaranje antigena, deluje stimulatивно na B-limfocite i T-ćelije. α -laktalbumin nosi u sebi fragmente koji poseduju antimikrobnu aktivnost (Haque i Chand, 2006; Haque i sar., 2009). Ti fragmenti se delom oslobađaju u gastrointestinalnom traktu tokom digestije proteina, ali u novije vreme kontrolisanom enzimskom hidrolizom dolazi do oslobađanja znatno većeg broja bioaktivnih peptida. α -laktalbumin pokazuje baktericidno dejstvo u gornjim respiratornim putevima, ali pokazuje i zaštitno dejstvo na gatričnu sluzokožu koja je oštećena dejstvom različitih agenasa, kao što su antiinflamatorni lekovi ili velike količine alkohola (Mezzaroba i sar., 2006; Rosaneli i sar., 2004).

α -laktalbumin doprinosi smanjenju rizika od pojave nekih vrsta kancera, jer utiče na deobu ćelija kada se inkorporira u ćelije u crevima sisara. Takođe može da prenosi Ca^{2+} i da indukuje apoptozu ćelija tumora. Deluje povoljno kod raka jajnika (Morris i Fitzgerald, 2008; Tavares i Malcata, 2013). Uz male izmene u strukturi α -laktalbumina kao što je otvaranje lanca humanog α -laktalbumina pomocu etilen diamin tetra sirćetne kiseline (EDTA) i stabilizacija vezivanjem oleinske kiseline, dobija se jedinjenje HAMLET (*engl. Human α -laktalbumin Made LEthal to Tumor cells*) koje ima antikancerogenu aktivnost tako što ulazi u ćeliju tumora, prolazi kroz citoplazmu do nukleusa i cepa DNK (Svanborg, 2003). HAMLET deluje povoljno kod lečenja više vrsta tumora mozga (Tavares i Malcata, 2013). BAMLET (*engl. Bovine α -laktalbumin*

Made LETHAL to Tumor cells) je goveđi ekvivalent HAMLET-u. BAMLET pokazuje citotoksički efekat na osam vrsta tumorskih ćelija tako što povećava permeabilnost lizozomnih membrana (Rammer, 2010).

α -laktalbumin pozitivno deluje na stres usled velike koncentracije triptofana, aminokiseline koja učestvuje u sintezi serotonina (hormona sreće), pa se i koristi u tretmanu lečenja hroničnog umora. Kod hronicnog stresa u mozgu dolazi do smanjene sinteze serotonina i triptofana. Sprovedenjem dijete zasnovane na α -laktalbuminu, povećava se količine triptofana, kao i sinteza i aktivnost serotonina (Marcus i sar., 2005). α -laktalbumin pokazuje snažan antihipertenzivni efekat, kroz ACE inhibitorno svojstvo (Camfield i sar., 2011).

Govedji serum albumin BSA (*engl. Bovin Serum Albumin*) se ne sintetiše u mlečnim žlezdama, vec u mleko dospeva „curenjem“ iz krvi. BSA čini 0,7 – 1,3 % m/m od ukupnih proteina surutke, čini ga 582 aminokiselinska ostatka i 17 disulfidnih mostova i jedna tiolna grupa na položaju 34. Zbog svoje veličine i strukture može vezivati slobodne masne kiseline i druge lipide, kao i aromatične komponente. Slično kao i kod β -LG, pri pH 6.5 i povišenoj temperaturi zbog karakteristične tiol-disulfidne veze dolazi do stvaranja želatinozne strukture (Tavares i Malcata, 2013).

BSA je kvantitativno slabo zastupljen protein surutke, pa se njegova aktivnost često razmatra u sklopu ostalih proteina surutke. Usled mogućnosti da vezuje slobodne masne kiseline i druge masti koje su skladistene u ljudskom organizmu, ima ulogu u sintezi masti, a one ulaze u sastav svih unutarćelijskih i spoljašnjih membrana. BSA poput antioksidansa štiti masti od oksidacije (Tavares i Malcata, 2013). Ovaj protein poseduje i ACE inhibitornu aktivnost kao i opioidne karakterisitke (Poltronieri, 2012).

Imunoglobulini (IG) predstavljaju kompleksnu grupu hemijskih jedinjenja koju proizvode B-limfociti i čine 10 – 15 % m/m od ukupne količine proteina surutke (Nakai i Modler, 1996). Imunoglobulini su monomeri ili polimeri sastavljeni od 4 lanca. Svrstani su u tri grupe prema funkciji koju imaju u ljudskom organizmu. IG_G , IG_A , IG_M . Čak 80% IG u surutki pripada IG_G grupi (Tavares i Malcata, 2013). Nalaze se u gotovo svim serumima i plazmi sisara, pa ih tako ima i u mleku, odnosno proteinima surutke. Neki od imunoglobulina nalaze se vezani za površinu i imaju ulogu receptora, dok drugi

imaju ulogu antitela koja se ispuštaju u krv i limfu. Uloga imunoglobulina u mleku je vrlo bitna za zdravlje novorođenčeta. Kako posteljica u kojoj se beba nalazi tokom razvoja u majčinom stomaku ne dozvoljava prolaz makromolekula, imunoglobulini veće molekulske mase se prenose sa majke na dete dojenjem pomoću majčinog mleka (Marshall, 2004).

Kako imunoglobulini predstavljaju specifičan i nespecifičan odgovor organizma na neki patogen ili štetan agens, tako je i manipulacija tj. stimulisanje proizvodnje ovih proteina moguće jednostavnim izlaganjem jedinke datom agensu. Imunoglobulini dobijeni iz mleka krava koje su vakcinisane, odnosno u čiji organizam su ubačeni oslabljeni virusi HRV serotip 1 i 2 (Humani Rota Virus), kao i rota virus majmuna serotip 3, pokazali su da imaju terapeutsko dejstvo kod svinja koje su zaražene pomenutim virusima. Takođe, imunoglobulini su pokazali terapeutsko dejstvo kod digestivnih infekcija, kao što je infekcija bakterijom *H. pyloriis* i enterotoksinom *E. coli*. (Madureira, 2007).

Imunoglobulini iz surutke pokazali su određen nivo zaštite zuba od pojave kariesa. Takođe, pozitivno deluju na sluzokožu gastrointestinalnog trakta i štite je od patogena. Trenutno se ispituje mogućnost korišćenja imunoglobulina iz mleka u lečenju obolelih od SIDA-e (Madureira, 2007).

Goveđi imunoglobulini povoljno utiču na proliferaciju B-limfocita i T-ćelija, stimulišu sintezu IG_G , IG_A i IG_M , što potvrđuje da goveši imunoglobulini dobijeni iz surutke imaju mogućnost da modifikuju imuni odgovor ljudskog organizma (Reitelseder i sar., 2011; Tipton i sar., 2004).

Takođe, uočen je pozitivan uticaj mleka krava koje su prethodno bile vakcinisane mešanom bakterijskom kulturom, na stanje pacijenata sa povišenim pritiskom i holesterolom. (Madureira, 2007)

Laktoferin (LF) je gvožđe helatni glikoproteinski monomer. Humani laktoferin sadrži 691 aminokiselinska ostatka, dok goveđi sadrži 989 aminokiselinska ostatka (Tavares i Malcata, 2013). U ljudskom organizmu se nalazi u mleku, suzama, pljuvački i drugim izlučevinama. Količina u mleku zavisi od perioda laktacije kao i vrste jedinke. U humanom mleku ga ima do 4,00 mg/mL, dok u kravljem znatno manje od 0,02 do 0,35mg/mL (Madureira, 2007).

Laktoferin pokazuje jako baktericidno dejstvo na širok spektar bakterija. Baktericidno dejstvo posledica je vezivanja za ćelijsku membranu bakterija (ugradjuje se u membranu vezivanjem za lipid A lipopolisaharid) čime narušava njenu strukturu. Deluje baktericidno kako na Gram pozitivne, tako i na Gram negativne bakterije. U eksperimentima je potvrđeno njegovo pozitivno dejstvo na detoksikaciju u slučaju *E. coli* endotoksina, pri čemu može reagovati udruženo sa lizozomima ili antitelima, imunoglobulinima i laktoperoksidazom. Znatno pojačava imuni odgovor na *Staphylococcus aureus*, a nepovoljno deluje i na *Streptococcus mutans* uzročnika zubnog karijesa, tako što onemogućava razvoj bakterija i formiranje filma (Madureira, 2007). Pokazao se dobro u prevenciji infekcije bakterijom *Haemophilus influenzae*, koja izaziva upalu uha kod dece, pokazao je dobre rezultate u borbi protiv infekcije *H. pylori* i *E. coli* (Madureira, 2007; Tavares i Malcata, 2013).

Nedavne studije na svinjama pokazale su da laktoferin ima i antifungalnu aktivnost i to na *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton Rubrum* izazivače kožnih oboljenja, a potvrđeno je i njegovo fungicidno dejstvo na vrste iz roda *Candida* (Morris i Fitzgerald, 2008).

Laktoferin je prvi protein surutke za koji je utvrđeno da ima antiviralnu funkciju (Marnila i Korhonen, 2009, Wakabazashi i sar., 2006). Deluju na niz virusa, a ispituje se i njegovo delovanje na HIV. Na različite viruse ima različit mehanizam delovanja. Uglavnom reaguje sa virusom, ali ne i sa ćelijom koja je zaražena virusom, u nekim slučajevima reaguje sa zdravom ćelijom i sprečava virus da prodre u nju, kao što je slučaj sa Hepatitisom B i enterovirusom 71. Takođe, govedji laktoferin redukuje nivo HVC-RNA seruma kod pacijenata koji boluju od hroničnog Hepatitisa C (Madureira, 2007).

LF ima važnu ulogu u jačanju imunog odgovora organizma. Pretpostavlja se da utiče na aktivnost makrofaga i da na taj način doprinosi boljem imunom odgovoru. Stimuliše i produkciju inflamatornih citokina, stimuliše proliferaciju limfocita i aktivnost monocita, dok dodatkom ishrani laktoferina hidrolizovanog pepsinom znatno se povećava sadržaj imunoglobulina u organizmu (Zimecki i sar., 2007). Na eksperimentu sa miševima uočeno je da i goveđi i ljudski laktoferin povoljno utiču na stanje kostiju (Cornish, 2004). Trenutno se proučava delovanje laktoferina kod autoimunih poremećaja, jer je pokazano da uz dodatak regularnoj terapiji, kod nekih bolesti pokazuju pozitivan učinak (Madureira, 2007).

Antikancerogena aktivnost laktoferina pripisuje se njegovoj sposobnosti da vezuje gvoždje, koje ima potencijalno mutageno dejstvo na ćelije, tako što uzrokuje oksidativna oštećenja na lancu nukleinske kiseline (Madureira, 2007). Pokazan je pozitivan uticaj kod raka debelog creva, jezika, jednjaka, pluća i bešike (Marshall, 2004). Za laktoferin je karakteristično da veoma povoljno deluje kao dodatak u terapiji obolelih od različitih vrsta kancera. Tamo gde sam ne daje nikakve rezultate, kao što je karcinom jetre, kada se doda regularnoj terapiji dolazi do značajnih poboljšanja (Marshall, 2004). U organima za varenje iz laktoferina se pod dejstvom pepsina oslobađa peptid Laktofericin, koji se označava sa LfcinB. Laktofericin ima citotoksični efekat na niz ćelijskih linija neuroblastoma, deluje na ćelije THP-1 (tip leukemije), a uočeno je da hidrolizati laktoferina, koji nastaju dejstvom peptidaza, pokazuju veći antikancerogeni efekat od samog laktoferina na mnoge vrste kancera, bez štetnog efekta na okolno tkivo (Tavares i Malcata, 2013).

Laktoperoksidaza je najznačajniji enzima u mleku. Mleko pa i surutka sadrže različite enzime, među kojima hidrolaze, transferaze, liaze, proteaze i lipaze. Laktoperoksidaza je enzim koji se izlučuje u mleku, pljuvački i suzama. Koliko će se laktoperoksidaze naći u mleku zavisi od mnogih faktora, između ostalog i perioda laktacije. Sadržaj varira od 0,25 do 0,5 % m/m u odnosu na ukupne proteine surutke. Tokom procesa pasterizacije ovaj enzim se ne inaktivira (Madureira, 2007).

Laktoperoksidaza ima vrlo bitnu ulogu u odbrambenom mehanizmu sisara. Ona, kao i sve peroksidaze, deluje antimikrobno na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Važno je napomenuti da ovaj enzim ima znatno veću aktivnost u kiselim, nego u

baznim uslovima. Za aktivnost laktoperoksidaze bitno je prisustvo SCN^- jona kao elektrodonora, koga u mleku ima u različitim koncentracijama zavisno od životinjske vrste, perioda laktacije i godisnjeg doba. Takođe, laktoperoksidaza deluje negativno na stvaranja karijesa (Tavares i Malcata, 2013).

Proteoze-peptoni (PP) predstavlja frakciju peptida koja je u goveđem mleku zastupljena sa 10 % m/m od ukupne količine proteina surutke. PP frakcija je podeljena u dve grupe. Prvu grupu čine peptidi nastali hidrolizom kazeina i to su PP5, PP8 „fast“ i PP8 „slow“, razvrstani na osnovu pokretljivosti prilikom elektroforeze. Druga grupa su hidrolizati koji ne potiču od kazeina i nađeni su samo u surutci ne i u mleku, označeni su sa PP3 i karakteriše ih izrazita hidrofobnost (Tavares i Malcata, 2013). PP3 je izgrađen od 135 amino kiselina i poseduje dva domena. Prvi domen je negativno naelektrisan i obuhvata N kraj zajedno sa amino kiselinama od 1. do 97. pozicije. Drugi domen je poznat pod nazivom laktoforicin, obuhvata C kraj molekula, preostale amino kiseline i pozitivno je naelektrisan. Laktoforicin ima sposobnost da prođe kroz lipidnu membranu (Campagna i sar., 2001) i poseduje bakteriostatičko dejstvo na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (Campagna i sar., 2004).

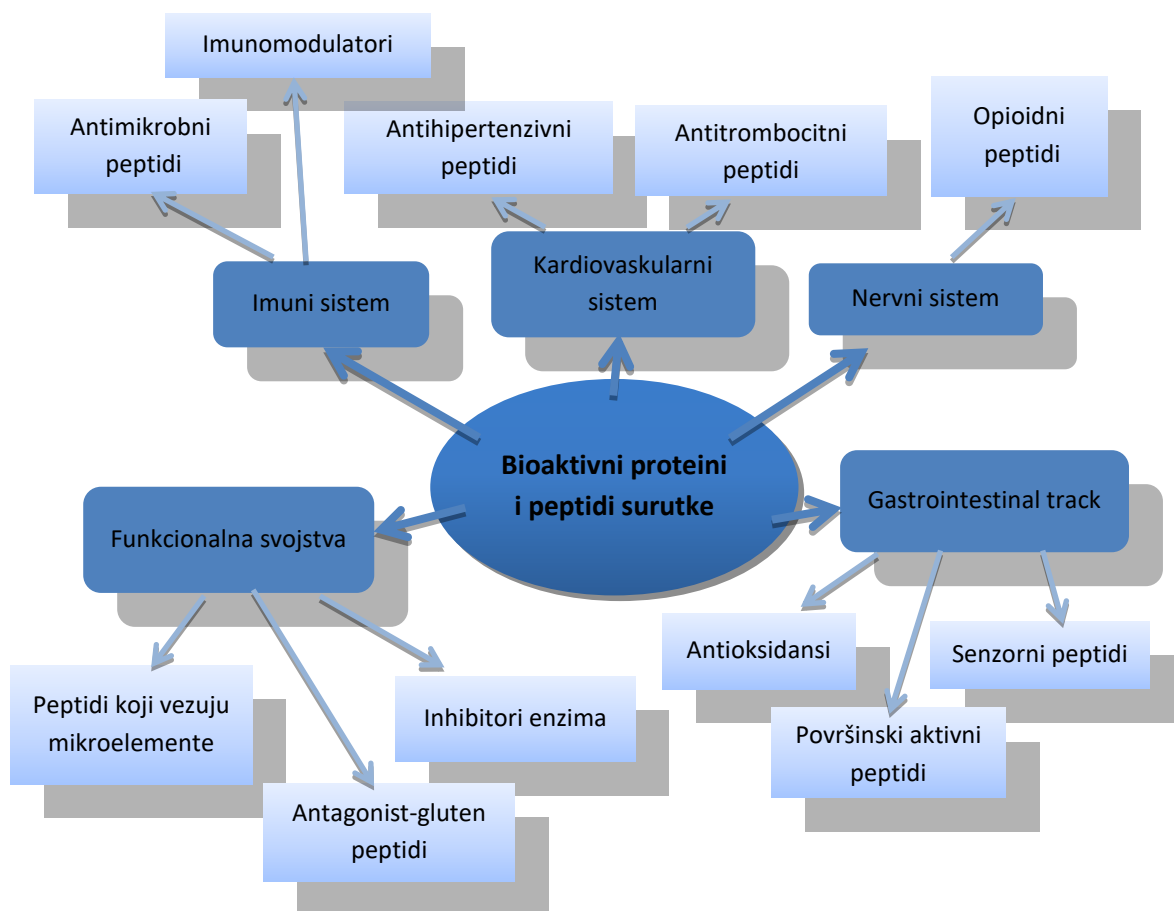
Kazeinmakropeptidi (CMP) je heterogena polipeptidna frakcija nastala cepanjem (na mestu $\text{Phe}_{105}\text{-Met}_{106}$) kazeina. Tokom proizvodnje sira, mleko biva hidrolizovano od strane renina, tako da kazein hidrolizuje na dva dela, jedan se nalazi u siru (para-kazein) a drugi CMP prelazi u surutku. CMP je izgrađen od 63 aminokiseline (aminokiseline koje se u kazeinu nalaze na položaju 106-169) i predstavlja 10 – 15 % (m/m) ukupnih proteina surutke. Može se nalaziti u više varijacija u zavisnosti od posttranslacionih promena: može da se glikolizuje uz stvaranje O-glikozid mosta ili fosforiluje (Tavares i Malcata, 2013).

CMP stimuliše rast korisnih bakterija u crevima. Poznato je njegovo prebiotičko dejstvo na vrste iz roda *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (Martinez i sar., 2009). Fosforilovani oblik CMP povećava rastvorljivost kalcijuma u crevima i pospešuje njegovu apsorpciju, a ova osobina dokazana je i kod drugih fosforilovanih ostataka kazeina (Martinez i sar., 2009). Mnoge studije dokazale su antimikrobnu aktivnost CMPa u borbi sa karijesom i oralnim patogenima kao što su *Streptococcus mutans* i *Prphyromonas gingivalis* (Aimutis, 2004). Glikolizovani oblik vezuje enterotoksine *Escherichia coli* i *Cholera*,

inhibira adheziju *H. pylori* i rota virusa za ćelijsku membranu, pri čemu sprečava njihovo prodiranje u ćeliju (Brody, 2000; Manso i Lopez-Fendino, 2004). CMP pokazuje jak antiinflamatorni uticaj (Requena i sar., 2009) i snažnu ACE inhibitornu aktivnost (Gobbetti i sar., 2007). Oralna primena stimuliše oslobađanje hormona sitosti (Yvon 1994). Goveđi, ovčiji i kozji CMP onemogućavaju agregaciju koja je preduslov za stvaranje tromba u krvotoku (Poltronieri i sar., 2012).

Koncentrat i izolat proteina surutke WPC (*engl. Whey Protein Concentrate*) je dobijen procesom ultrafiltracije (UF) ili dijafiltracije (DF), pri čemu se odstranjuje veći deo laktoze, minerala i komponenti male molekulske mase. Koncentracija proteina u ovom slučaju može biti 30%, 50% 65% i 80% (m/m), ukoliko je koncentracija proteina veća od 90% (m/m), tada je u pitanju izolat proteina surutke - WPI (*engl. Whey Protein Isolate*). WPC i WPI koriste se kao dodaci u ishrani i u industriji hrane. Ukoliko je pri obradi surutke korišćena i termička obrada tada dolazi do razgradnje α -LA i moguće je izdvojiti i njegove frakcije precipitacijom (Tavares i Malcata, 2013).

Mnoga istaživanja pokazala su da proteini surutke imaju pozitivan učinak na organizam čoveka (krv, kosti, mišići, imunisistem...) Najzastupljenija upotreba proteina surutke je pri napornim treninzima (za šta je najznačajniji BCAA niz amino kiselina koji je visoko zastupljen u proteinima surutke, a koji ima sposobnost da nepromenjen prođe kroz zid tankog creva i preko krvi putuje direktno do mišića gde učestvuje u njihovoj izgradnji), ali u novije vreme i u različitim dijetama usled povećanja osećaja sitosti nakon unosa proteina surutke. Proteini surutke na sitost utiču dejstvom na različite hormone. Sekretija insulina je direktno podstaknuta prisustvom proteina surutke u gastro intestinalnom traktu (Samra i sar., 2007; Brubaker i Anini, 2003). Skorije studije su pokazale da konzumacija surutke povećava glukoza zavisni insulinotrofni polipeptidni odgovor, mnogo jače nego BCAA lanac (Nilsson i sar., 2007). Iako je danas komercijalno najrasprostranjenije i najpoznatije pozitivno dejstvo proteina surutke na izgradnju mišićne mase, bioaktivnost ovih proteina je daleko šira. Dokazana dejstva proteina i peptida surutke na ljudski organizam predstavljena su na slici 1.



Slika 1. Dejstvo bioaktivnih proteina i peptida surutke na ljudski organizam

2.1.1. Produkcija bioaktivnih peptida iz proteina surutke

Bioaktivnim komponentama se smatraju one supstance (molekuli) koje se sastoje od proteina, lipida i/ili ugljenih hidrata i imaju sposobnost da izazovu biološki odgovor kao što je smanjenje hipertenzije, sprečavanje nastajanje karcinoma, povećanje čiste mišićne mase, stimulisanje imunog sistema i inhibiranje razvoja patogenih mikroorganizama. Pored toga funkcionalne supstance treba da imaju biološku aktivnost merljivu na fiziološki realnom nivou u opsegu u kome se nalaze u hrani (Hrnjez, 2015). Mleko i mlečni proizvodi se smatraju bogatim izvorom bioaktivnih peptida (Tidona i sar. 2009; Jäkälä i Vapaatalo 2010). Bioaktivni peptidi predstavljaju fragmente proteinskih molekula koji svoju aktivnost ispoljavaju kada se oslobode iz molekula. Hidroliza molekula i oslobađanje bioaktivnog peptida odigrava se na više načina. Najjednostavniji način je hidroliza proteina pomoću bakterijske kulture. U slučaju bakterijske kulture, ne

koriste se agresivne materije, uslovi su blagi, proces je čist, ali bakterijske kulture u sebi sadrže brojne enzime i mogućnost kontrole takvih procesa je dosta otežana. Hemijska hidroliza molekula je gotovo sasvim napuštena metoda zbog nemogućnosti kontrole procesa i neuniformnosti proizvoda, ali i zbog agresivnih hemikalija koje se primenjuju kao i mogućnosti gubitka jedne od vrlo vrednih aminokiselina, tirozina. Najzastupljeniji način dobijanja bioaktivnih peptida jeste kontrolisanom hidrolizom pomoću enzima.

Za dobijanje bioaktivnih peptida najčešće se koriste metode podeljene u tri grupe:

1. Hidroliza proteina dejstvom proteolitičke starter kulture
2. Hidroliza proteina dejstvom digestivnih enzima
3. Hidroliza proteina dejstvom nedigestivnih enzima

2.1.1.1. Hidroliza proteina delovanjem proteolitičke starter kulture

Poznato je da određene bakterije mlečne kiseline imaju proteolitičku aktivnost. Bioaktivni peptidi tokom procesa obrade mleka mogu nastati delovanjem enzima nativnih mikroorganizama ili enzima upotrebljenih starter kultura. Peptidi koji se otpuštaju tokom fermentacije doprinose teksturi i ukusu fermentisanog proizvoda i to je razlog zašto veliki broj starter kultura koje se komercijalno koriste u proizvodnji jogurta i drugih mlečnih fermentisanih i probiotskih napitaka poseduje proteolitičku aktivnost. Tako se u mnogim fermentisanim proizvodima od mleka i surutke pored mlečne kiseline oslobađaju i različiti bioaktivni peptidi. Ovaj proces je vrlo kompleksan i slabo kontrolisan upravo zbog niza prapratnih biohemijskih procesa koji se odvijaju tokom fermentacije uporedo sa hidrolizom proteina.

Jedna od najčešće korišćenih proteolitičkih kultura je *Lactobacillus helveticus*. Mnoga istraživanja su pokazala da fermentacijom mleka ovom kulturom dolazi do oslobađanja ACE inhibitornih peptida VPP i IPP (Elfahri, 2012). Identifikovani su ACE inhibitorni peptid iz proteina surutke hidrolizovanog pomoću bakterijske vrste *L. helveticus* (Pan i Guo, 2010). Iako nije primenjena živa kultura, korišćen je neprečišćen sirovi enzimski kompleks koji je obuhvatao proteinaze ćelijskog zida kao i intracelularne peptidaze. Takođe, dokazano je oslobađanje ACE inhibitornih peptida tokom procesa fermentacije

i proizvodnje sira sa različitim bakterijskim kulturama (Pihlanto-Leppala i sar., 1998). Naime, u pomenutom istraživanju, prisustvo antihipertenzivnih peptida nije dokazano tokom i nakon same fermentacije, ali je naknadnom digestijom pomoću pepsina i tripsina došlo do otpuštanja ovih bioaktivnih peptida.

Fermentacija je kompleksan proces koji podrazumeva prisustvo žive kulture, sa svim njenim enzimima. Veliki broj enzima u sistemu zahteva i kompleksan sistem kontrole procesa, sa mogućnošću velikog broja grešaka. Iako je fermentacija jeftin i jednostavan proces za produkciju zdravog funkcionalnog probiotskog proizvoda, ona ipak zbog svojih karakteristika, nije najbolji način za dobijanje željenih bioaktivnih peptida. Kontrolisana enzimaska hidroliza je postupak koji zadovoljava potrebe za konstantnim i visokim prinosom bioaktivnih peptida.

2.1.1.2. Kontrolisana enzimaska hidroliza proteina surutke

Kontrolisana enzimaska hidroliza podrazumeva enzimsko cepanje proteina na manje frakcije različitih molekulskih masa, pod kontrolisanim uslovima. Hidroliza se uglavnom prekida termičkom ili pH inaktivacijom enzima nakon što je određen stepen hidrolize dostignut. Stepen hidrolize je važan pokazatelj stepena degradacije proteina i u najvećem broju slučajeva intenzivno raste u prvih 60 do 90 min, a nakon toga u zavisnosti od enzima, supstrata i uslova stagnira ili značajno usporava sa rastom (Drakova i sar., 2010; Herregods i sar., 2015; Krunić i sar., 2015). Važno je napomenuti da neke aktivnosti frakcija i peptida nisu proporcionalne stepenu hidrolize. Tako je dokazano da u mnogim slučajevima ACE inhibitorna aktivnost, redukciona snaga i antioksidativni kapacitet hidrolizata rastu do određenog stepena hidrolize, a zatim sa nastavkom hidrolize ACE inhibitorna aktivnost kao i redukciona snaga opadaju (Herregods i sar., 2015, Corea i sar., 2014).

Enzimi digestivnog trakta kao što su tripsin i himotripsin su najčešće korišćeni enzimi u slučaju kontrolisane enzimske hidrolize. Takođe, enzimi kao što su pepsin, termolizin, alkalaze, bakterijske proteinaze su dosta ispitivani katalizatori. Heksapeptid VAGTWY dobijen hidrolizom β -laktoglobulina pomoću tripsina poseduje antioksidativnu, ACE inhibitornu i DPP-IV-inhibitornu aktivnost (Power i sar., 2014). Hidrolizat dobijen dejstvom alkalaze sadrži peptid VHLKP koji poseduje značajnu antioksidativnu

aktivnost (Kong i sar., 2012). Proteini surutke hidrolizovani pepsinom poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost (Theolier i sar., 2013), a laktoferin hidrolizovan pepsinom poseduje snažan antimikrobni kapacitet prema *Escherichia coli* K12 (Quintieri i sar., 2012). Veoma izraženu antimikrobnu aktivnost poseduje i hidrolizat dobijen kombinovanom hidrolizom pepsina i tripsina (Benkerroum, 2010). Hidroliza α -LA i β -LG pepsinom i tripsinom, zasebno, ali i kombinovanom hidrolizom rezultira sličnom ACE inhibitornom aktivnost hidrolizata, dok se stepen hidrolize povećava u slučaju kombinovane hidrolize (Mullally i sar., 1997). Ovo je još jedan pokazatelj da bioaktivnost hidrolizata nije nužno proporcionalna stepenu hidrolize, odnosno da kombinacijom različitih enzima možemo uticati na povećanje stepena hidrolize i oslobađanje peptida, ali to nužno ne vodi ka povećanju bioaktivnosti peptida.

Digestivni enzimi su zbog svoje dostupnosti najčešće primenjivani enzimi. Ipak, oni imaju i određene nedostatke. Tako je goveđi β -LG potpuno otporan na dejstvo pepsina (Kim i sar., 2010), a poznato je i da su frakcije koje sadrže prolin visoko rezistentne na dejstvo digestivnih enzima (Beermann i sar., 2013).

Upotrebom peptidaza iz voća *Maclura pomifera* moguća je gotovo potpuna degradacija α -LA i β -LG, a dobijene frakcije molekulske mase manje od 3kDa poseduju ACE inhibitornu i antioksidativnu aktivnost (Bertucci i sar., 2015). Takođe, hidrolizu proteina surutke i oslobađanja peptida sa ACE inhibitornom aktivnošću moguće je izvesti pomoću vodenog ekstrakta biljke *C. cardunculus* koji sadrži i rastvorene enzime (Tavares i sar., 2011). BSA, α -LA i β -LG pokazuju značajnu rezistentnost na papain, dok alkalaza hidrolizuje sva tri proteina sa visokim stepenom hidrolize (Kim i sar., 2010). Visok stepen hidrolize pokazale su i mikrobne proteaze kao što su alkalaza, flavourzime, protamax i neutraza uz značajan porast antioksidativne aktivnosti u hidrolizatu (Adriana i sar., 2010). Bioaktivnosti, određenih fragmenata dobijenih kontrolisanom enzimskom hidrolizom predstavljeni su u tabeli 2.

Tabela 2. Bioaktivni fragmenti oslobođeni hidrolizom iz različitih proteina surutke

| Protein | Enzim | fragment | | Bioaktivnost | Reference |
|-------------------------------|------------|--|---|--|--------------------------------|
| α-LA | / | f(97–104) | DKVGINYW | ACE inhibitor | Tavares i sar., 2011 |
| | / | / | KGYGGVSLPEW | | |
| | / | f(59–60) | IW | Antihipertenzivna | Martin i sar., 2008 |
| | Tripsin | f(104-108) f(99–108) | WLAHK VGINYWLAHK | ACE-inhibitor | Pihlanto-Leppälä i sar., 2000 |
| | Pepsin | f(117-121) | K7VGIN | Antimikrobna aktivnost: uglavnom Gram (-) bakterije, | Theolier i sar., 2013 |
| | / | f(50-53) | YGLF | Opioidna aktivnost, ACE inhibitor | Haque i sar., 2009 |
| | / | / | YGGF | Opioidna aktivnost | Ijaes i sar., 2004 |
| | Pepsin | / | / | Antimikrobna | Quintieri i sar., 2012 |
| LF | | | | | |
| BSA | / | / | ALKAWSVAR | ACE inhibitor | Poltronieri i sar., 2012 |
| | / | f(399-404) | YGFQDA | Opioidna aktivnost | |
| GMP | Tripsin | f(106-112) f(106-111) | MAIPPKK MAIPPK | ACE inhibitor | Gobbetti i sar., 2007 |
| | / | f(106-116) | / | Antitrombocitna aktivnost | Phelan i Kerins, 2011 |
| | / | f(108-110) f(106-112) f(113-116) f(112–116) | / | Antitrombocitna aktivnost | Martinez i sar., 2009 |
| β-LG | / | f(33–42) | DAQSAPLRVY | ACE inhibitor | Tavares i sar., 2011 |
| | / | f(40–42) f(122–124) | RVY LVR | Antihipertenzivna aktivnost | Hernández-Ledesma i sar., 2004 |
| | / | f(46–48) | LKP | Antihipertenzivna aktivnost | Català-Clariana i sar., 2010 |
| | / | f(142–145) | ALPM | | |
| | / | f(15–20) | VAGTWY | | |
| | / | f(36–42) | SAPLRVY | ACE inhibitor | Welderufael i Jauregi, 2010 |
| | / | f(102-105) | YLLF | ACE inhibitor, opioidna aktivnost | Sipola i sar., 2002 |
| | / | / | TPEVDDEALEK | ACE inhibitor | Picariello i sar., 2010 |
| | / | f(78-80) | IPA | ACE inhibitor | Meisel i sar., 2009 |
| | / | f(102-103) | YL | ACE inhibitor | |
| / | f(142-148) | ALPMHIR | ACE inhibitor | | |
| | Trypsin | f(15-20) f(25-40) f(78-83) f(92-100) | VAGTWY AASDISLLDAQSAPLR IPAVFK VLVLDTDYK | Antimikrobna aktivnost: uglavnom Gram (+) bakterije | Pellegrini i sar., 2001 |

| | | | | |
|--|--------------------------------------|------------------------------|--|---|
| | / f(71-75) | IIAEK | Hipoholesterolemična svojstva | Nagaoka, 2006 |
| | f(22-25) | LAMA | ACE inhibitor | Pilhanto-Leppälä i sar., 2000 |
| | / | VAGTWY | ACE inhibitor, DPP-IV inhibitor i antioksidans, Antioksidans | Power i sar., 2014 |
| | f(15-20) | VAGTWY | | |
| | f(19-29) | / | | |
| | f(145-149) | / | | |
| | f(42-46) | / | | |
| | f(58-61) | / | | |
| | f(95-101) | / | | |
| | / | IPAVFK, VAGTWY | DPP-IV inhibitor | Silveira i sar., 2013; |
| | / | TPEVDDEALEK | | Uchida i sar., 2011 |
| Pepsin | f(15-20), f(50-54) f(117-121) | VAGTWY PEGDL KVGIN | ACE inhibitor Antimikrobna aktivnost: uglavnom Gram (-) bakterije | Ijäs i sar., 2004 Theolier i sar., 2013 |
| | f(14-18) f(123-125) f(147-149) | K14VAGT VRT IRL | Antimikrobna aktivnost: uglavnom Gram (+) bakterije | |
| Pepsin + Trypsin + Chymotr ypsin | f(94-100) | VLDTDYK | ACE inhibitor | Pilhanto-Leppälä i sar., 2000 |
| Corolase PP | (f19-29) (f42-46) f(145-149) | WYSLAMAASDI YVEE MHIRL | Antioksidans | Hernández- Ledesma i sar., 2005 |
| Chymotry psin | f(146-149) | HIRL | “ileum-contracting” aktivnost | Sipola i sar., 2002 |

2.1.2. Tehnološka svojstva proteina surutke

Da bi se bioaktivni proteini i peptidi surutke primenili u proizvodnji funkcionalne hrane potrebno je poznavati njihovo ponašanje i tehnološka svojstva u uslovima proizvodnje i čuvanja proizvoda. Najznačajnija tehnološka svojstva proteina za primenu u prehrambenoj industriji su rastvorljivost, sposobnost zadržavanja vode i ulja, stvaranja pene i emulgjuća svojstva.

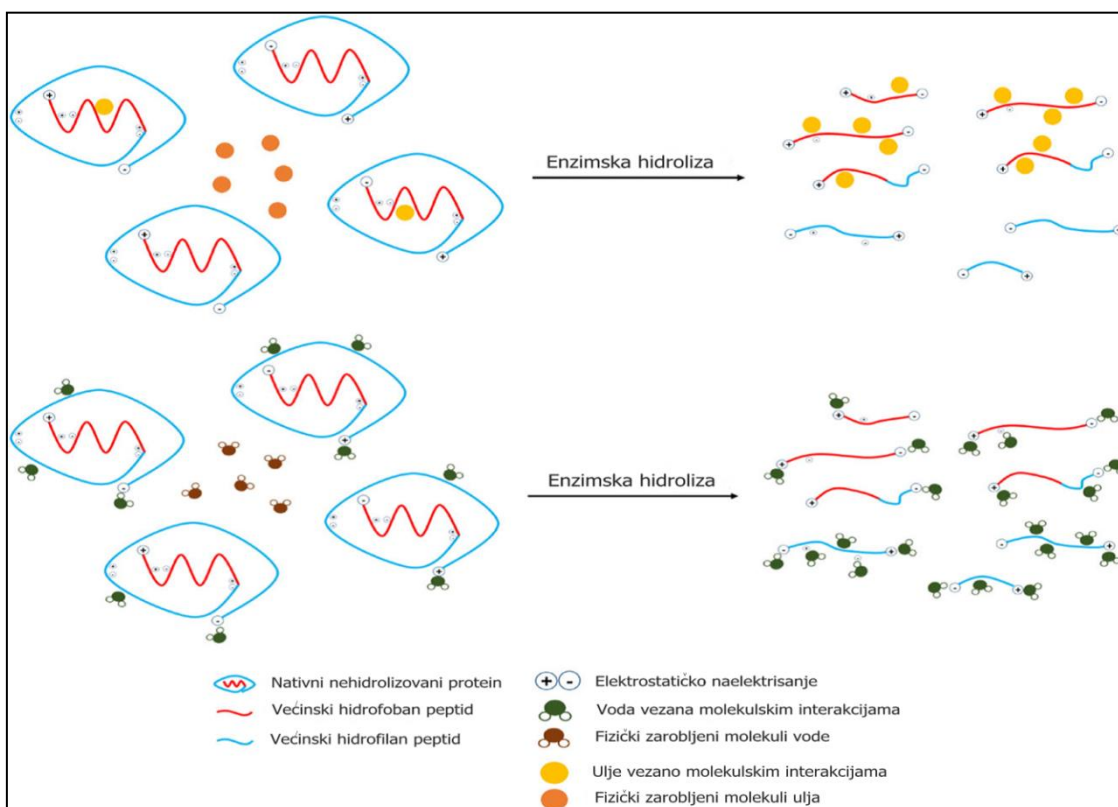
2.1.2.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost predstavlja najznačajniju osobinu proteina kada su u pitanju tehnološka svojstva. Da bi proteini mogli biti korišćeni u formulaciji napitka potrebno je da budu rastvorljivi u vodi. Rastvorljivost proteina predstavlja balans između hidrofobnosti tj. težnje molekula ka međusobnoj interakciji i stvaranja protein-protein veza koje smanjuju rastvorljivost proteina i hidrofilitnosti odnosno sposobnosti proteina da grade protein-voda veze, što povećava rastvorljivost proteina. Ove karakteristike proteina su u direktnoj vezi sa primarnom strukturom proteina (Walstra, 2003). Na rastvorljivost proteina veliki uticaj imaju i spoljašnji faktori kao što su pH, temperatura kao i prisustvo i koncentracija različitih agenasa u sistemu. Iako mnogi faktori utiču na rastvorljivost uočeno je da veliki proteini uglavnom pokazuju znatno slabiju rastvorljivost od manjih proteina. Enzimaska hidroliza proteina znatno redukuje molekulsku masu proteina, ali i oslobađa jonizujuće grupe što doprinosi povećanju rastvorljivosti (Wouters i sar., 2016).

2.1.2.2. Kapacitet vezivanja vode i ulja

Kapacitet vezivanja vode ima veliki uticaj na teksturu proizvoda. Najprihvaćeniji proteini od strane konzumenata su proteini mesa. Ovi proteini imaju veliki kapacitet vezivanja vode i masnoće što značajno doprinosi organoleptičkim svojstvima proizvoda koji sadrže proteine mesa. S tim u vezi, proteini koji pokazuju dobar kapacitet vezivanja vode i ulja, blizak kapacitetu koji ispoljavaju proteini mesa, mogu biti korišćeni kao alternativa mesnim proteinima u hrani (Cassiani i sar., 2013). Enzimaska hidroliza se primarno ne vrši da bi se ovo svojstvo proteina povećalo, ali svakako da može značajno

da doprinese kapacitetu vezivanja vode i ulja (Wouters i sar., 2016). Molekuli različitih dužina i strukture različito reaguju sa vodom i mastima. Veliki molekuli poput dugačkih proteina imaju sposobnost zadržavanja vode i ulja na dva načina. Prvi je hemijskim vezivanjem, a drugi fizičkim „hvatanjem“ molekula između proteina. Kratki peptidni lanci nemaju sposobnost fizičkog „hvatanja“ molekula vode i ulja (slika 2).

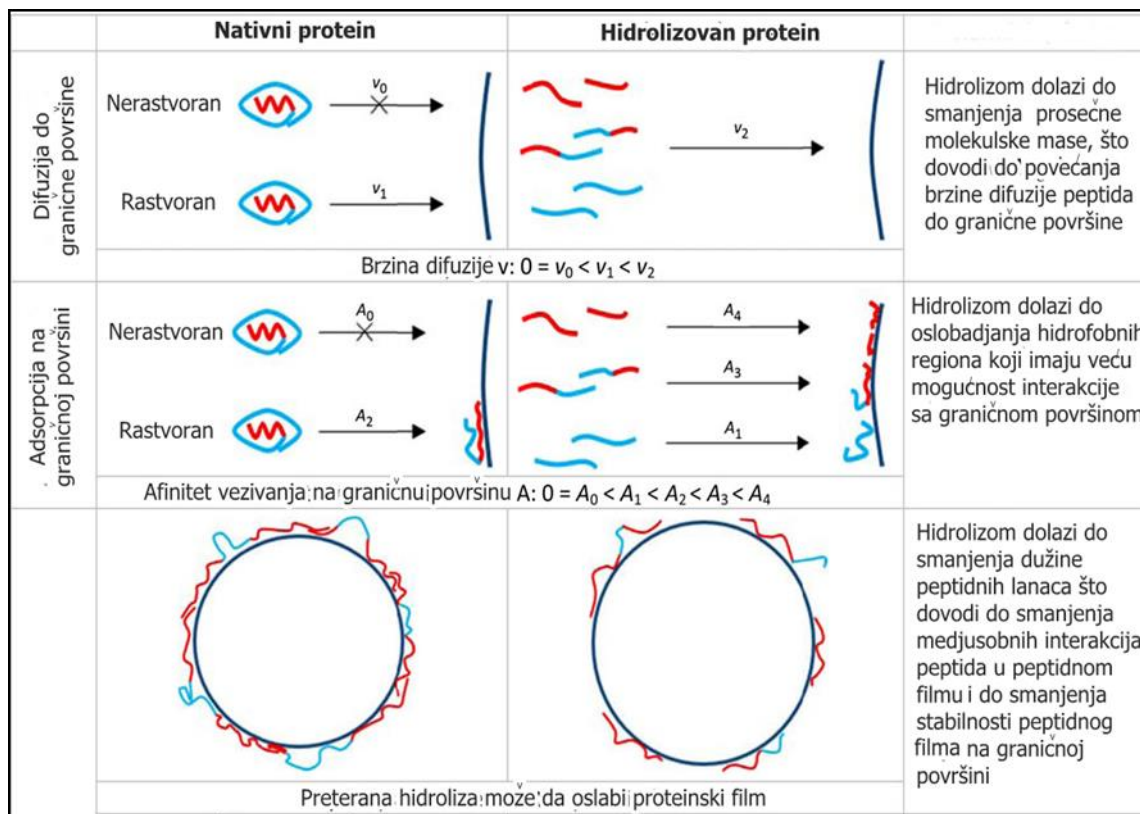


Slika 2. Dva načina zadržavanja vode i ulja od strane proteina surutke (Wouters i sar., 2016)

2.1.2.3. Sposobnost stvaranja pene i emulgovanja

Pena predstavlja disperziju gasa (uglavnom vazduha) u kontinualnu fazu (uglavnom različite tečne faze, ređe čvrste kao što je slučaj kod hleba i različitih peciva i kolača). Stvaranje pene i njena postojanost igra bitnu ulogu i važnu strukturnu i teksturnu formu kod mnogih proizvoda (kolači, torte, kremovi, kafa...). Za stvaranje pene neophodno je uneti veliku količinu energije u sisitem, ali i pored toga pena kao forma je nestabilna. Nestabilnost pene potiče od toga što su interakcije između molekula vode znatno jače nego interakcije između vode i vazduha, zbog čega dolazi do spajanja manjih molekula

u veće i do smanjenja tečnog sloja između mehurova tj. do nestanka stvorene pene. Stabilnost pene je ključan parameter kod spravljanja mnogih proizvoda pekarske industrije, ali i različitih kremova u konditorskoj industriji.



Slika 3. Shematski prikaz interakcija nativnog i hidrolizovanog proteina na graničnoj površini u slučaju pene ili emulzije (Wouters i sar., 2016)

Za proizvodnju kremova pored stvaranja pene, bitno svojstvo proteina je sposobnost emulgovanja. Emulzija predstavlja dve faze koje se ne mešaju, uglavnom su to voda i ulje. Kao i kod pene, emulzija je termodinamički nestabilna. Uljana faza u emulziji kao i gasovita faza kod pene, teži da se izdvoji na površinu vodene faze. Proteini rastvoreni u kontinualnoj fazi imaju sposobnost da se u većoj ili manjoj meri ponašaju kao surfaktanti i smanje površinski naboj što doprinosi stabilnosti pene i emulzije. Enzimaska hidroliza može značajno da utiče na sposobnost proteina da stabilizuju penu i emulziju, ali je važno naglasiti da visok stepen hidrolize ne vodi nužno boljim emulgujućim svojstvima. Ovo se objašnjava pojavom da veoma mali peptidi nemaju kapacitet da formiraju stabilan peptidni film na graničnoj površini između vode i vazduha, odnosno vode i ulja (Wouters i sar., 2016). Prednost peptida u odnosu na velike molekule

proteine u stabilizaciji pene i emulzije je u tome što peptidi brže difunduju kroz medijum i dospevaju na granicu faza koju oblažu tankim slojem, hidrofobni delovi proteina su nakon hidrolize oslobođeni, disulfidni mostovi su raskinuti i te grupe su slobodne da intereaguju i stabilizuju površinu faze (Wouters i sar., 2016). Hidrofobnost i predhodna hidroliza predstavljaju važne parametre pri izboru peptida koji imaju snažan potencijal stabilizovanja pene pre svega zbog brze adsorpcije na površini faza i stvaranja tanjeg sloja peptida, kao i zbog formacije hidrofobne protein-protein interakcije. Dejstvo proteina i peptida na stabilnost pene i emulzije prikazano je na slici 3.

2.2. Primena proteina surutke

Primena proteina surutke usled njihove dokazane bioaktivnosti ogleda se u dodatku ovih proteina i peptida u različite proizvoda sa ciljem kreiranja funkcionalnog proizvoda.

2.2.1. Definicija i klasifikacija funkcionalne hrane

Funkcionalna hrana je kategorija proizvoda nastala u poslednjih dvadesetak godina. Pojam funkcionalna hrana se prvi put pojavio u Japanu 1991. godine kada je bio korišćen za opisivanje prehrambenih proizvoda obogaćenih nutrijentima sa pozitivnim fiziološkim delovanjem (Hardy, 2000). U većini zemalja ne postoje zakonom regulisane definicije pojma „funkcionalna hrana“, tako da postavljanje granice između konvencionalne i funkcionalne hrane predstavlja nerešeno pitanje za nutricioniste i prehrambene tehnologe (Kwak i Jukes, 2001). Funkcionalnu hranu možemo definisati kao hranu sa uravnoteženim odnosom hranljivih materija, koja utiče pozitivno na ljudsko zdravlje (Hardy, 2000).

Funkcionalna hrana je hrana koja u svom sastavu ima biološki aktivne komponente i koja u skladu sa naučnim potvrdama, ukoliko se konzumira u uobičajenoj količini, pozitivno utiče na određene funkcije u organizmu (Ashwell, 2002)

Jedna od definicija koja na jednostavan način objašnjava pojam funkcionalne hrane je ta da se hrana može nazvati „funkcionalna“ ako pored svoje osnovne nutritivne vrednosti, na pozitivan i zadovoljavajuć način utiče na jednu ili više ciljanih funkcija u organizmu,

smanjujući rizike za nastanak i razvoj pojedinih bolesti. Funkcionalna hrana, dakle može poboljšati opšte stanje organizma, smanjiti rizik od oboljavanja, pa čak može biti i korisna tokom lečenja nekih bolesnih stanja (Menrad, 2003).

Evropska komisija za koordinaciju aktivnosti vezanih FUFOSSE (*engl. Functional Food Science in Europe* - Nauka o Funkcionalnoj Hrani) koordinisana od strane ILSI Europe (*engl. International Life Science Institute* - Evropski Međunarodni Institut Prirodnih Nauka) je sa druge strane dala jedinstvene odrednice prema kojima funkcionalna hrana:

- treba da bude konvencionalna i svakodnevna hrana,
- može da se konzumira kao deo uobičajene prehrane,
- je prirodnog sastava (suprotno od sintetskog) sa komponentama koje se mogu prirodno naći u toj hrani ili su dodate u većoj količini od koncentracije specifične za tu hranu,
- ima pozitivan uticaj na fiziološke funkcije,
- može poboljšati opšte zdravstveno stanje ili smanjiti rizik od bolesti,
- ima potvrđene i utemeljene zdravstvene tvrdnje (Diploc i sar., 1999; Roberfroid, 2000).

Funkcionalna hrana ne mora nužno biti funkcionalna za celu populaciju. Spajanje individualnih biohemijskih potreba s određenim komponentama hrane može uticati na napredak u razumevanju interakcija između gena i hrane. Međutim, jako je bitno napraviti razliku između hrane i leka. Ako se u proizvodu prepoznaju indikacije za lečenje ili prevenciju određenih bolesti, onda je taj proizvod lek i izvesna doza toksičnosti je tolerantna, ali ako se u proizvodu ne prepoznaju indikacije za lečenje ili prevenciju određenih bolesti, onda je to hrana i u tome slučaju pri normalnim količinama unosa ne sme izazivati nikakve toksične efekte (Balenović i Bačić, 2002).

Osnovna podela funkcionalne hrane je u pet grupa prema načinu nastanka (Spence, 2006):

1. Nemodifikovana i neprerađena hrana (*engl. whole food*) je najjednostavniji oblik funkcionalne hrane, hrana u svom prirodnom obliku.
2. Pojačana hrana (*engl. fortified food*) je nastala povećanjem količine nutrijenata koji se prirodno nalaze u njoj

3. Obogaćena hrana (*engl. enriched food*) je nastala dodatkom novih nutrijenata koji prirodno u njoj nisu prisutni
4. Izmenjena hrana (*engl. altered food*) je nastala zamenom postojećih nutrijenata novim koji imaju povoljan učinak na zdravlje ljudi
5. Poboljšana hrana (*engl. enhanced commodities*) je hrana kod koje su jedan ili više nutrijenata prirodno obogaćeni putem specijalnih uslova gajenja ili genetskim manipulacijama.

Postoje i mnoge kompleksnije podele funkcionalne hrane i to na osnovu (Juvan i sar., 2005):

1. Grupe namirnica kojoj pripada (mleko, meso, jaja, žitarice, ulja i masti, konditorski, pekarski proizvodi itd.)
2. Fizičko-hemijskih i organoleptičkih osobina (čvrsta hrana, napitak, krem, sos)
3. Procesu proizvodnje (fermentacija, enkapsulacija, zamrzavanje)
4. Vrste bioaktivne komponente (npr. minerali, antioksidansi, lipidi, probiotici, prebiotici)
5. Bolesti koju sprečava ili ublažava (dijabetes, osteoporoza, rak debelog creva)
6. Fiziološkog efekta (imunologija, anti-tumor efekat, varenje)

U ovom radu je velika pažnja posvećena funkcionalnim fermentisanim proizvodima na bazi mleka i surutke. Fermentisani mlečni proizvodi se tradicionalno smatraju zdravim i u tom kontekstu pružaju široke mogućnosti za nadogradnju i unapređenje po pitanju funkcionalnosti. To su proizvodi koji u sebi pored tradicionalnih bakterija mlečne kiseline (BMK) sadrže dodatne probiotske sojeve, sa dokazanim terapijskim efektom, i predstavljaju najsvetliji primer unapređenja tradicionalnih mlečnih proizvoda u funkcionalne mlečne proizvode (Juvan i sar., 2005). U tabeli 3 su prikazane funkcionalne karakteristike i zdravstveni efekti komponenata koje se formiraju tokom fermentacije mleka.

Tabela 3. Funkcionalne karakteristike i zdravstveni efekti komponenata koje se formiraju tokom fermentacije mleka (Beermann i Hartung, 2013)

| Komponenta | Funkcija u organizmu |
|---|---|
| Kiseline: mlečna, acetatna, propionska i limunska | Produkti acidifikacije, konzervišući uticaj, poboljšanje arome, antimikrobno i antikancerogeno dejstvo, uticaj na imuni sistem. |
| Slobodne masne kiseline | Uticaj na teksturu i stabilizaciju teksture, smanjenje holesterola u krvi. |
| Bakteriocini: nizin, lakticin, pediocin, acidofilin | Antimikrobna svojstva |
| Sfingolipidi: sfingomijelin, glukozilceramid, laktozilceramid | Antikancerogena svojstva, zaštita protiv bakterijskih infekcija u stomaku. |
| Bioaktivni peptidi: <u>Peptidi iz kazeina:</u> | Antihipertenzivna |
| ➤ α -s _{1/2} kazeinski peptidi | Antimikrobna svojstva |
| ➤ β - kazeinski peptidi | Antioksidativna svojstva |
| ➤ κ -kazeinski peptidi | Imunostimulaciona svojstva, |
| ➤ kazeinski fosfopetidi | |
| <u>Petidi iz proteina surutke:</u> | Opioidni agonisti/antagonisti |
| ➤ α -laktoalbuminski peptidi | Mineralno vezujuća uloga. |
| ➤ β -laktoglobulinski peptidi | |
| <u>Peptid laktoferina</u> | |

Mleko je kompleksna mešavina specifičnih bioaktivnih proteina, masti i šećera koja sadrži veliki broj biološki aktivnih supstanci među kojima su imunoglobulini, enzimi, antimikrobni peptidi, oligosaharidi, hormoni... (Pouliot i Gauthier, 2006). Proteini mleka ispoljavaju svoju biološku aktivnost direktno kao i putem svojih produkata razgradnje, a utiču na imunitet, u velikoj meri na kardiovaskularni i nervni sistem čoveka (Korhonen i Pihlanto, 2006).

Funkcionalni mlečni proizvodi se, prema obliku u kom se nalaze, mogu podeliti na:

1. Funkcionalni mlečni proizvodi u čvrstom stanju
2. Funkcionalni mlečni napici

Funkcionalni mlečni napici se zatim prema sastavu osnovne sirovine mogu podeliti na:

1. Funkcionalni napici na bazi mleka
2. Funkcionalni napici na bazi surutke

Funkcionalni napici na bazi surutke se prema načinu proizvodnje mogu podeliti na:

1. Funkcionalni nefermentisani napici na bazi surutke
2. Funkcionalni fermentisani napici na bazi surutke

Funkcionalni fermentisani napitak na bazi surutke se takođe mogu svrstati u dve kategorije po tipu mikroorganizama koji su prisutni u napitku

1. Neprobiotski napici na bazi surutke predstavljaju napitke koji se dobijaju fermentacijom surutke pomoću bakterija mlečne kiseline koje ne spadaju u probiotike. Najčešće primenjivani mikroorganizmi u proizvodnji ove vrste napitaka su razne jogurtne kulture koje se tradicionalno koriste u proizvodnji jogurta. Sa druge strane pri proizvodnji ovih napitaka veoma često se koriste sojevi koji proizvode neku fiziološki aktivnu komponentu koja zapravo doprinosi funkcionalnosti napitka.
2. Probiotski napici na bazi surutke predstavljaju napitke kod kojih je prisutan jedan ili više sojeva sa dokazanim probiotskim karakterom (Barth, 2001).

Probiotici

Tokom čitavog niza godina reč probiotik je tumačena na mnogo različitih načina. Ruski mikrobiolog i nobelovac Mečnikov (Metchnikoff) je prvi istakao vezu između primene fermentisanih mlečnih proizvoda i poboljšanja zdravlja ljudi 1907. godine (Metchnikoff, 2004). Prema trenutno usvojenoj definiciji FAO/WHO probiotici su živi mikroorganizmi koji konzumirani u odgovarajućem broju ostvaruju pozitivan uticaj na zdravlje domaćina. Odnosno, probiotici su mikroorganizmi netoksične i nepatogene prirode koji prolaskom kroz digestivni trakt ispoljavaju pozitivan uticaj na zdravlje domaćina.

Postoji veliki broj studija koje su pokazale blagotvorno delovanje probiotskih napitaka na nivo holesterola u krvi, zapaljensku bolest creva, alergije, gastrične infekcije *Helicobacter pylori*, smanjenje pojave vaginalnih i urinarnih infekcija primenom na sluznicu, antikancerogeno i antimutageno delovanje, posredni uticaj na motilitet creva

(Vasiljević i Shah, 2008). Mikroorganizmi prisutni u crevima proizvode vitamin K, fermentišu nedigestibilnu hranu, proizvode kratkolančane masne kiseline i neophodne su za maturaciju imuniteta. Ispitivan je i antimutageni i antikancerogeni efekat probiotika, iako nije utvrđen mehanizam dejstva, postoje posredni dokazi o pozitivnom delovanje fermentisanih proizvoda kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom (Rafter, 2002). Poslednjih godina su uočena nova delovanja probiotika, kao što je smanjenje nivoa holesterola u krvi i antihipertenzivno delovanje fermentisanih proizvoda sa probioticima. Najveći broj savremenih istraživanja blagotvornog delovanja probiotika vezan je za njihovo modulatorno delovanje na imunski sistem domaćina. Još od postavljanja higijenske hipoteze, koja ukazuje na neophodnost kontakta sa antigenima bakterija i parazita, raste interesovanje za ulogu i značaj ogromne količine mikroorganizama koje nosimo u sebi (Bengmark, 2008). Povoljno delovanje probiotika na imunitet se objašnjava razvojem tolerancije domaćina na prisustvo antigena probiotika. Probiotici se najviše ispituju za primenu u tretmanu inflamatorne bolesti creva (Kronova bolest i ulcerozni kolitis) (Shah, 2004).

Prebiotici su nesvarljivi sastojci hrane koji pozitivno utiču na domaćina selektivno stimulišući rast i/ili aktivnost jedne ili ograničenog broja bakterija prisutnih u crevima. U hrani se moraju nalaziti u odgovarajućoj koncentraciji koja će omogućiti ispoljavanje njihovog pozitivnog efekta u većoj meri od efekata uobičajenih nutritivnih sastojaka (Shah, 2004).

2.2.2. Prehrambeni proizvodi sa bioaktivnim proteinima

Moderan način života, koji uključuje puno stresa, malo slobodnog vremena i još manje vremena za pripremu obroka, uz konzumaciju brze hrane koja obiluje ugljenim hidratima i mastima, kao i raznim konzervansima i stabilizatorima zahteva značajne korekcije u načinu ishrane i kavalitetu namirnica koje konzumiramo.

Istraživanje na globalnom nivou pokazuje da je 27 najčešćih tipova kancera uzrok miliona smrti godišnje (Ferlay i sar., 2015). Takođe, povišen krvni pritisak je najznačajni faktor rizika za različita srčana oboljenja koja su po smrtnosti odmah iza kancera na globalnom nivou (Udenigwe i Mohan, 2014). Mnoge studije ukazuju na to da slobodni radikali koji potiču iz hrane imaju veliki uticaj na razvoj ovih bolesti i lošeg

stanja organizma. S druge strane, prisustvo antioksidanasa u ishrani znatno redukuje negativan učinak slobodnih radikala na organizam (Hernandez-Ledesma i sar., 2011; Wojcik i sar., 2010).

Globalno tržište funkcionalne hrane rapidno se širi poslednjih decenija, a razlog za to je povećano interesovanje potrošača za proizvode koji mogu unaprediti njihovo zdravlje i poboljšati kvalitet života. Na teritoriji Zapadne Evrope i Severne Amerike fermentisani mlečni napici poput jogurta, čine najprodavanije zdrave napitke i obuhvataju približno 43% svih funkcionalnih napitaka na tržištu (Ozer i Kirmaci, 2010). Fermentisani napici su našli svoju široku primenu prevaskodno zbog tradicije dugog konzumiranja ove vrste napitaka kod velikog procenta populacije, ali i vrlo jednostavnog i jeftinog načina dobijanja istih.

Fermentisani proizvodi na bazi mleka pored probiotske kulture koju sadže, a koja na organizam deluje povoljno preko više faktora, u svom sastavu imaju proteini i peptidi iz mleka čiji je pozitivan učinak na organizam čoveka prethodno naveden. Zanimljivo je da bioaktivni peptidi predstavljaju mnogo adekvatniji, bioraspoloživiji izvor esencijanih aminokiselina u poređenju sa nativnim proteinima, pa čak i slobodnim aminokiselinama (Beermann i Hartung, 2013). Sadržaj bioaktivnih komponenti u fermentisanom napitku zavisi prevashodno od kvaliteta i vrste korišćene sirovine, ali u velikoj meri i od tehnološkog postupka obrade same sirovine. Takođe, bioaktivne komponente mogu biti i naknadno dodate u ove proizvode pri čemu prednost imaju upravo proteini i peptidi mleka i surutke, jer je to njihovo prirodno okruženje pa se znatno smanjuje mogućnost njihovih nepovoljnih interakcija sa komponentama u sistemu i eventualnog smanjenja ili gubitka aktivnosti.

2.2.2.1. Produkcija bioaktivnih peptida tokom procesa proizvodnje napitka

Proteni sadržani u mlečnim i napicima na bazi surutke, tokom procesa obrade i pripreme proizvoda trpe različite modifikacije. Te modifikacije zavise od tehnologije obrade i uslova tokom obrade pa i čuvanja proizvoda. Hidroliza proteina je čest pratilac pri proizvodnji fermentisanih proizvoda. Često je i veoma poželjna, jer doprinosi boljoj svarljivosti, smanjenju mogućnosti alergijske reakcije (čest alergen proteina surutke je β -LG), povećanju bioaktivnosti i funkcionalnih karakteristika napitka i sl.

Istraživanjima je ustanovljeno da hidrolizati koji nastaju, dejstvom proteolitičkih enzima bakterija mliječne kiseline pokazuju antioksidativnu aktivnost i imaju sposobnost da spreče enzimsko i neenzimsko stvaranje lipidnih peroksida (Beermann i Hartung 2013). Presudan uticaj na stepen i tok hidroliza ima izbor starter kulture.

Za svoj normalan razvoj BMK zahtjevaju slobodne aminokiseline kojih nema dovoljno u mleku. Stoga one produkuju proteaze zadužene za razgradnju mlečnih proteina čiji krajnji produkti razgradnje, aminokiseline i peptidi, ostaju u fermentisanom proizvodu kao značajni nosioci bioaktivnosti. Pri izboru starter kulture mora se voditi računa o tome da ta kultura poseduje preteolitičku aktivnost dovoljnu za produkciju peptida željenih aktivnosti, ali da njena proteolitička aktivnost ne neruši konzistenciju i druge karakteristike proizvoda tokom perioda spravljanja i čuvanja. Ključan faktor je naći adekvatnu proteolitičku kulturu i uslove fermentacije za određenu sirovinu. Mnoge studije su se bavile upravo ovom problematikom.

Terzić-Vidojević i sar., (2013) utvrdili su da od svih bakterijskih vrsta koje su detektovane u kajmaku sa područja Teslić u Bosni i Hercegovini (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garviae*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus italicus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Streptococcus thermophiles* and *Streptococcus mitis*) čak 45 % laktobacila i 54 % laktokoka poseduje proteolitičku aktivnost. Vrlo dobri rezultati su dobijeni tokom primene ćelijskih kultura *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. parabuchneri*, *L. casei*, *L. panis*, *Pichia kudriavzevii* i *S. cerevisiae* za hidrolizu proteina surutke u cilju dobijanja funkcionalnog napitka (Conti i sar., 2012). Sojevi: *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CRL 454, *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 i *S. thermophiles* CRL pojedinačno i u kombinaciji pokazuju dobre proteolitičke sposobnosti i predstavljaju dobar izbor u proizvodnji funkcionalnog napitka na bazi surutke (Pescuma i sar., 2008). Najbolje rezultate dala je kombinacija kultura *Streptococcus thermophiles* CRL 804 i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CRL 454. Dobru proteolitičku aktivnost pokazala je i komercijalna jogurtna kultura ABY 6 sastavljene od 4 kulture: *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (80%), *Lactobacillus acidophilus* (13%), *Bifidobacterium bifidum* (6%),

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus (1%) kao i kombinacija ABY 6 i *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 pri fermentaciji sirovine koja sadrži 70% surutke i 30% mleka (Krunić i sar., 2017b). Dobru proteolitičku aktivnost pokazuje i bakterijska kultura *Streptococcus thermophilus* u uslovima proizvodnje fermentisanog proizvoda i dobio vrlo dobre rezultate bioaktivnosti nastalih peptida u vidu antioksidativne aktivnosti i ACE inhibitorne aktivnosti (Miclo i sar., 2012). Agyei i sar. (2012) su dobili veoma dobre rezultate pri određivanju optimalnih uslova fermentacije mleka sojem *L. delbrueckii subsp. lactis* koji proizvodi značajne količine proteaze ćelijskog zida (engl. *Cell Envelope Proteinase-CEP*) sposobne da hidrolizuju proteine do peptida koji sadrže 4 do 30 aminokiselina. Elfahry (2012) je ispitivao 10 bakterijskih kultura: *Lactobacillus helveticus* 474, *Lactobacillus helveticus* 1188, *Lactobacillus helveticus* 1315, *Lactobacillus helveticus* 953, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 734, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 756, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* 857, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* 1210, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* 1307, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* 1372 sa ciljem utvrđivanja ćelijske vrste sa najizraženijom proteolitičkom aktivnošću pri fermentaciji mleka, uz oslobađanje bioaktivnih peptida koji poseduju ACE inhibitornu aktivnost. Tri ćelijske kulture: *Lactobacillus helveticus* 474, *Lactobacillus helveticus* 1188, *Lactobacillus helveticus* 1315 su pokazale izuzetno dobru proteolitičku aktivnost pri čemu su u uzorku detektovane značajne količine peptida tražene bioaktivnosti. Utvrđeno je prisustvo ACE inhibitornih peptida u uzorcima dobijenim tokom fermentacije mleka pomoću *Lactococcus lactis* (Rodriguez-Figuerou i sar., 2010).

2.2.2.2. Dodatak bioaktivnih peptida surutke u proizvode sa ciljem poboljšanja karakteristika proizvoda

Pozitivan učinak proteina surutke i peptida dobijenih hidrolizom opisan je u Odeljku 2.1. U novije vreme mnoga istraživanja su usmerena upravo na mogućnost korišćenja ovih aktivnih molekula u ishrani. Proteini surutke su u drugoj polovini prošlog veka našli veliku primenu u ishrani bodibildera i drugih profesionalnih sportista, koja je zasnovana na sposobnosti proteina i peptida surutke da se nakon digestije preko tankog creva, krvi i limfe prenesu direkto do mišića u čijoj izgradnji učestvuju. Za ovu sposobnost proteina surutke zaslužan je aminokiselinski niz BCAA koji se ne

razgrađuje u jetri već se kao takav ugrađuje u mišićne proteini. Na ovaj način mišići znatno brže dobijaju na masi pri učestalom vežbanju, nego što je to slučaj pri ishrani bilo kojim drugim izvorom proteinima. Ovaj način korišćenja proteina surutke u vidu osušenih koncentrovanih često i hidrolizovanih proteina koji su namenjeni sportistima je i danas najpopularniji i najrasprostranjeniji. Sledeći najispitivaniji vid korišćenja proteina surutke bio je uticaj na sitost (Shi i sar., 2012a; Shi i sar., 2012b), ali i ovaj način korišćenja proteina surutke je još u povoju.

Proteini surutke mogu se koristiti kao dodatak kasava brašnu. To brašno je korišćeno za proizvodnju dve vrste peciva: mafina i biskvita. Rezultati ukazuju da su proteini surutke idealna zamena za proteine jaja i da se mogu koristiti za proizvodnju mafina i biskvita koji ne sadrže jaja. Takođe, dodatkom proteina surutke značajno se obogaćuje proteinski sastav proizvoda dobijenih od brašna kasave (Jisha i Padmaja, 2011). Dodatak proteina surutke u pekarske proizvode od pšenice kao i u proizvode od pšenice i riže značajno poboljšava njihov nutritivni sadržaj, a ne utiče negativno na druga svojstva proizvoda (Wrokowska i sar., 2015).

Proteini surutke zbog svojih tehnoloških svojstava, prevashodno visokog stepena zadržavanja vode i ulja, dobrog emulgujućeg svojstva i reoloških karakteristika predstavljaju dobru osnovnu komponentu za formulaciju različitih dresinga. Ovakvi dresinzi su dobro prihvaćeni i od strane konzumenata (Palatnik i sar., 2015). Dodatak hidrolizata proteina surutke nešto je komplikovaniji u odnosu na dodatak nehidrolizovanih proteina usled velike razlike u tehnološkim i drugim fizičko-hemijskim svojstvima hidrolizata. Koliko će se tehnološka svojstva hidrolizata i nehidrolizovanog uzorka međusobno razlikovati zavisi najviše od vrste primenjenog enzima, uslova i stepena hidrolize. Zbog gorkog ukusa koji poseduje veliki broj bioaktivnih peptida dobijenih iz surutke, njihova primena bez bitnih promena u ukusu proizvoda moguća je uglavnom kada su u pitanju proizvodi koji kao osnovni ukus nose ukus jogurta, čokolade i kafe. Ova tri ukusa umnogome maskiraju gorčinu bioaktivnih peptida, bez narušavanja njihove strukture i aktivnosti. Mnoga istraživanja pokazuju dobre rezultate i sa ukusom jagode (Castro i sar., 2013; Mann i sar., 2015), ali i sa funkcionalnim napicima na bazi surutke sa izraženom antioksidativnom aktivnošću sa ukusom limuna (Athira i sar., 2015). Česti proizvodi u koje je moguće bez većih poteškoća inkorporisati

proteine i peptide surutke su različite vrste sladoleda. Najčešći doprinos ovim proizvodima je u vidu antioksidanasa (Kumari i sar., 2013; Mann i sar., 2015), ali je moguće i podstaknuti rast probiotskih kultura (Akalin i sar., 2007; Christopher i sar., 2009; McComas i Gilliland, 2003). Jogurt obogaćen različitim hidrolizatima surutke poseduje ACE inhibitornu aktivnost, dok tehnološka i organoleptička svojstva jogurta nisu bitno promenjena. Parametri ovakvog jogurta su u uobičajnom opsegu: pH je u opsegu 3,47 – 3,77, a titracijska kiselost 0,81 – 0,84 %. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost dobijanja funkcionalnog napitka koji poseduje antihipertenzivni efekat, bez narušavanja organoleptičkih svojstava proizvoda na koji su kupci navikli (Lim i sar., 2011). Značajan doprinos kvalitetu proizvoda postignut je i pri dodatku hidrolizata proteina surutke u indijski zaslađeni jogurt. ACE inhibitorna aktivnost je najizraženija pri dodatku 3 % (m/v) peptida u odnosu na mleko (Chaterjee i sar., 2016). Dodatkom proteina u jogurt moguće je ne samo unaprediti nutritivne karakteristike proizvoda nego i poboljšati i dostići željenu teksturu proizvoda (Matumoto-Pintro i sar., 2010).

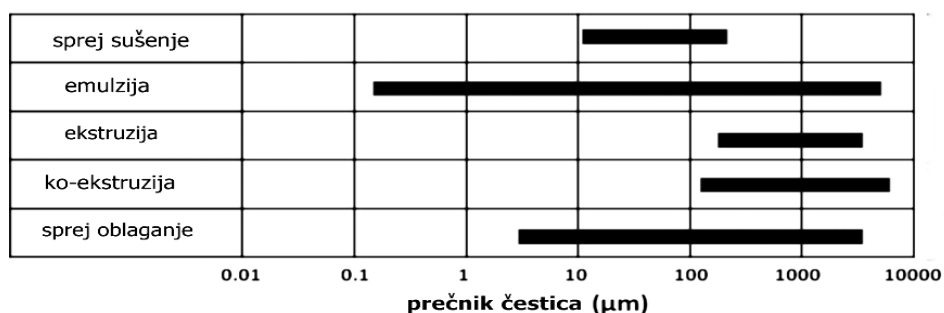
2.2.2.3. Proteini surutke kao nosači u prehrambenim proizvodima

2.2.2.3.1. Imobilizacija

Imobilizacija ćelija predstavlja njihovo vezivanje za neki nosač ili zatvaranje u određenom ograničenom prostoru u cilju njihove zaštite, dužeg ili ponovnog korišćenja, kontinualnog otpuštanja i sl. Imobilizacija je našla široku primenu na mnogim poljima u farmaciji, medicini i industriji hrane. Sama klasifikacija postupaka imobilizacije je dosta složena i u ovom radu neće biti detaljno analizirana.

Inkapsulacija je vid imobilizacije koji predstavlja mehanički proces obuhvatanja ćelija u određeni matriks radi dobijanja čestica prečnika od nekoliko nanometara, do nekoliko milimetara (Chen i Chen, 2007). Inkapsulacija je načešća metoda imobilizacije koja se primenjuje u slučaju probiotskih kultura i koristi se u najvećem broju slučajeva radi zaštite žive ćelijske kulture od nepovoljnih spoljašnjih uticaja (Champagne i Kailasapathy, 2008; Krunić i sar., 2014; Krunić i sar., 2016; Krunić i sar., 2017a; Zuidam i Shimoni, 2009).

Najčešći vid inkapsulacije je inkapsulacija u porozni matriks poput alginata. Kod probiotskih bakterija pri odabiru metode inkapsulacije potrebno je voditi računa o broju živih ćelija koje preostanu nakon postupka inkapsulacije. Metoda inkapsulacije je potrebno da bude takva da što veći broj ćelija preživi inkapsulaciju. S tim u vezi najčešće korišćene metode su date na slici 4.



Slika 4. Najčešće korišćene metode inkapsulacije probiotika i veličine čestica koje je moguće postići tom metodom (Burgain i sar., 2011)

Metode sprej sušenje, emulzija i ekstruzija podrazumevaju jednostavniji vid inkapsulacije dok metode ko-ekstruzija i sprej oblaganje predstavljaju inkapsulaciju kojom se dobija obložena čestica. Za oblaganje može se koristiti isti matriks koji je korišćen kao nosač ili neki drugi materijal.

Ideja inkapsulacije probiotika nastala je prevashodno kao želja da se poveća broj živih ćelija u mlečnim proizvodima kao što su jogurt, sladoled, različite mlečne poslastice ili fermentisani proizvodi u kojima su studije pokazale malu vijabilnost probiotika. Mala vijabilnost je posledica nepovoljnih uslova sredine kao što su niska pH, prisustvo mlečne kiseline, vodonik peroksida, visok procenat kiseonika i sl. (De Vos i sar., 2010). Kod probiotskih namirnica pored broja živih ćelija u proizvodu u momentu konzumacije veoma bitan faktor predstavlja broj živih ćelija koje prođu kroz nepovoljnu sredinu koja vlada u želucu i dospeju u intestinalni trakt gde ispoljavaju svoj pozitivan uticaj na zdravlje čoveka. Inkapsulacija se pokazala kao dobro rešenje za oba navedena problema. Porozan matriks obezbeđuje dobru zaštitu i bolju vijabilnost kako u samom proizvodu tokom pripreme i čuvanja, tako i u gastrointestinalnim uslovima (Krasaekoopt i sar., 2003; Krunic i sar., 2014; Krunic i sar., 2016; Krunic i sar., 2017a; Picot i Lacroix, 2004).

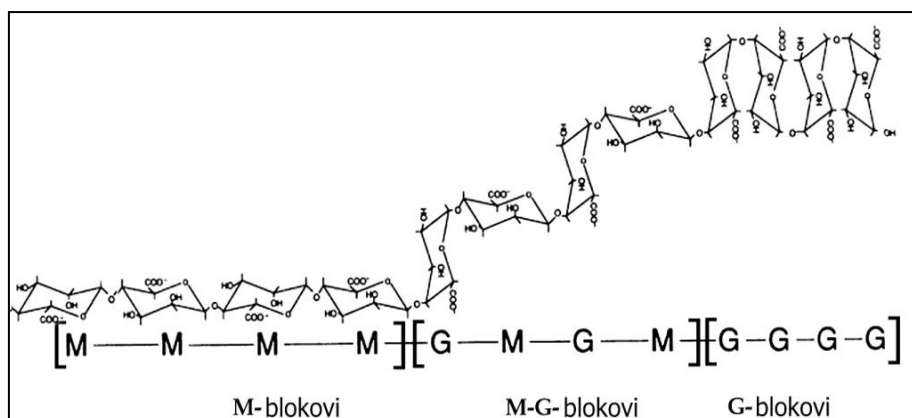
2.2.2.3.2. Najčešće korišćeni nosači za inkapsulaciju probiotskih kultura

Karakteristike imobilisanog sistema u velikoj meri zavise od nosača koji se koristi za imobilizaciju. Odabir pogodnog nosača zavisi od njegovih fizičko-hemijskih karakteristika, a posebno toksičnosti i stabilnosti, uslova pod kojima se izvodi imobilizacija, osetljivosti ćelija i njihove mogućnosti da se stabilno vežu za nosač.

Nosači koji se koriste u prehrambenoj industriji potrebno je da zadovoljavaju kriterijum biokompatibilnosti i netoksičnosti. Takođe, potrebno je da čestice dobijene pomoću tih nosača zadovolje složene parametre i zahteve koji su prethodno navedeni, pa je broj nosača u slučaju probiotskih kultura znatno redukovan. Najčešće korišćeni nosači su: alginat, želatin, hitozan, različite vrste guma, a u novije vreme sve se više ispituje mogućnost korišćenja proteina mleka i surutke.

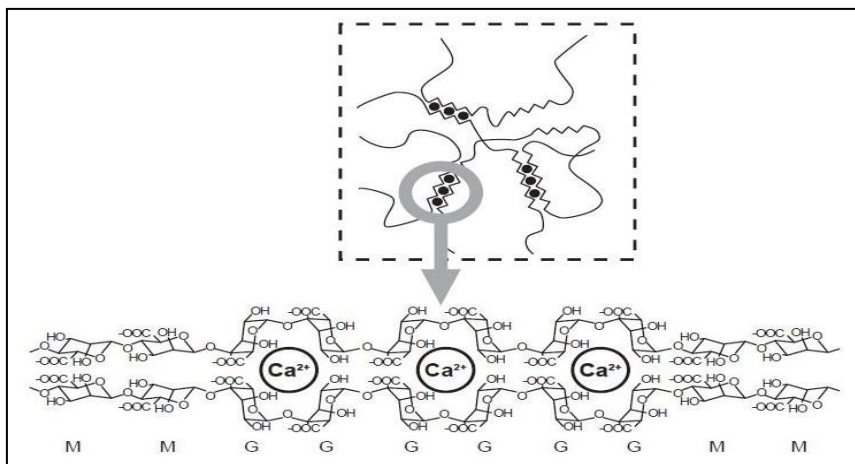
2.2.2.3.2.1. Alginat

Alginat je prirodni polisaharid dobijen iz različitih vrsta algi i sadrži β -D-manuronsku (M) i α -L-guluronsku (G) kiselinu povezane u linearan molekul 1,4-glikozidnim vezama. Sam sastav alginata i njegova funkcionalna svojstva zavise od izvora iz kog je ekstrahovan. Može da sadrži GMGM, GGGG i MMMM blokove. Geometrije oblasti u kojima su G-blokovi i onih u kojima su M-blokovi, bitno se razlikuju usled specifičnog oblika monomera i njihovog načina vezivanja u polimer. Tako su G-blokovi uvrnuti, a M-blokovi imaju oblik istegnute trake (slika 5).



Slika 5. Izgled M, MG i G blokova kod molekula alginata

Alginatni hidrogelovi predstavljaju najzastupljeniji matriks korišćen za inkapsulaciju živih ćelija pa i probiotske kulture pre svega zbog dostupnosti i relativno niske cene, netoksičnosti, biokompatibilnosti i relativno jednostavnih metoda za inkapsulaciju usled vrlo blagih uslova pod kojima alginat gelira (Krapskoopt i sar., 2003). U prehrambenoj industriji ali i u nekim medicinskim aplikacijama, alginat je našao značajnu ulogu, prevashodno jer pripada grupi takozvanih GRAS (*engl. Generally Regarded As Safe*) komponenti. Ono što alginat izdvaja iz mnoštva prirodnih polimera je mogućnost njegovog geliranja pod vrlo blagim uslovima uz upotrebu netoksičnih reaktanata. Naime, alginati pokazuju veliki afinitet prema katjonima, a kalcijumovi joni (Ca^{2+}) se najčešće primenjuju u tu svrhu. Čestice alginata sa živim ćelijama mogu lako da se formiraju kada se rastvor natrijum-alginata i ćelija dovede u kontakt sa rastvorom dvovalentnog sredstava za umrežavanje (npr. CaCl_2). Do umrežavanja dolazi usled razmene jona natrijuma i kalcijuma čime se obrazuje specifična struktura između glukuronskih grupa tzv. kutija za jaja (*engl. egg-box*). Po ovom modelu se dva ili više poliuronatnih lanaca međusobno vezuju stvarajući šupljine za smeštanje dvovalentnih katjona poput onih u kutiji za jaja, što je prikazano na slici 6 (Wang i sar., 2010). Medjutim, pored nabrojanih dobrih strana korišćenja alginata kao nosača, potrebno je imati na umu i negativne strane ovog matriksa. Alginat je osetljiv na prisustvo kiselina i niske pH (Mortazavian i sar., 2008), što ga čini ne tako atraktivnim nosačem kada se ima za cilj povećanje broja živih ćelija nakon prolaska kroz želudac i dvanaestopalačno crevo. Pored toga, alginat je osetljiv i na prisustvo različitih helatnih agenasa kao što su laktati i fosfati, ali i različitih katjona kao što su Mg^{2+} i Na^+ . Alginatne čestice su dosta porozne i imaju malu mehaničku čvrstoću, što ih čini ne bas dobrom zaštitom od spoljnih uticaja (Gouin, 2004).



Slika 6. Formiranje „kutije za jaja“ između molekula alhinata i jona Ca²⁺ (Azeredo i Waldron, 2016)

2.2.2.3.2.2. Hitozan

Hitozan je linearan polisaharid izgrađen od glukozamina koji je našao široku primenu u inkapsilaciji različitih materija, ali ne i živih ćelija. Razlog zašto nije našao širu primenu kod inkapsulacije živih ćelija je njegovo blago inhibitorno dejstvo na rast probiotičkih bakterija (Groboillot i sar., 1993). Kako nepovoljno deluje na broj živih ćelija korišćenje ovog polimera kao matriksa narušava osnovni zahtev kod inkapsulacije probiotičkih kultura, a to je što veća vijabilnost. Zbog svojih dobrih mehaničkih karakteristika nije u potpunosti odbačen kada su u pitanju žive ćelije. Odlični rezultati postižu su kada se hitozan koristi kao materijal za oblaganje čestica (Obradović i sar., 2015b; Krunic i sar., 2016; Mortazavian i sar., 2008). Najčešća primena hitozana je upravo oblaganje alginatnih čestica radi povećanja vijabilnosti probiotičke kulture u gastrointestinalnim uslovima (Krunic i sar., 2016; Chavarri i sar., 2010).

2.2.2.3.2.3. Proteini surutke

Proteini surutke kao i proteini mleka predstavljaju vrlo povoljno okruženje za probiotičke bakterije. Ovi proteini pokazuju dobre osobine geliranja pri blagim uslovima i njihova upotreba kao nosača za probiotičke kulture je u povoju. Mogućnost proteina surutke da formiraju gel bez potrebe za višestepenom termičkom obradom i upotreba bilo kakvih hemikalija za pospešivanje geliranja čini ih vrlo privlačnim za upotrebu u prehrambenoj industriji. Ovo takozvano „hladno geliranje“ zahteva jedan tretman

zagrevanja proteina surutke gde se dešava njihova denaturacija i polimerizacija u rastvorne agregate (Chen i Subirade, 2007). Proteini surutke se ponašaju vrlo slično alginatu i ukapavanjem u rastvor za geliranje kao što je CaCl_2 formira se struktura „kutija za jaja“ kao i u slučaju alginata. Proteini surutke se retko koriste sami. Najčešće se koriste u kombinaciji sa alginatom. Proteini surute su dali vrlo dobre rezultate kada su pomešani u različitim odnosima sa alginatom (Herbrard i sar., 2010; Obradović i sar., 2015a; Krunić i sar., 2016; Krunić i sar., 2017a), ili kada su njima oblagana alginatne čestice (Herbrard i sar., 2010). Proteini surutke kao nosači koriste se i u drugim metodama pored ekstruzije kao što je tehnična emulzija ili sprej sušenja (Picot i Lacroix, 2004), koacervacije (Ribeiro i sar., 2014).

2.2.2.3.3. Ekstruzija

Na slici 4 date su najčešće korišćene metode inkapsulacije probiotika. U radu je korišćena metoda ekstruzije koja je pomoću pumpe i električnog napona proizvodi čestice različitih dimenzija. Ekstruzija je tehnika inkapsulacije živih ćelija koja kao matriks koristi hidrogelove poput alginata. Postupak inkapsulacije podrazumeva ukapavanje smeše matriksa i ćelija u rastvor za umrežavanje.

Elektrostatička ekstruzija

Elektrostatička ekstruzija, kao metoda za inkapsulaciju široko je primenjivana u različitim oblastima biotehnologije. Ova metoda se od klasične ekstruzione metode, (metode ukapavanja) razlikuje po primeni električnog polja u cilju dobijanja čestica malih prečnika. Na smešu živih ćelija i polimera koji se ravnomerno potiskuju kroz iglu deluje i električno polje i tako zajedno sa gravitacionom silom uzrokuje brže otkidanje kapi sa površine igle. Kap se otkida kada električna i gravitaciona sila nadvladaju silu površinskog napona i tada kap pada u rastvor za geliranje gde se odvija očvršćavanje i prevođenje kapi u česticu. Osnovna prednost ove metode nad klasičnom ekstruzijom je kontrola veličine čestica i dobijanje čestica željenog prečnika. Ovom metodom je moguće dobiti čestice mikrometarskih veličina. Kod elektrostatičke ekstruzije veličina čestica zavisi od više faktora: fizičkih karakteristika rastvora polimera nezavisno od vrste ekstruzije, protoka kojim se rastvor potiskuje, prečnika igle, rastojanja između igle i rastvora i primenjenog napona. Viskozitet rastvora polimera koji se koristi kao nosač

predstavlja jedan od najvažnijih reoloških parametara koji utiču na formiranje čestica pri elektrostatičkoj ekstruziji, na njihovu veličinu i sferičnost (Nedović i sar., 2006).

2.2.2.3.4. Primena imobilisanih jedinjenja u prehrambenim proizvodima

Proteini surutke su široko ispitivani radi korišćenja za imobilizaciju probiotskih kultura. Kao što je prethodno naznačeno, fermentisani probiotski napici čine većinu funkcionalnih proizvoda zastupljenih na tržištu, čak 60 – 70% (Tripathy i Giri, 2014). Zastupljenost probiotskih napitaka u ovolikoj meri ne čudi ako imamo u vidu široko blagotvorno dejstvo probiotika na organizam čoveka: regulišu rast normalne crevne mikroflore, štite gastrointestinalno područje od patogena, utiču na metabolizam laktoze, utiču na smanjenje učestalosti urinarnih i respiratornih obolenja, utiču na smanjenje pojave nekih kancera, kao i smanjenje krvnog pritiska i holesterola u krvi (Khani i sar., 2012). Probiotici su korišćeni u fermentisanim napicima hiljadama godina, a danas se sve više ispituje mogućnost njihove aplikacije i u druge proizvode, najčešće mlečne prerađevine poput: čokolade, sladoleda, mlečnih punjenja, ali i različitih peciva, voćnih fermentisanih proizvoda i sl. Osnovni zahtev kod svih probiotskih proizvoda jeste da sadrže žive probiotske ćelije u broju većem od 10^7 CFU/g (Oliveira i sar., 2012). Nažalost, mnoge studije pokazuju mali procenat preživljavanja probiotskih kultura tokom procesa obrade i čuvanja proizvoda. Inkapsulacija predstavlja veoma dobro rešenje ovog problema. Naime, imobilizacijom je moguće zaštititi osetljivu probiotsku kulturu tokom procesa proizvodnje, čuvanja, ali i nepovoljnih uslova u želucu i dvanaestopalačnom crevu (Krunić i sar., 2016; Krunić i sar., 2017a).

Moguća je upotreba probiotika u vidu filma pri proizvodnji hleba. U ovom slučaju nije upotrebljena klasična imobilizacija probiotika, već je primenjen film koji sadrži alginat i proteina surutke u kome se nalaze i probiotske bakterije *L. rhamnosus GG* (Soukolis i sar., 2014). Inkapsulacija *L. rhamnosus LGG* pomoću proteina surutke daje dobre rezultate i u nekim voćnim sokovima. Tako je broj probiotske kulture nakon čuvanja na 4 °C i 25 °C u jabukovom soku, bio bolji sa povećanjem procenta proteina surutke u smeši korišćenoj za imobilizaciju (Ying i sar., 2013). Dok je u studiji sa brusnicom ista kultura pokazala veoma dobre rezultate pri uslovima jako niske pH i visokog procenta fenolne kiseline. Kultura imobilisana jednostavnom metodom ekstruzije u matriks sa

različitim procentom proteina surutke pokazala je dobru viabilnost u uslovima koji vladaju u želucu (Doherty i sar., 2012). Dobru zaštitu probiotske kulture u uslovima koji vladaju u želucu pokazuje i nosač koji predstavlja kombinaciju pektina i proteina surutke. Ovaj nosač daje dobru zaštitu probioticima u jogurtu, a da pri tome ne utiče negativno na fizičko-hemijske parametre jogurta (Ribeiro i sar., 2014). Probiotsku kulturu *L. plantarum* imobilisanu u nosač sa različitim sadržajem proteina surutke moguće je koristiti pri proizvodnji jogurta, različitih kremova, probiotskih napitaka pa i suvih keksova poput „Petit Suisse“ (Hernandez-Rodriguez i sar., 2014). Proteini surutke kao nosači obezbeđuju dobru zaštitu pri nepovoljnim uslovima želuca i probiotskoj kulturi *L. paracasei* (Ilha i sar., 2014).

Proteini surutke mogu se koristiti kao nosači ne samo za probiotske bakterije, već i u slučaju nekih bioaktivnih jedinjenja kao što su vitamini i njihove zaštite tokom proizvodnje i čuvanja, kao i kontrolisanog otpuštanja u intestinalnom traktu (Assadpour i sar., 2016; Chapeau i sar., 2016; Perez-Masia i sar., 2015).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Komercijalna ABY 6 kultura:

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus 80,0 % m/m

Lactobacillus acidophilus 13,0 % m/m

Bifidobacterium bifidum 6,0 % m/m

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus 1,0 % m/m

3.1.2. Enzimi

Angiotenzin Konvertujući Enzim (ACE) iz zečijih pluća (EC 3.4.15.1), Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA

Tripsin iz svinjskog pankreasa (EC 3.4.21.4), Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA

Termolizin iz *Geobacillus stearothermophilus* (EC 3.4.24.27), Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA

Proteinaza K iz *Tritirachium album* (EC 3.4.21.64), Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA

3.1.3. Materijali

Bakteriološki Agar, Torlak, Beograd, Srbija

Celulozne membrane, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany

De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) bujon, Torlak, Beograd, Srbija

Ekstrakt kvasca, Torlak, Beograd, Srbija

Goveđa žuč, Torlak, Beograd, Srbija

Hitozan (niske molekulske mase) Acros Organics, USA

Koncentrat proteina surutke 80% m/m, DMV International, Nederland

Masni krem, Štark, Beograd, Srbija

Mlečna čokolada „Najlepše želje“, Štark, Beograd, Srbija

M17 bujon, Torlak, Srbija

MRS bujon, Torlak, Srbija

Natrijum-alginat (srednje viskozan) iz braon algi, Sigma Aldrich, USA

Polisorbat 80, Tween 80, DIFCO, BD, SAD

Surutka u prahu, LENIC Laboratories, Beograd, Srbija

Surutka prirodna, Imlek, Beograd, Srbija

3.1.4. Supstance p.a čistoće

3,5-dinitrosalicilna kiselina ($C_7H_4N_2O_7$), Acros Organics, New Jersey, SAD

2,2'-Azino-bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)- diamonium so

($C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2$), (ABTS), Alfa Aesar, Massachusetts, U.S.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), (DPPH), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Aceton ($(CH_3)_2CO$), Lachema, Češka republika

Akrlamid (C_3H_5NO), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Amonijum-citrat ($(NH_4)_3C_6H_5O_7$), Hemos, Beograd, Srbija

β -Merkaptoetanol (C_2H_6SO), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Bakar-sulfat ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Borna kiselina (H_3BO_3), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Natrijum-tetraborat ($Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Bromfenol plavo ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Cink sulfat ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), Lach Ner, Neratovice, Republika Češka

Dinatrijumhidrogen fosfat ($Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$), Centrohema, Beograd, Srbija

Etanol (C_2H_5OH), Reahem, Novi Sad, Srbija

Fenolftalein, ($C_{20}H_{14}O$), Merck-Alkaloid, Skopje, Makedonija

Glicerol ($C_3H_5(OH)_3$), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Glicin (NH_2CH_2COOH), Biochemica, Sigma-Aldrich Chemi GmbH, China

Gvožđe-trihlorid ($FeCl_3$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

Hlorovodonična kiselina (HCl), Zorka Pharma a.d., Šabac, Srbija

Kalijum-heksacijanoferat (II) ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$), Merck, Darmstadt, Nemacka

Kalijum-dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijum-hidrogenfosfat (K_2HPO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijum-sulfat (K_2SO_4), Kemika, Zagreb, Hrvatska

Kalijum-natrijum tartarat ($KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$), Centrohema, Beograd, Srbija

Magnezijum-sulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
Magnezijum-hlorid (MgCl_2), Acros Organics, New Jersey, SAD
Maltoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), Torlak, Beograd, Srbija
Mangan-sulfat (MnSO_4), Hemos, Beograd, Srbija
Metilplavo ($\text{C}_{37}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_9\text{S}_3$), Hemos, Beograd, Srbija
Metanol (CH_4O), Merck-Alkaloid, Skoplje, Makedonija
N,N'-Metilen-bis-akrilamid ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$), (Bis-Akrlamid), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Natrijum-acetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), EuroHemija, Beograd, Srbija
Natrijum-hidrogen-karbonat (NaHCO_3) Centrohemi, Beograd, Srbija
Natrijum-hlorid (NaCl), Centrohemi, Beograd, Srbija
Natrijumdodecil-sulfat ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), Centrohemi, Beograd, Srbija
Natrijum-hidroksid (NaOH), Centrohemi, Beograd, Srbija
Natrijum-sulfat (Na_2SO_4), Zorka, Šabac, Srbija
Natrijum-sulfit (Na_2SO_3), Zorka, Šabac, Srbija
Ninhidrin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), Alfa Aesar GmbH&CoKG, Karlsruhe, Nemacka
Ortoftalaldehid ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$), (OPA), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Sumporna kiselina (H_2SO_4), 96%, Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka
Sirćetna kiselina (CH_3COOH), glacijalna, Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka
Tetrametiletilendiamin ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$), (Temed), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Triamonijum-citrat ($\text{C}_6\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_7$), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK
Trihlor sirćetna kiselina ($\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$), (TCA), Sigma-Aldrich, Gilligham, UK

3.1.5. Uređaji

Analitička vaga (Mettler AJ100, Švajcarska)
Amicon (Model 8050 1 Unit, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)
Autoklav (Sutjeska, Beograd)
Boca sa Azotom (Messer Tehnogas AD, Beograd)
Centrifuga (Sigma model 2-16, Shropshire, Engleska)
Električni rešo Bauer GH-525 (JTD Ltd., Severna Koreja)
Infracrveni spektrometar (Bomem MB 100),
Infuzionna pumpa (Razel Scientific Instruments, Stamford, SAD).

Jedinica za visok napon (Model 30R; Bertan Associates, Inc., New York, SAD)
Laboratorijska sušnica (Sutjeska (60-200°C), Fabrika medicinskih uređaja, Beograd)
Magnetna mešalica (ARE Heating Magnetic Stirrer, Velp Scientifica srl, Italija)
Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK.
Mikroskop (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka)
pH-metar (inoLab pH 720, Nemačka)
Tehnička vaga (Chyo Balance Corp., MP-3000)
Teksturometar TE.XT Plus (Texture Technologies 15 Corp., UK)
Termostat za rast mikroorganizama (Mettler, Nemačka)
Uređaj za vertikalnu elektroforezu (LKB SE 600 Ruby, Power Supply EPS601, Amersham Bioscience)
UV-VIS spektrofotometar (Ultrospec 3300 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)
Viskozimetar RheoStress 600, Haake (Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka)
Vodeno kupatilo sa mešanjem, model WB/OB 7-45 (Mettler, Nemačka)
Vorteks (REAX 7000, Heidolph, Schwabach, Nemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Hidroliza proteina surutke

Koncentrat proteina surutke (WPC 80) rastvoren u destilovanoj vodi (5% m/v) ostavljen je da odstoji 1 sat na sobnoj temperaturi uz umereno mešanje. Rastvor je hidrolizovan pomoću tri različita enzima u trajanju od 1h.

1. Proteaza K (1 % m/m u odnosu na sadržaj proteina, pH 8,0 temperatura 37 °C)
2. Termolizin (1 % m/m u odnosu na sadržaj proteina, pH 8,0 temperatura 37 °C)
3. Tripsin (5 % m/m u odnosu na sadržaj proteina, pH 8,0 temperatura 37 °C)

Nakon završetka hidrolize enzim je inaktiviran zagrevanjem hidrolizata u vodenom kupatilu na 90 °C u trajanju od 10 minuta.

3.2.2. Određivanje stepena hidrolize DH (*engl. Degree of Hydrolysis*)

Stepen hidrolize određivan je pH stat metodom (Alder–Nissen, 1986) i računat je po formuli

$$DH(\%) = 100 \times B \times Nb \times (1/\alpha) \times (1/mp) \times (1/h_{tot})$$

Vrednosti h_{tot} i α izračunate su za proteine surutke pod datim uslovima i predstavljaju: ukupnu količinu peptidnih veza po jedinici količine i stepen hidrolize α – amino grupe (Alder–Nissen, 1986). Nb – molalitet korišćenog NaOH, B – količinu utrošenog NaOH izraženo u mL, mp – količina proteina u rastvoru izražena u g.

3.2.3. Određivanje prosečne dužine peptidnog lanca hidrolizata APCL (*engl. Average Peptide Chain Length*)

Prosečna dužina peptidnog lanca hidrolizata, određuje se pomoću izračunatog stepena hidrolize uz pretpostavku da je hidrolizat u potpunosti rastvorljiv (Alder–Nissen, 1986).

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

3.2.4. Određivanje ukupnih proteina metodom po Lowry-u

Sadržaj ukupnih proteina određen je metodom po Lowry-u koja se zasniva na građenju obojenih proizvoda aromatičnih amino kiselina sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom u kombinaciji sa biuretskom reakcijom za peptidne veze (Lowry i sar. 1951). Koncentracija nastalih obojenih proizvoda se određuje spektrofotometrijski. Sa reagensom Folin Ciocalteu-a pretežno reaguju amino kiseline koje sadrže grupu fenolnog karaktera kao što su tirozin i triptofan. Velika osetljivost metode omogućava da se odredi 10^{-5} do 10^{-4} g proteina u probi. Na razvijanje boje može uticati veliki broj supstanci zbog čega je potrebno imati u vidu da pri određivanju standardne krive korišćeni rastvarač treba da sadrži iste komponente kao i uzorci koji se analiziraju. Prilikom određivanja proteina, kao standardni protein korišćen je goveđi serum albumin.

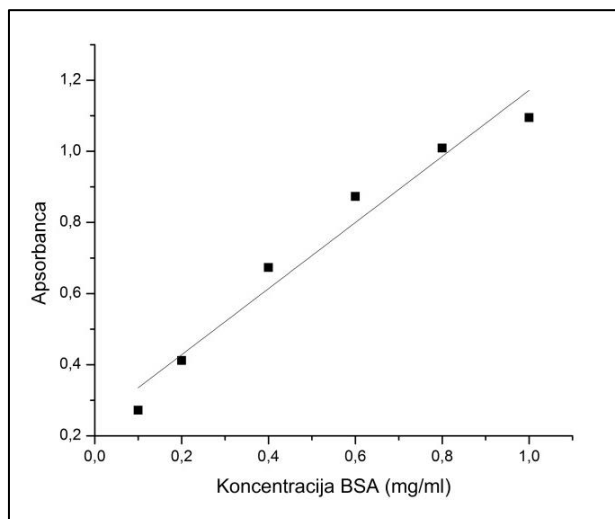
Postupak:

1. Priprema reagensa

- Reagens A: 2% rastvor Na₂CO₃ u 0,1M NaOH,
- Reagens B: 1% rastvor CuSO₄ x H₂O u destilovanoj vodi,
- Reagens C: 2% K, Na tartarat u destilovanoj vodi,
- Reagens D: Pripremljen je mešanjem 1ml reagensa B i 1mL reagensa C, a zatim se pomešani rastvori dopune reagensom A do 100mL neposredno pre upotrebe,
- Reagens F: Komercijalni Folin-Ciocalteu reagens.

2. Određivanje standardne prave za određivanje sadržaja proteina.

Standardna prava se određivala pre svake serije eksperimentalnih merenja. Standardni rastvori u opsegu od 0,1 do 0,5 mg /mL su dobijeni razblaživanjem osnovnog vodenog rastvora goveđeg serum albumina koncentracije 1 mg /mL. U epruvete su dodavane određene zapremine osnovnog rastvora (0,1 – 0,5 mL) i razblaživane destilovanom vodom tako da je ukupna zapremina 1 mL. U rastvore je zatim dodavano 2 mL reagensa D i nakon mešanja rastvori su ostavljeni da stoje 10 min na sobnoj temperaturi. Posle toga, dodavano je 0,2 mL reagensa F i sadržaj epruvete je dobro promešan. Nakon 45 minuta u uzorcima je razvijena boja. Apsorbanca uzoraka određivana je spektrofotometrijski na 500 nm. Standardna prava dobijena je merenjem apsorbanci standardnih rastvora



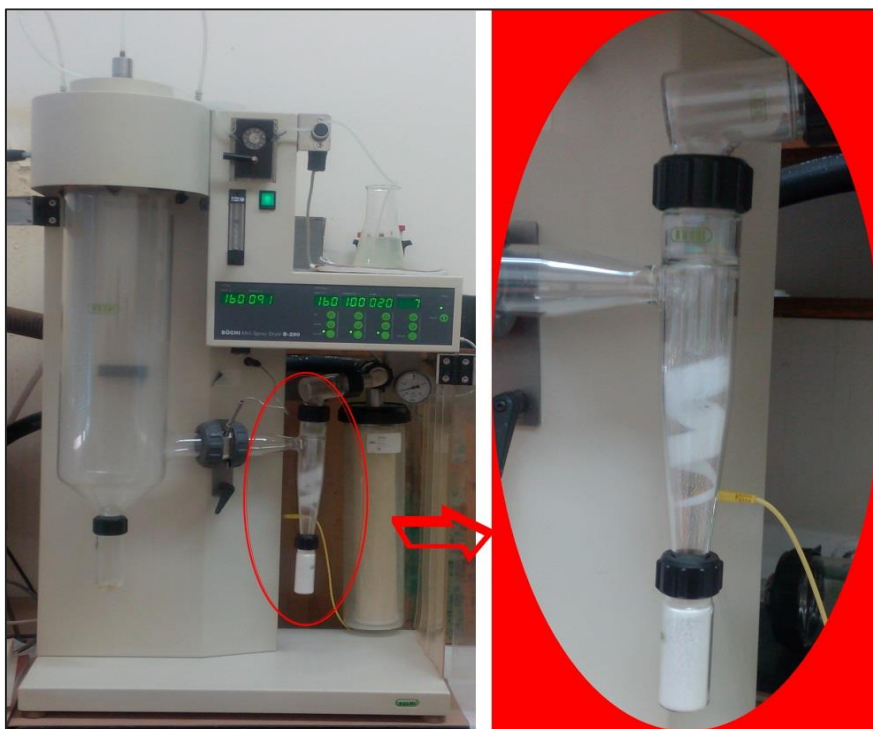
Slika 7. Standardna prava za određivanje proteina

Koncentracija peptida, c (mg/ml) određena je jednacinom prave:

$$c = 1.0765 \times A - 0.2601$$

3.2.5. Sušenje i čuvanje uzoraka

Svi uzorci nakon hidrolize ukoliko nisu odmah korišćeni osušeni su postupkom sprej sušenja (sušenje raspršivanjem) pri ulaznoj temperaturi od 160 °C i nakon toga zaštićeni od dejstva vlage i čuvani na temperaturi od -18 °C.



Slika 8. Sušenje hidrolizata pomoću sprej sušnice

3.2.6. Tehnološka svojstva hidrolizata

3.2.6.1. Rastvorljivost, WSI (*engl. Water solubility index*)

Rastvorljivost peptida u vodi određivana je tako što je vodeni rastvor WPC-a koncentracije 10 % (m/v) ostavljen da odstoji 24 h u frižideru. pH rastvora proteina je zatim podešavana na vrednosti 2,0 , 4,0 , 6,0 , 8,0 i 10,0 pomoću 1M NaOH i 1 M HCl. Rastvor je centrifugiran na 10.000 x g u trajanju od 15 minuta i određivan je sadržaj proteina u supernatantu i ukupan sadržaj proteina.

Rastvorljivost (WSI) se izračunava pomoću formule:

$$WSI = \frac{\text{sadržaj proteina u supernatantu (mg)}}{\text{ukupan sadržaj proteina (mg)}} \times 100\%$$

3.2.6.2. Kapacitet vezivanja vode, WHC (*engl. Water Holding Capacity*)

U 10 mL destilovane vode rastvoreno je 0,25 g uzorka proteina (WPC i hidrolizati). Nakon 30 minuta uzorak je centrifugiran na 2.800 x g u trajanju od 20 minuta (Deniz i Martin, 1997). Zadržavanje vode (WHC) izračunava se pomoću formule:

$$WHC(\%) = \frac{\text{zapremina supernatanta (mL)}}{\text{početna zapremina (mL)}} \times 100$$

3.2.6.3. Kapacitet vezivanja ulja, OAC (*engl. Oil Absorption Capacity*)

U 10 mL maslinovog ulja (ekstradevičansko) rastvoreno je 0,25 g uzorka proteina (WPC i hidrolizati). Nakon 30 minuta uzorak je centrifugiran na 2.800 x g u trajanju od 20 minuta (Deniz i Martin, 1997)

Zadržavanje ulja (OAC) izračunava se pomoću formule:

$$OAC(\%) = \frac{\text{zapremina supernatanta (mL)}}{\text{početna zapremina (mL)}} \times 100$$

3.2.6.4. Stvaranje pene, FC (*engl. Foam Capacity*) i stabilnost pene, FS (*engl. Foam Stability*)

Stvaranje pene određivano je za 10% (m/v) rastvor koncentrata proteina surutke koji je snažno mućen homogenizatorom u trajanju od 1 min. Stvaranje pene (FC) izračunava se pomoću formule:

$$FC(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100,$$

Gde su: A – zapremina uzorka posle 1 minuta snažnog mešanja (mL), B – zapremina uzorka pre mešanja (mL).

Nakon mešanja, uzorak je ostavljen da odstoji 30 minuta nakon čega je ponovo izmerena zapremina uzorka i izračunata stabilnost pene po formuli:

$$FS(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Gde su: A – zapremina uzorka 30 minuta nakon mešanja (mL), B – zapremina uzorka pre mešanja (mL).

3.2.6.5. Emulgujuća svojstva

Emulgujuća svojstva nehidrolizovanog i hidrolizovanog 10 % (m/v) rastvora koncentrata proteina surutke određivana je po modifikovanoj metodi (Pearce i Kinsella, 1978). Rastvor proteina je razblažen 100 puta, a zatim mešan sa maslinovim uljem u odnosu 2 : 1 i snažno vorteksiran, nakon čega je merena apsorbanca uzorka na 500 nm. Svojstvo emulgovanja EAI (*engl. Emulsion Activity Index*) izračunava se pomoću formule:

$$EAI(m^2 / g) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{L \times c \times \varphi \times 10000}$$

Emulgujuća stabilnost ESI (*engl. Emulsion Stability Index*) je određivana nakon 10min i 24h i računata je po formuli:

$$ESI(\text{min}) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t$$

Gde su: A_0 – apsorbanca emulzije odmah nakon vorteksiranja, N – factor razblaženja (100), L – debljina korišćene kivete za spektrofotometar (1 cm), c – koncentracija proteina u uzorku (g/mL), φ – sadržaj ulja u emulziji, ΔA – promena apsorbance u vremenu čuvanja u frižideru, t - vremenski interval čuvanja u frižideru, 24 h.

3.2.6.6. Digestibilnost

Digestibilnost hidrolizovanih i nehidrolizovanog rastvora proteina surutke određivana je po metodi Elkhailil i sar. (2001). U 1 mL, 10 % (m/v) rastvora proteina dodato je 5 mL rastvora tripsina (0,2 mg/mL u 100 mM Tris–HCl pufer, pH 7,6). Suspenzija je inkubirana na 37 °C tokom 2h. Digestija je zaustavljena dodatkom 2,5 mL 50 % (m/v) trihlorsirćetne kiseline. Uzorak je ostavljen 30 minuta da odstoji u frizideru, a zatim je centrifugiran na 10.000 x g u trajanju od 25 minuta. Dobijeni talog je rastvoren u 2,5 mL 0,2 M NaOH i metodom po Lowry-u određivan je sadržaj proteina. Digestibilnost uzorka računata je pomoću formule

$$Digestibilnost (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Gde su: A – ukupan sadržaj proteina u uzorku pre digestije (mg), B – ukupan sadržaj proteina u talogu nakon centrifugiranja (mg).

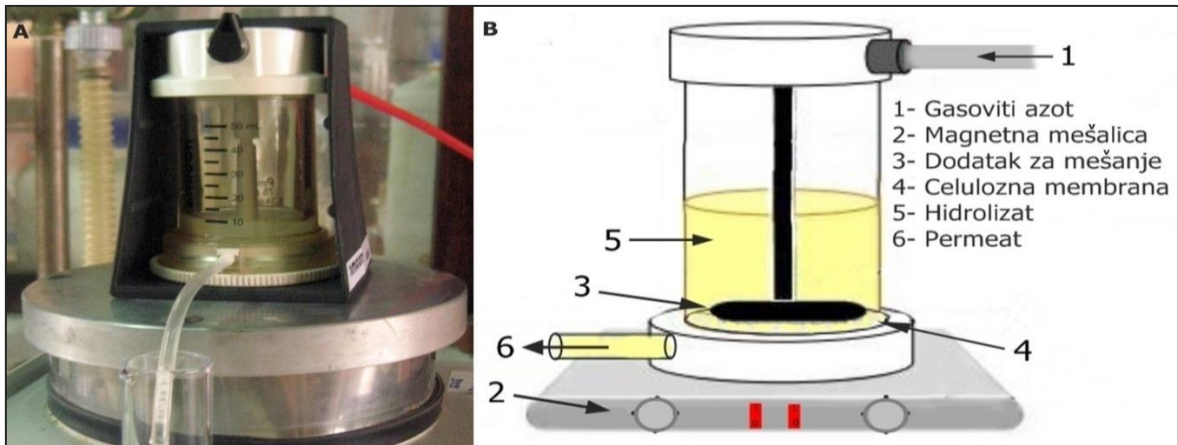
3.2.6.7. Hidrofobnost

Hidrofobnost WPC-a se određuje po modifikovanoj metodi Chelh i sar. (2006). Uzorak rastvoren u 20 mM Tris-HCl puferu (pH 8.0) u koncentraciji 50 mg/mL i bromfenol plavo (koncentracije 1 mg/mL) su pomešani u odnosu 5:1. Uzorci su dobro vorteksirani i ostavljeni 10 minuta na sobnoj temeperaturi, a zatim centrifugirani na 2.000 x g 15 minuta. Supernatant je razblažen 1 : 10 i određivana je apsorbancu na 595 nm. Za kontrolni uzorak dodat je pufer umesto rastvora peptida. Broj veza (BV) bromfenolplavog određivan je po formuli:

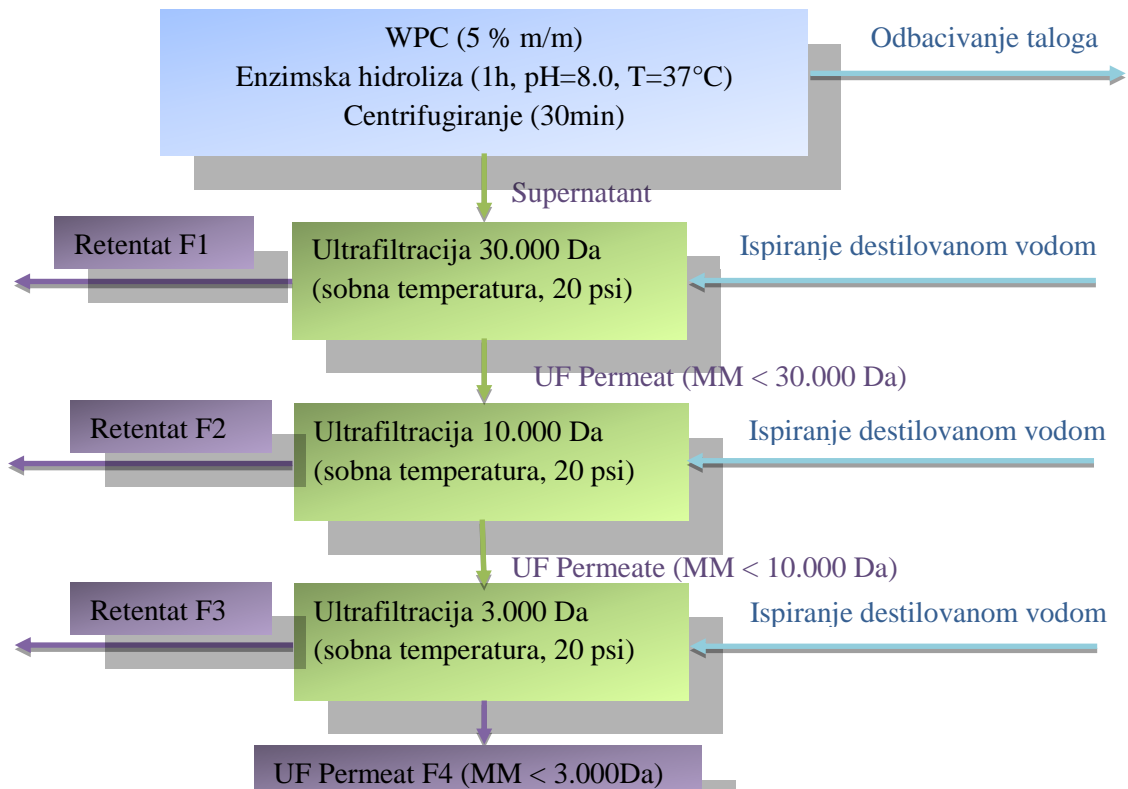
$$BV (\mu g) = 200\mu g \times \frac{Apsorbancu kontrole - Apsorbancu uzorka}{Apsorbancu kontrole}$$

3.2.7. Ultrafiltracija hidrolizata

Ultrafiltracija hidrolizata izvedena je na uređaju Amicon (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) uz pomoć celuloznih „cut off“ membrana veličine 30, 10 i 3 kDa. Prvo je uzorak filtriran kroz membranu veličine pora 30 kDa. Iznad membrane zaostaje uzorak sa proteinima molekulske mase od 30 kDa i to je frakcija F1, permeat koji sadrži proteine molekulske mase ispod 30 kDa propušta se kroz sledeću membranu veličine pora 10 kDa, pri čemu se prikuplja retentat koji sadrži proteine molekulske mase od 10 do 30 kDa i predstavlja frakciju F2, dok se permeat sa proteinima manjim od 10 kD, propušta kroz membranu veličine pora 3 kDa. Iznad membrane zaostaje frakcija F3 koja sadrži peptide molekulske mase od 3 kDa do 10 kDa, a permeat predstavlja frakciju F4 sa peptidima molekulske mase ispod 3 kDa. Uređaj za ultrafiltraciju i shema ultrafiltracije prikazani su na slici 4. Procedura ultrafiltracije prikazana je na slici 10, a a dobijene frakcije u tabeli 4.



Slika 9. Amikon sa hidrolizatom na magnetnoj mešalici (A), šematski prikaz amikona sa hidrolizatom (B)



Slika 10. Shema ultrafiltracije

Tabela 4. Oznake uzorka i frakcija nakon ultrafiltracije

| Naziv uzorka | WPC | H | F1 | F2 | F3 | F4 |
|----------------------|-----------------------|---------------------|------|-------|------|-----|
| Molekulska masa, kDa | Nehidrolizovan uzorak | Hidrolizovan uzorak | > 30 | 10-30 | 3-10 | < 3 |

3.2.8. Određivanje karakterističnih proteina u uzorcima gel-elektroforezom (SDS-PAGE)

U cilju određivanja karakterističnih proteina u uzorcima WPC kao i hidrolizata vršeno je razdvajanje prisutnih proteina primenom metode gel-elektroforeze.

Razdvajanje proteina vršeno na 12,5 % akrilamidnom (AA) gelu za razdvajanje, dok je kao gel za nadslojavanje korišćen 4,0 % akrilamidni (AA) gel. Priprema za izvođenje ove metode se sastojala iz nekoliko faza:

1. Priprema rastvora za pravljenje gelova

| | Rastvori za gelove | | | |
|------------------------|--------------------|--------------|-----------|---------|
| | Tris (1,5 M) | Tris (0,5 M) | 30 % | 10 % |
| | pH 8.8* | pH 6.8* | Akrilamid | APS |
| Tris | 18,7 g | 6,06 g | / | / |
| SDS | 0,40 g | 0,40 g | / | / |
| Akrilamid | / | / | 29,2 g | / |
| Bis-Akrilamid | / | / | 0,80 g | / |
| APS | / | / | / | 0,10 g |
| dest. H ₂ O | do 100 mL | do 100 mL | do 100 mL | do 1 mL |

* pH podesavati sa conc. HCl

2. Priprema pufera

| | Puferi | |
|------------------------|----------------------|-----------|
| | Pufer za | Pufer |
| | elektroforezu pH 8.3 | za uzorke |
| Tris | 3,0 g | / |
| Glicin | 14,4 g | / |
| SDS | 1,0 g | / |
| Tris (0,5 M) pH 6,8 | / | 2,5 mL |
| 10 % SDS | / | 4,0 mL |
| Glicerol | / | 2,0 mL |
| β-Merkaptoetanol | / | 1,0 mL |
| 0,1 % Bromfenol plavo | / | 0,5 mL |
| dest. H ₂ O | do 1000 mL | do 10 mL |

3. Priprema rastvora za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje gelova

| | Rastvori | | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| | Rastvor za fiksiranje | Rastvor za bojenje | Rastvor za ispiranje |
| Metanol (40 %) | 500 mL | 500 mL | 250 mL |
| Sirćetna kiselina (10 %) | 100 mL | 100 mL | 100 mL |
| Etilen-glikol | / | 30 mL | 30 mL |
| Coomassie Blue R-250 | / | 1,00 g | / |
| dest. H ₂ O | do 1000 mL | do 1000 mL | do 1000 mL |

Nakon pripremnih faza pristupa se pravljenju gelova koji će se nalivati u sistem za elektroforezu. Gelovi se pripremaju prema sledećim recepturama:

4. Priprema gelova

| | Gelovi | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Gel za razdvajanje (12,5 %) | Gel za nadslojavanje (4,0 %) |
| H ₂ O - destilovana | 9,40 mL | 6,15 mL |
| Akrilamid (30 %) | 12,50 mL | 1,33 mL |
| Tris-pufer (1,5 M) | 7,50 mL | / |
| Tris-pufer (0,5 M) | / | 2,50 mL |
| SDS (10 %) | 0,30 mL | 0,10 mL |
| APS (10 %) | 0,60 mL | 0,20 mL |
| TEMED | 0,024 mL | 0,01 mL |

Najpre se pripremi 12,5 %-og gela za razdvajanje jer se on prvi naliva u sistem za elektroforezu. Nakon nalivanja gel se ostavlja oko 60 min da očvrzne. Zatim se pristupa izradi gela za nadslojavanje, koji se zatim naliva u preostali prostor sistema i u koji se ubacuje češalj koji će napraviti prostor za nanošenje uzoraka. Ovaj gel se takođe ostavlja oko 60 min da očvrzne.

Nakon toga vrši se priprema uzorka koja podrazumeva mešanje uzorka sa puferom za uzorke (PZU). Uzorak (20 µL) se meša sa PZU (20 µL), kuva 90 s na 100 °C i nakon toga drži 10 min na 4 ± 1 °C. Ovako pripremljen uzorak se nanosi u prostor predviđen za nanošenje uzoraka u gelu za nadslojavanje. Zatim se sistem puni puferom za

elektroforezu i priključuje na izvor struje. Parametri struje se podešavaju na vrednosti 45 mA i 100 W. Proces razdvajanja proteina na gelu za razdvajanje se završava kada vidljivi trag boje dospe na 1,5 cm od kraja gela. Po završetku procesa razdvajanja gel se vadi iz sistema, potapa u rastvor za fiksiranje (15 min) a zatim u rastvor za bojenje (30 min). Pošto je gel obojen pristupa se njegovom ispiranju radi uklanjanja viška boje a u cilju uočavanja traka koje predstavljaju obojene proteine.

3.2.9. Primena UV/Vis spektrofotometrije za određivanje antioksidativne aktivnosti

Elektron-transfer metode (ET) su metode koje se koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti i one podrazumevaju prisustvo oksidansa i antioksidansa u reakcionoj smeši.

Elektron-transfer reakcija koja se odigrava je:



Kada oksidans, uzme elektron iz antioksidansa dolazi do promene boje rastvora. Promena intenziteta obojenosti rastvora je proporcionalna koncentraciji antioksidansa, a reakcija između oksidansa i antioksidansa je završena kada se boja rastvora više ne menja. Spektrofotometrijska analiza se zasniva na merenju apsorbance ispitivanog rastvora. U ovom radi su korišćene tri metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta: pomoću DPPH reagensa i ABTS reagensa, koje su detaljno opisane dalje u tekstu, kao i metoda FRAP ili redukciona snaga koja se takođe dovodi u vezu sa antioksidativnim kapacitetom.

3.2.9.1. Određivanje slobodno-radikalskog kapaciteta (DPPH test)

Određivanje antioksidativnog slobodno-radikalskog kapaciteta prema 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal zasniva se na redukciji ljubičastog 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala odgovarajućim antioksidansima do blede-žutog hidrazina (slika 11).

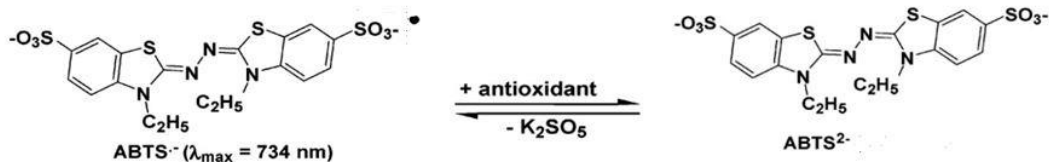


Slika 11. Mehanizam reakcije DPPH radikala sa antioksidantima

U metodi određivanja antioksidativne aktivnosti kao slobodan radikal korišćen je 0,1 mM rastvor 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) u 95 % metanolu. Određivana je antioksidativna aktivnost uzoraka kod fermentacije sa dodatkom peptida i detaljno je opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.4.1.

3.2.9.2. Određivanje antioksidativnog kapaciteta pomoću inhibicije ABTS radikala

Za određivanje antioksidativne aktivnosti korišćenjem ABTS testa korišćena je modifikovana metoda Re (1999). Ova metoda uključuje stvaranje radikala, 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfat) radikal-katjon (ABTS•+) (slika12) koji ima apsorpcione maksimume na talasnim dužinama od 414, 645, 734 i 815 nm.



Slika 12. Mehanizam neutralisanja ABTS radikala

Reagens je pripremljen tako što je 5 mL, 7 mM rastvora ABTS u fosfatnom pufer pH vrednosti 7,4 pomešano sa 88 μ L kalijum-persulfata. Pre upotrebe, ova smeša je inkubirana na sobnoj temperaturi u mraku od 12 do 16 časova. Na dan analize ovaj koncentrovani ABTS rastvor razblažen je fosfatnim puferom do postizanja apsorbanace 0,70 ($\pm 0,02$) na 734 nm. 10 μ L uzorka pomešano je sa 990 μ L rastvora ABTS-a i

apsorbanca je merena nakon 5 minuta na istoj talasnoj dužini. Vršena je analiza uzoraka sa različitim sadržajem peptida, proračun se izvodi prema sledećoj jednačini

$$\text{Inhibicija ABTS (\%)} = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

Gde su: A_k – apsorbanca kontrolnog uzorka, A_a – apsorbanca uzorka.

Rezultati su predstavljeni kao efikasna koncentracija IC_{50} (*engl. Inhibitory Concentration*), koncentracija peptida koja je neophodna za inhibiciju 50 % prisutnih ABTS radikala.

3.2.9.3. Održivanje redukcionne snage (FRAP) (*engl. Ferric Reducing Antioxidant Power*)

U metodi određivanja redukcionne snage 0,2 mL uzorka je mešan sa 0,5 mL fosfatnog pufera (pH 6,6) i 0,5 mL kalijum fericijanida, smeša je inkubirana 30 min na 50 °C. Nakon inkubacije smeši je dodavano 0,5 mL TCA (10 %, m/v) nakon čega je vršeno centrifugiranje na 10000 obrt/min u trajanju od 10 min. Nakon centrifugiranja 0,5 mL supernatanta je mešano sa 0,5 mL vode i 0,1 mL gvožđe-(III)-hlorida. Nakon 10 minuta je merena apsorbanca uzorka na 700 nm. Uzorci predstavljaju različite koncentracije peptida hidrolizata kao, svih frakcija hidrolizata i nehidrolizovanog uzorka. Redukcionna snaga je izražavana kao koncentracija peptida koja daje apsorbanu od 0,5. (Oyaizu, 1986).

3.2.10. ACE inhibitorna aktivnost peptidnih frakcija i fermentisanih uzoraka

ACE inhibitorna aktivnost uzoraka određivana je po metodi Chang i sar. (2001) uz manje izmene. Reakcija je trajala 2 h i prekinuta je dodatkom OPA reagensa. Inhibicija Angiotenzin I konvertujućeg enzima računata je po formuli:

$$\text{Inhibicija ACE (\%)} = \left[1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \right] \times 100$$

A1 – reakciona smeša uzorka, ACE rastvorenog u boratnom puferu tako da daje aktivnost 0,1 U/mL i 5 mM HHL rastvoren u boratnom puferu.

A2 – reakciona smeša uzorka i boratnog pufera.

A3 – reakciona smeša boratnog pufera, ACE rastvorenog u boratnom puferu tako da daje aktivnost 0,1 U/mL i 5 mM HHL rastvoren u boratnom puferu.

A4 – boratni pufer

Ispitivani su uzorci peptida različitih koncentracija (nehidrolizovanog uzorka, hidrolizata i svih frakcija hidrolizata), a zatim je određivana IC_{50} vrednost. IC_{50} predstavlja koncentraciju peptida koja odgovara inhibiciji 50 % angiotenzin I konvertujućeg enzima.

3.2.11. Primena proteina surutke u formulaciji funkcionalnih proizvoda

3.2.11.1. Priprema podloga za gajenje mikroorganizama

3.2.11.1.1. Priprema MRS bujona

51,0 g MRS bujona je rastvaran u destilovanoj vodi (1 L) nakon čega je vršeno kuvanje u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.11.1.2. Priprema M17 bujona

42,0 g M17 bujona je rastvarano u destilovanoj vodi (1 L) nakon čega je vršeno kuvanje u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.11.1.3. Priprema MRS agara

MRS bujon (51,0 g/L) i agar (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.11.1.4. Priprema M17 agara

M17 bujon (42,0 g/L) i agara (18,0 g/L) su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.11.1.5. Priprema MRS agara sa maltozom kao izvorom ugljenika

MRS agar sa različitim izvorima ugljenika pripreman je mešanjem sledećih sastojaka: pepton 4 (1,0 %, m/v), mesni ekstrakt (1,0 %, m/v), ekstrakt kvasca (0,5 %, m/v), tween (0,1 % v/v), di-kalijum hidrogenfosfat (K_2HPO_4 , 0,2 %, m/v), natrijum acetat ($Na(CH_3COO) \times 3H_2O$, 0,55, m/v), amonijum citrat ($((NH_4)_3C_6H_5O_7)$, 0,2 %, m/v), rastvor soli (0,5 %, v/v), agar (1,8 %, m/v). Rastvor soli je sadržao: mangan sulfat ($MnSO_4 \times 4H_2O$, 2,8 %, m/v) i magnezijum sulfat ($MgSO_4 \times 7H_2O$, 11,5 %, m/v). Kao izvor ugljenika dodavano je 2,0 % maltoze. Sastojci su rastvoreni u destilovanoj vodi nakon čega je vršeno kuvanje rastvora u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 20,0 min. Podloga je nakon toga sterilisana u autoklavu na 120,0 °C i p=1,5 bar, 30,0 min.

3.2.11.2. Priprema sirovina

3.2.11.2.1. Priprema surutke u prahu

Surutka u prahu je neposredno pre korišćenja rekonstituisana do sadržaja suve materije 8,0 % (m/v), otapanjem praha surutke u vodi sterilisanoj u autoklavu 30 min na 120 °C. Pripremljena surutka je zatim termički obrađivana postupkom pasterizacije, 60 min na temperaturi 60 °C. Nakon procesa termičke obrade mešavina je hlađena na odgovarajuću temperaturu fermentacije.

3.2.11.2.2. Priprema prirodne surutke

Prirodna surutka je nakon sakupljanja čuvana na temperaturi $-18,0 \pm 1,0$ °C do primene (ne duže od 7 dana). Neposredno pre korišćenja surutka je termički obrađivana postupkom pasterizacije, 60 min na temperaturi 60 °C. Nakon procesa termičke obrade surutka je hlađena na temperaturu fermentacije.

3.2.11.2.3. Priprema mešavine surutke i mleka

Mleko proizvođača Imlek d.o.o, sa sadržajem masti 0,5 % pasterizovano je 60 min na temperaturi 60 °C. Nakon procesa termičke obrade mleko je hlađeno na temperaturu fermentacije. Mešavina prirodne surutke i mleka u odnosu 70,0 : 30,0 pripremana je nakon pasterizacije i hlađenja obe sirovine. Ova mešavina je odabrana kao formulacija supstrata čiji je sastav veoma sličan sastavu humanog mleka koje ima odnos kazein/proteini surutke oko 30,0 : 70,0 (Eek-Poei i Lay-Harn, 2011). Na ovaj način se dobija brzo i lako svarljiv napitak koji je pogodan čak i za osobe sa osetljivim intestinalnim traktom.

3.2.11.3. Priprema nosača za imobilizaciju

3.2.11.3.1. Priprema alginata

Alginat je pripreman rastvaranjem 4,0 g natrijum alginata u 150 mL destilovane vode. Rastvor je mešan na magnetnoj mešalici 24 h, a zatim je pasterizovan u vodenom kupatilu na 70 °C 30 min. Nakon postepenog hlađenja spreman je za korišćenje.

3.2.11.3.2. Priprema hitozana

Rastvor hitozana je pripreman po metodi Zhou i sar. (1998). 0,4 g hitozana niske molekulske mase rastvoreno u 90 mL destilovane vode, 0,4 mL glacijalne sirćetna kiseline da bi se postigla konačna koncentracija hitozana od 4,0 g/L. Podešena je pH vrednost 5,7 dodatkom 1 M natrijum hidroksida. Rastvor je zatim filtriran kroz Whatman 4 filter papir i autoklaviran na 120 °C u trajanju od 30 minuta

3.2.11.3.3. Priprema proteina surutke za imobilizaciju

Koncentrat proteina surutke rastvoren u destilovanoj vodi (15 % m/v) sterilisan je u vodenom kupatilu na 70 °C 30 minuta. Rastvor je zatim ohlađen je na sobnu temperaturu i korišćen za imobilizaciju.

3.2.11.3.4. Priprema hidrolizata proteina surutke za imobilizaciju

Koncentrat proteina surutke rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji od 15 % (m/v) hidrolizovan je pomoću tripsina, na 37 °C 1 h. Nakon 1 sata hidrolize enzim je inaktivisan desetominutnim zagrevanjem na 90 °C nakon čega je rastvor spreman za korišćenje.

3.2.11.4. Priprema mikroorganizama

3.2.11.4.1. Priprema komercijalne ABY 6 kulture za fermentaciju slobodnom kulturom

Komercijalna ABY 6 (DVS) kultura je pre primene aktivirana pripremom 1,0 % (m/v) rastvora kulture u mleku, nakon čega je vršena inkubacija u vodenom kupatilu u trajanju od 40 min na temperaturi 42 °C. Ovako aktivirana kultura korišćena je za inokulaciju uzoraka.

3.2.11.4.2. Priprema komercijalne ABY 6 kulture za fermentaciju imobilisanom kulturom

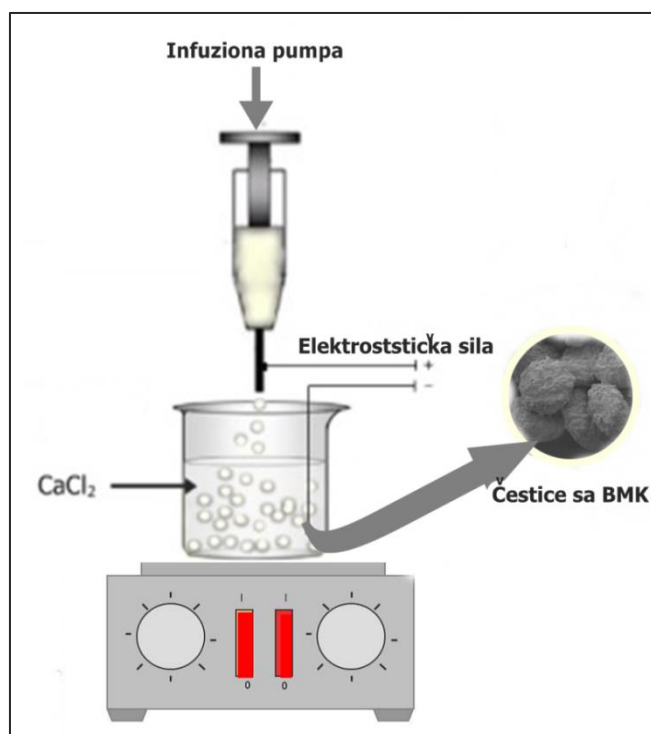
Komercijalna ABY 6 kultura u ovom slučaju nije prethodno aktivirana. Liofilizovana kultura je dodavana u pasterizovanu prirodnu surutku u koncentraciji 1,0 % (m/v) kada je u pitanju imobilizacija pomoću alginata, a u procentu 2,0 % kada je u pitanju imobilizacija pomoću alginata i proteina surutke i alginata i hidrolizata proteina surutke. U tabeli 5 je data lista oznaka različitih uzoraka i njihova formulacija

Tabela 5. Oznaka uzorka i formulacija sistema

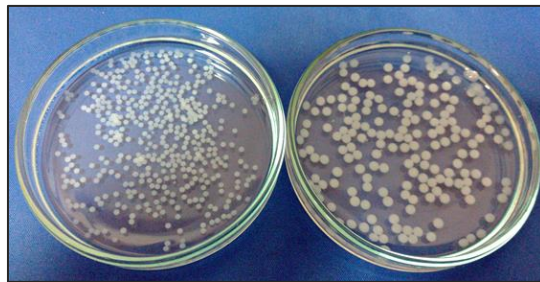
| Početni rastvor | Rastvor za geliranje | Rastvor za oblaganje | Oznaka čestica |
|--|----------------------|----------------------|----------------|
| Alginat+surutka sa kulturom | CaCl ₂ | | A |
| Alginat+ surutka sa kulturom | CaCl ₂ | Hitozan | AH |
| Alginat+surutka sa kultur+ WPC | CaCl ₂ | | AW |
| Alginat+surutka sa kulturom+ hidrolizat proteina surutke | CaCl ₂ | | AHT |

3.2.11.4.2.1. Postupak imobilizacije komercijalne ABY 6 kulture u alginatne čestice

Natrijum-alginat, pripremljen po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.3.1., je pomešan sa suspenzijom koja sadrži kulturu (Odeljak 3.2.11.4.2.) u zapreminskom odnosu 1,5 : 1 kako bi se postigla koncentracija natrijum-alginata od 1,60 %. Ova smeša je dalje podvrgnuta ekstruziji kroz iglu sa ravnim vrhom (22 G) pri konstantnom protoku koji se obezbeđuje pomoću infuzione pumpe. Ekstruzija je izvedena uz primenu električnog polja koje je uvedeno u sistem pomoću elektrode povezane sa iglom i uzemljenja postavljenog u rastvor za geliranje. Rastojanje između elektrode i uzemljenja iznosilo je 3,0 cm, a napon na elektrodama generisala je jedinica za visok napon i iznosio je 6,3 kV. Rastvor kalcijum-hlorida (2,0 %) korišćen je kao rastvor za geliranje i u njemu su formirane čestice sa inkapsuliranom ABY 6 kulturom. Pored čestica dobijenih pomoću električnog polja, pravljene su i čestice bez korišćenja električnog polja u proseku 2,5 puta veće od pomenutih čestica (slika 14). Šematski prikaz postupka i uređaja dat je na slici 13.



Slika 13. Postupak elektrostatske ekstruzije



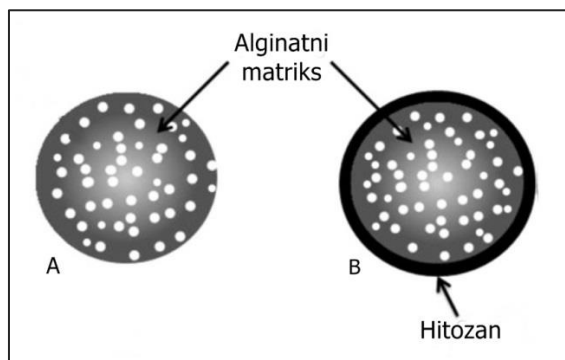
Slika 14. Male čestice dobijene elektroststičkom ekstruzijom u prvoj petrišolji i velike čestice dobijene običnom ekstruzijom u drugj Petri šolji

3.2.11.4.2.2. Postupak imobilizacije komercijalne ABY 6 kulture u alginatno-proteinske čestice

Surutka koja sadrži 2,0 % ABY 6 kulture (Odeljak 3.2.11.4.2.) pomešana je sa rastvorom proteina (Odeljak 3.2.11.3.3.) za AW čestice odnosno sa rastvorom hidrolizata (3.2.11.3.4.) za AHT čestice u odnosu 1 : 1. Zatim je rastvor natrijum-alginata pomešan sa suspenzijom koja sadrži kulturu u zapreminskom odnosu 1.5 : 1 kako bi se postigla konačna koncentracija natrijum-alginata od 1,60 %, a proteina 2,40 %. Ova smeša je dalje podvrgnuta ekstruziji kao što je opisano u Odeljku 3.2.11.4.2.1.

3.2.11.4.2.3. Postupak oblaganja alginatnih čestica hitozanom

Postupak oblaganja čestica obavljen je po metodi Zhou i sar. (1998). U 100 mL rastvora hitozana dodato je 15,0 g alginatnih čestica. Rastvor sa česticama je blago mešan na magnetnoj mešalici u trajanju od 40 minuta, a zatim filtriran kroz filter prečnika pora ispod 1,0 mm uz intenzivno ispiranje destilovanom vodom. Čestice su tada spremne za dalje korišćenje.



Slika 15. Izgled alginatne čestice (A) i alginatne čestice obložene slojem hitozana (B)

3.2.11.5. Primena i ispitivanje inkapsulirane kulture

3.2.11.5.1. Fermentacija slobodne i inkapsulirane kulture

Pripremljena mešavine surutke i mleka (Odeljak 3.2.11.2.3.) je zasejavana odgovarajućom količinom inokuluma koja je iznosila 6,0 % (m/v) ispitivanog inkapsuliranog mikroorganizma odnosno 6,0 % (v/v) aktiviranog slobodnog mikroorganizma, što je predstavljalo kontrolni uzorak. Uzorci su zatim inkubirani u vodenom kupatilu na 42 °C sve do postizanja pH \approx 4,6, nakon čega je fermentacija zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka. Promena pH vrednosti je praćena sterilnim uzorkovanjem (3 mL) medijuma na svakih 1 h vremena.

3.2.11.5.2. Liofilizacija

Liofilizacija uzoraka (čestica) je vršena sa ciljem pripreme uzorka za procese FT-IR koji je opisan u Odeljku 3.2.11.5.3. Liofilizacija je vršena pomoću laboratorijskog liofilizatora (Christ, model Beta 1-8 LD). Uzorci su do upotrebe čuvani u eksikatoru u prisustvu silika gela.

3.2.11.5.3. Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Furijeova transformacijska infracrvena spektroskopija je korišćena u cilju utvrđivanja eventualnih promena koje nastaju na česticama prilikom fermentacije i interakcije različitih nosača. Za FT-IR analize korišćena je količina od jedne čestice uzorka koji se pomeša i sprai sa 100 mg kalijum bromida. Smeša se zatim komprimuje u tablete pod pritiskom od 11 t, u trajanju od oko 2 min. Dobijeni spektri su u rasponu talasnog broja od 400–4000 cm^{-1} i na rezoluciji spektra od 4 cm^{-1} .

3.2.11.5.4. Optička mikroskopija

Uvid u sferičnost i dimenzije čestica dobijen je pomoću optičkog mikroskopa (Axio Imager A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH., Nemačka). Čestice su prilikom procedure posmatranje suspendovane u destilovanoj vodi kako ne bi došlo do sušenja i skupljanja čestica.

3.2.11.5.5. Mehaničke karakteristike nosača sa inkapsuliranom kulturom

Mehaničke karakteristike čestica određene su na uređaju za testiranje mehaničkih karakteristika materijala AG-X plus Universal Testing Machine (Shimadzu, Japan) u režimu kompresije. Za ova ispitivanja korišćena je merna ćelija od 100 N. Test je vršen na sloju čestica mase 6,0 g postavljenom u Petri šolju, brzina kompresije je podešena na 1 mm/min. Disk za kompresiju koji je korišćen pri mehaničkim testovima je cilindričnog oblika od nerđajućeg čelika sa velikom kontaktnom površinom (50 mm u prečniku). Kompresija je vršena do postizanja 30 % deformacije. Sva merenja su vršena na temperaturi od 25 °C.

3.2.11.5.6. Parametri kvaliteta

3.2.11.5.6.1. Određivanje pH vrednosti

Vrednost pH uzoraka određivana je pomoću pH metra (Inolab, WTW 82362, Wellheim, Nemačka). Merenje je izvođeno pod apsolutno sterilnim uslovima koji su obezbeđeni sterilnim uzorkovanjem fermentacionog medijuma.

3.2.11.5.6.2. Određivanje titracijske kiselosti

Titracijska kiselost uzoraka je određivana metodom po Soxhlet-Henkelu a dobijene vrednosti su izražavane kao °SH (Varga, 2006).

3.2.11.5.6.3. Određivanje broja živih ćelija kod fermentacije slobodnom kulturom

Po 1,0 mL fermentacionog medijuma je pod sterilnim uslovima mešan sa 9,0 mL sterilnog 0,85 % (m/v) rastvora NaCl, što predstvalja razblaženje 10. Nakon toga vršeno je prenošenje po 1 ml prethodnog razblaženja u novih 9,0 ml sterilnog 0,85 % rastvora NaCl da bi se dobila serija od ukupno 8 razblaženja pri čemu je svako sledeće deset puta veće od prethodnog. U zavisnosti od pretpostavljene koncentracije bakterija u fermentacionom medijumu birana su tri razblaženja iz kojih je po 1,0 mL prenošen u Petri šolje. Uzorci u Petri šoljama su zatim prelivani odgovarajućim hranljivim agarom. Po ocvršćavanju prvog sloja agara, u Petri šolje se nanosi još jedan sloj agara, radi

obezbeđivanja mikroaerofilnih uslova za rast bakterija ukoliko je to neophodno, u zavisnosti od ispitivane bakterije. Nakon obeležavanja, Petri šolje su inkubirne u termostatu na optimalnoj temperaturi rasta mikroorganizama (37 °C) u trajanju od 48 h. Broj izraslih kolonija je određivan Kohovom metodom. Ukupan broj živih ćelija u 1 ml fermentacionog medijuma računat je množenjem ukupnog broja kolonija izraslih na Petri šolji sa odgovarajućim razblaženjem. U slučaju pojave kolonija na više Petri šolja, broj ćelija je računat kao srednja vrednost (Vrboški i Markov, 1993).

3.2.11.5.6.4. Određivanje broja živih ćelija kod fermentacije inkapsuliranom kulturom

3.2.11.5.6.4.1. Određivanje broja živih ćelija inkapsulirane kulture

Medijum je profiltriran pomoću sterilnog filtra veličine pora 0,7 mm. Čestice su ispirane fiziološkim rastvorom, a zatim je 1,0 g čestica rastvaran u 9,0 mL sterilnog 2,0 % (m/v) rastvora natrijumcitrata. Zatim je 1,0 mL ovako rastvorenih čestica prenošen u 9,0 mL sterilnog 0,85 % (m/v) rastvora NaCl. Nakon toga vršeno je prenošenje po 1,0 mL prethodnog razblaženja u novih 9,0 mL sterilnog 0,85 % rastvora NaCl da bi se dobila serija od ukupno 8 razblaženja pri čemu je svako sledeće deset puta veće od prethodnog. Postupak je dalje identičan onom opisanom u Odeljku 3.2.11.5.6.3.

3.2.11.5.6.5.2. Određivanje broja živih ćelija kulture koja se nalazi slobodna u medijumu

Broj slobodnih živih ćelije kod fermentacije inkapsuliranom kulturom određivan je na način kao broj ćelija kod fermentacije slobodnom kulturom opisan u Odeljku 3.2.11.5.6.3.

3.2.11.5.6.5.3. Curenje kulture iz čestica tokom fermentacije

Curenje kulture određivano je kao odnos broja slobodnih bakterija u fermentacionom supstratu nakon fermentacije i ukupnog broja živih ćelija.

$$Curenje = \frac{\text{broj živih slobodnih ćelija (CFU)}}{\text{broj živih inkapsuliranih ćelija (CFU) + broj živih slobodnih ćelija (CFU)}} \times 100\%$$

3.2.11.5.6.6. Određivanje probiotskog karaktera

U ispitivanju preživljavanja probiotskih bakterija u simuliranim uslovima u želucu korišćena je delimično modifikovana metoda Prasad i sar. (1998).

Za ispitivanje uticaja kisele sredine na preživljavanje bakterija korišćen je bujon korigovane pH vrednosti 2,5 i 3,0. Korekcija pH vrednosti vršena je dodavanjem 1M rastvora HCl, nakon čega je ovako pripremljen bujon sterilisan u autoklavu 30 min na 120 °C. Za ispitivanje uticaja prisustva žučnih soli na preživljavanje bakterija, korišćen je sterilni bujon u koji je dodavan sterilni 10 % (m/v) rastvor govede žuci, tako da je konačna koncentracija govede žuci u bujonu iznosila 0,3 % (m/v). pH vrednost ovako pripremljenog bujona se kretala u opsegu 6,0 do 6,2. Kao kontrolni uzorak je korišćen sterilni rastvor bujona pH vrednosti od 6,0 – 6,2.

U svaki od erlenmajera zasejavano je 2,0 % (v/v kada je u pitanju fermentacija slobodnom kulturom i m/v kada je u pitanju fermentacija inkapsuliranom kulturom) ispitivane kulture nakon fermentacije. Inkubacija je vršena u termostatu na 37 °C pod anaerobnim uslovima. Promena broja ćelija u uzorcima je praćena tokom 4 h, što odgovara maksimalnom zadržavanju hrane u želucu (od 2 do 4 h). Broj ćelija u svakom od uzoraka je određivan nakon serije razblaženja u fiziološkom rastvoru Kohovom metodom na agarnim pločama (postupak opisan u Poglavlju 3.2.11.5.6.3.). Petri šolje su inkubirane 48 h u termostatu na temperaturi 37 °C, nakon čega su brojane izrasle kolonije.

3.2.11.5.6.7. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja

Stabilnost proizvedenih napitaka praćena je određivanjem ključnih parametara kvaliteta (pH vrednosti, titracijske kiselosti i broja živih ćelija) tokom čuvanja na 4 ± 1 °C u vremenskom intervalu od 28 dana. Napici su pod sterilnim uslovima uzorkovani nakon 1, 7, 14, 21 i 28 dana i na osnovu odrđenih vrednosti parametara određen je period u kome napitak zadržava zadovoljavajući kvalitet.

3.2.11.6. Dodatak peptida surutke u supstrat za fermentaciju radi ispitivanja uticaja peptida na tok fermentacije

U slučaju dodatka peptida ispitivana su dva supstrata za fermentaciju: mleko sa 0,5 % mlečne masti proizvođača Imlek d.o.o. i smeša mleka i surutke opisana u Odeljku 3.2.11.2.3 s tom izmenom da je korišćena surutka u prahu čija priprema je opisana u Odeljku 3.2.11.2.1. U ova dva supstrata za fermentaciju dodat je hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću Proteinaze K, u procentu od 1, 3 i 5 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina, kao i frakcija F4 hidrolizata Proteinaze K (molekulska masa manja od 3 kDa) takođe u procentu od 1, 3 i 5 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina u supstratu za fermentaciju. Na ovaj način dobijeno je ukupno 14 supstrata za fermentaciju predstavljenih u tabeli 6.

Tabela 6. Supstrati za fermentaciju u zavisnosti od početnog supstrata i vrste i procenta dodatka bioaktivnih peptida.

| Sirovina/dodatak | / | 1% HPK- F4 | 3% HPK-F4 | 5% HPK-F4 | 1% HPK | 3% HPK | 5% HPK |
|-------------------------|----------|---------------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Surutka + mleko | Kontrola | 1F4S | 3 F4S | 5 F4S | 1HS | 3HS | 5HS |
| Mleko | Kontrola | 1 F4J | 3 F4J | 5 F4J | 1HJ | 3HJ | 5HJ |

3.2.11.6.1. Fermentacija mleka sa dodatkom peptida

Pasterizovano mleko sa 0,5 % mlečne masti proizvođača Imlek d.o.o sa dodatkom peptida kao što je naznačeno u tabeli 6 u Odeljku 3.2.11.6. je zasejavano sa 6,0 % (v/v) aktiviranog slobodnog mikroorganizma (Odeljak 3.2.11.4.1). Uzorci su zatim prenošeni u vodeno kupatilo u kome su inkubirani na temperaturi od 42 °C sve do postizanja pH ≈ 4,6, nakon čega je fermentacija zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka. Promena pH vrednosti je praćena sterilnim uzorkovanjem (3,0 mL) medijuma na svakih 1 h vremena.

3.2.11.6.2. Fermentacija supstrata na bazi surutke sa dodatkom peptida

Pripremljena mešavine surutke i mleka sa dodatkom bioaktivnih peptida kao što je naznačeno u tabeli 6 u Odeljku 3.2.11.6. je zasejavana odgovarajućom količinom inokuluma koja je iznosila 6,0 % (v/v) aktiviranog slobodnog mikroorganizma (Odeljak 3.2.11.4.1.). Uzorci su zatim prenošeni u vodeno kupatilo u kome su inkubirani na temperaturi od 42 °C sve do postizanja pH \approx 4,6, nakon čega je fermentacija zaustavljena naglim hlađenjem uzoraka. Promena pH vrednosti je praćena sterilnim uzorkovanjem (3,0 mL) medijuma na svakih 1 h vremena.

3.2.11.6.3. Parametri kvaliteta fermentisanog napitka sa dodatkom proteina

3.2.11.6.3.1. Određivanje pH vrednosti

Izvodi se kao što je opisano u Odeljku 3.2.11.5.6.1.

3.2.11.6.3.2. Određivanje titracijske kiselosti

Opisano u Odeljku 3.2.11.5.6.2.

3.2.11.6.3.3. Određivanje broja živih ćelija

Opisano u Odeljku 3.2.11.5.6.3

3.2.11.6.3.4. Antioksidativni kapacitet fermentisanog proizvoda

3.2.11.6.3.4.1. Određivanje slobodno-radikalskog kapaciteta RSC (*engl. Radical Scavenging Capacity*) pomoću DPPH radikala

U metodi određivanja antioksidativne aktivnosti kao slobodan radikal korišćen je 0,1 mM rastvor 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) u 95,0 % metanolu. Rastvor je pripreman neposredno pre testa i korišćen je svež. Uzorci pre i nakon fermentacije su rastvarani u metanolu u odnosu 1:4 u slučaju fermentisanog napitka na bazi surutke i 1 : 3 u slučaju fermentisanog mleka, a zatim centrifugirani na 10.000 x g u trajanju od 20

min. Nakon centrifugiranja 500 μ L supernatanta mešano sa 1,0 mL metanola i 1,0 mL rastvora DPPH. Sadržaj epruvete je vorteksiran i ostavljan da stoji u mraku 30 min na sobnoj temperaturi, nakon toga je vršeno merenje apsorbance uzoraka na talasnoj dužini 517 nm. Kontrolni uzorak je sadržao metanol umesto ispitivanog uzorka. Dobijeni rezultat je izražen kao procenat inhibicije DPPH radikala, koji zapravo predstavlja procenat neutralizacije slobodnih DPPH radikala u odnosu na kontrolu i računat pomoću jednačine Kapacitet hvatanja slobodnih radikala računat je na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija DPPH (\%)} = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

Gde su: A_k – apsorbance kontrolnog uzorka, A_a – apsorbance uzorka.

3.2.11.6.3.4.2. ABTS test

Određivana je aktivnost uzoraka pre i nakon fermentacije, po metodi i formuli opisanoj u Odeljku 3.2.9.2..

3.2.11.6.3.4.3. FRAP test

Određivana je aktivnost uzoraka pre i nakon fermentacije, po metodi i formuli opisanoj u Odeljku 3.2.9.3.

3.2.11.6.3.5. Određivanje ACE inhibitorne aktivnosti fermentisanog proizvoda

Rađena je analiza uzoraka pre i posle fermentacije. Uzorkovan je fermentacioni supstrat koji je razblaživan 10 puta. Metoda je opisana u Odeljku 3.2.10.

3.2.11.6.3.6. Određivanje stabilnosti proizvoda tokom procesa čuvanja

Stabilnost proizvedenih napitaka procenjivana je određivanjem ključnih parametara kvaliteta (pH vrednosti, titracijske kiselosti i broja živih ćelija) kao antioksidativnog kapaciteta i redukcionog snage tokom čuvanja na 4 ± 1 °C u vremenskom intervalu od 28 dana. Napici su pod sterilnim uslovima uzorkovani nakon 1, 7, 14, 21 i 28 dana i na

osnovu određenih vrednosti parametara procenjivan je maksimalni period u kome napitak zadržava zadovoljavajući kvalitet.

3.2.11.6.3.7. Probiotski karakter proizvoda

Metoda je opisana u Odeljku 3.2.11.5.6.6.

3.2.11.7. Dodatak bioaktivnih peptida u masni krem

Dodatak hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k i frakcije F4 ovog hidrolizata u masni krem koji se koristi za punjenje konditorskih proizvoda, vršena je u cilju ispitivanja poboljšanja karakteristika krema dodatkom bioaktivnih peptida. Dodatak u krem vršen je u koncentraciji od 5,0 % u odnosu na postojeći sadržaj proteina u kremu koji iznosi 11,0 %. Dalje je pristupano praćenju parametara nakon mesec i dva meseca čuvanja masnog krema u frižideru na temperaturi 4 ± 1 °C. Kontrolni uzorak predstavljao je masni krem bez dodataka bioaktivnih peptida. Ispitivani parametri su antioksidativna aktivnost (DPPH, ABTS, Redukcioa moc), kao i ACE inhibitorna aktivnost. Sve metode su prethodno opisane.

3.2.11.7.1. Antioksidativni kapacitet masnog krema

Antioksidativni kapacitet masnog krema vršen je rastvaranjem 1 g masnog krema u 25 mL destilovane vode i tako rastvoreni uzorci su podvrgnuti metodi opisanoj u Odeljku 3.2.9.2. za inhibiciju ABTS radikala, odnosno Odeljak 3.2.9.3 za FRAP.

3.2.11.7.2. ACE inhibitorna aktivnost masnog krema

ACE inhibitorna aktivnost masnog krema vršen je tako što je 1g masnog krema rastvoren u 25 mL destilovane vode i tako rastvoreni uzorci su podvrgnuti metodi opisanoj u Odeljku 3.2.10.

3.2.11.8. Dodatak hidrolizata proteina surutke u mlečnu čokoladu

U rastopljenju mlečnu čokoladnu masa dodato je 6,0 % WPC-a i hidrolizovanog WPC-a dobijenog pomoću tripsina, dok je kontrolni uzorak predstavljala čokoladna masa bez dodataka peptida. Urađene su pretkristalizacije dobijenih čokoladnih masa na 29,0 °C. Pretkristalizacija čokoladnih masa je izvedena u laboratorijskom pretkristalizatoru, modifikovanom Brabenderovom farinografu. Tok pretkristalizacije se pratio indirektno preko promene unutrašnjeg otpora koji pruža masa pri mešanju i koji se registruje na dijagramu vreme/otpor (Pajin, 2009). Primenjena je sledeća temperatura pretkristalizacije: 29,0 °C . Čokoladna masa je izlivena u forme dimenzija (60 x 30 x 6 mm) i ohlađene u hladnjaku na temperaturi od 10,0 – 16,0 °C. U dobijenim čokoladama je nakon stabilizacije od nedelju dana određen: sadržaja ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnosti, raspodela veličine čestica, reološka ispitivanja i teksturometrija čokolade.

3.2.11.8.1. Raspodela veličine čestica

Raspodela veličina čvrstih čestica u uzorcima određena je korišćenjem uređaja Mastersizer 2000, Malvern Instruments, UK (slika 16). Kao dispersant korišćeno je suncokretovo ulje, u kojem je dispergovan uzorak. Najpre se za uzorak i dispersant definišu vrednosti indeksa apsorpcije i refrakcije. Zatim se pripremljen i dispergovan uzorak u suncokretovom ulju unosi u mernu zonu instrumenta do adekvatne obskuracije.

Parametri raspodele veličina čestica:

$d(0,1)$ – 10 % zapremine uzorka je manje od $x \mu\text{m}$, a 90 % je veće od $x \mu\text{m}$.

$d(0,5)$ – 50 % zapremine uzorka je manje od $x \mu\text{m}$, a 50 % je veće od $x \mu\text{m}$.

$d(0,9)$ – 90 % zapremine uzorka je manje od $x \mu\text{m}$, a 10 % je veće od $x \mu\text{m}$.

d_{sr} - srednji prečnik zapreminske raspodele

Specific surface area (m^2/g) – ukupna površina čestica podeljena sa ukupnom masom čestica

Span – širina raspodela



Slika 16. Uređaj Mastersizer 2000, Malvern

3.2.11.8.2. Određivanje teksturalnih osobina čokolade

U cilju određivanja teksture čokolade primenjena je metoda 3-Point Bending Rig HDP/3PB na temperaturi 20 °C, na teksturometru TA.XT Plus (slika 17). Radni uslovi su: merna ćelija: 5 kg, temperatura 20 °C, brzina cilindrične sonde pre analize: 1,0 mm/s, brzina cilindrične sonde tokom analize: 3,0 mm/s, brzina cilindrične sonde nakon analize: 10,0 mm/s, udaljenost: 40 mm. Na radnu površinu smešta se osnova i pažljivo učvrsti pomoću šrafova koji se nalaze na ploči. Dva oslonca se podese na odgovarajuću udaljenost tako da mogu da pridržavaju uzorak. Podešava se položaj koji omogućava da nož bude podjednako udaljen od oba oslonca.



Slika 17. Uređaj teksturometar TE32

3.2.11.8.3. Određivanje reoloških osobina čokolade

Reološka merenja izvedena su određivanjem krivih proticanja na uređaju RheoStress 600, Haake. Prilikom ispitivanja uzoraka korišćen je pribor Z20 DIN (cilindar). Krive proticanja određene su merenjem histerezisnih petlji (krive τ -napon smicanja u zavisnosti od D-brzine smicanja) u opsegu brzine smicanja od 0 - 60 1/s. Uzorak je najpre temperiran 300 s na temperaturi 40°C. Brzina smicanja povećavana je od 0 - 60 1/s u trajanju od 180 sekundi, zatim je održavana 60 sekundi na maksimalnoj brzini od 60 1/s, a smanjivanje brzine smicanja od 60 - 0 1/s je trajalo 180 sekundi.

3.2.11.8.4. Određivanje antioksidativnih svojstava čokolade

3.2.11.8.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola

U 9,0 mL destilovane vode rastvoreno je 1,0 g čokolade. U epruveti je pomešano 100 μ L uzorka, 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa i 6,0 mL destilovane vode. Nakon vorteksiranja dodato je 2,0 mL 15 %-tnog rastvora Na_2CO_3 , rastvor je zatim dopunjen do 10,0 ml destilovanom vodom, pa je ponovo vorteksiran. Absorbanca rastvora je merena posle 2 h na 750 nm prema slepoj probi (umesto uzorka dodato je 100 μ L čistog rastvarača).

Standardna kriva: Rezultati su izraženi kao mg galne kiseline (GAE) na g čokoladne mase i izračunati iz standardne krive. Za pripremanje standardne krive napravljena su razređenja galne kiseline od 1-1500 μ g/mL koja su korišćena umesto uzoraka u opisanoj metodi po Folin-Ciocalteu. Iz nađenih ekstinkcionih vrednosti konstruisana je kriva.

Dobijena jednačina standardne krive je: $C(X) = (Y + 0.07823)/1.34577$ $R = 0.98974$

Gde su: Y- absorbanca rastvora na 750 nm, C(X) - mg GAE/mL uzorka.

3.2.11.8.4.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

U 8,0 mL destilovane vode rastvoreno je 2,0 g čokolade. Rastvoren uzorak čokolade pomešan je sa metanolom u odnosu 1 : 3 i centrifugiran na 10000 x g, 10 minuta. U 900 μ L rastvora DPPH (0,1 mM rastvor 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil u 95,0 % metanolu)

dodato je 100 µL supernatanta. Absorbanca rastvora je merena posle 30 min na 517 nm. Kontrolni uzorak je metanol umesto ispitivanog uzorka. Dobijeni rezultat je izražen kao procenat inhibicije DPPH radikala, računat na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija DPPH (\%)} = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100$$

Gde su: A_k – apsorbanca kontrolnog uzorka, A_a – apsorbanca uzorka.

3.2.11.8.4.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala

Određivana je aktivnost uzoraka pre i nakon fermentacije, po metodi i formuli opisanoj u Odeljku 3.2.9.2.

3.2.11.8.5. Senzorne i teksturna svojstva čokolade

Senzorna i teksturna svojstva uzoraka su određivane primenom QDA (*engl. Qualitative Data Analyses*) metode. 20 nasumično odabranih učesnika (15 žena i 5 muškaraca između 30 i 55 godina starosti) je pozvano da učestvuje u ocenjivanju senzornih karakteristika uzoraka. Svaki učesnik je dobio anketni list (prilog 4) sa 7 kriterijuma za ocenu čokolade (intezitet braon boje, sjaj površine, miris kakaoa, topivost, tvrdoća, peskovitos, adhezivnost). Po 10,0 g testiranih uzoraka je servirano na beloj prostirci i temperaturi $20,0 \pm 2,0$ °C. Učesnici su zamoljeni da zaokruže ocenu, na skali od 1 do 7 u anketnom listu, koja na najbolji način opisuje testirani uzorak.

3.2.12. Statistička obrada eksperimentalnih podataka

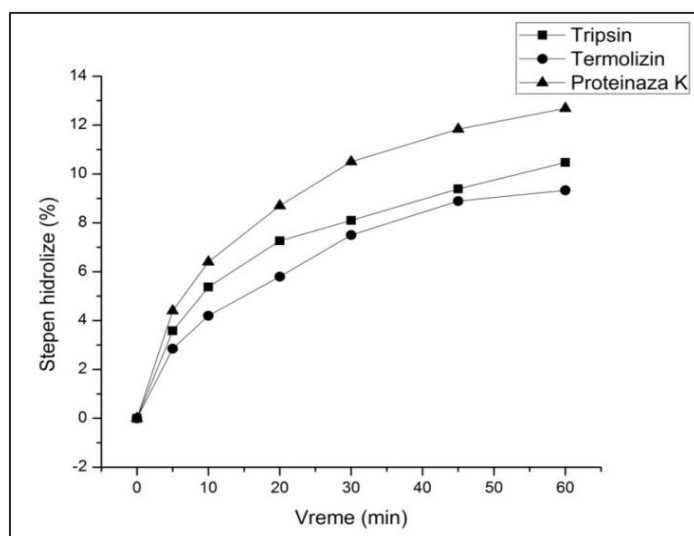
Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu. Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija za svako merenje. Prikom analize podataka, a u cilju procene statističkog značaja rezultata korišćena je analiza varijanse (ANOVA). U zavisnosti od broja parametara čiji je uticaj ispitivan za poređenje aritmetičkih sredina, korišćena je jednostruka (One-way ANOVA) ili dvostruka analiza varijanse (Two-way ANOVA) sa naknadnim Tukey testom. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim ukoliko je p vrednost bila manja od 0,05 ($p < 0,05$).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Dobijanje i svojstva proteina i peptida surutke

4.1.1. Stepen hidrolize i tehnološka svojstva hidrolizata

Vodeni rastvor koncentrata proteina surutke je hidrolizovan pomoću tri vrste proteaza u cilju cepanja proteina i otpuštanja bioaktivnih peptida. Tokom 60 minuta hidrolize postignut je različit stepen hidrolize (slika18). Za stepen hidrolize je karakteristično da ima najveći porast na početku hidrolize u prvih 30 do 60 minuta, a da nakon toga gradijent njegovog rasta drastično opada (Correa i sar., 2014; Dryakova i sar., 2010; Graszkievicz i sar., 2010; Mullally i sar., 1997; Spellman i sar., 2003), što se uočava i u ovom radu. Stepen hidrolize dobijen pomoću tripsina je $10,47 \pm 0,19$ % što je 1,12 puta veće u odnosu na stepen hidrolize dobijen pomoću termolizina, dok je stepen hidrolize dobijen pomoću proteinaze k pod istim uslovima značajno veći od oba (1,21 puta veći u odnosu na DH dobijenog pomoću termolizina, a 1,36 puta veći u odnosu na DH dobijenog pomoću tripsina).



Slika 18. Stepen hidrolize (DH) tokom 1h hidrolize WPC-a pomoću proteinaze k (E/S=1 %), termolizina (E/S=1 %), i tripsina (E/S=5 %).

Tabela 7. Prosečni stepen dužine peptidnih lanaca tokom hidrolize proteina surutke različitim enzimima pri pH 8,0 temperaturi od 37 °C u trajanju od 60 min, računato u odnosu na stepen hidrolize

| | 0, min | 5, min | 10, min | 20, min | 30, min | 45, min | 60, min |
|---------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Tripsin | / | 27,94 | 18,61 | 13,77 | 12,34 | 10,65 | 9,55 |
| Termolizin | / | 35,08 | 23,81 | 17,24 | 13,33 | 11,25 | 10,72 |
| Proteinaza k | / | 22,72 | 15,62 | 11,49 | 9,53 | 8,45 | 7,89 |

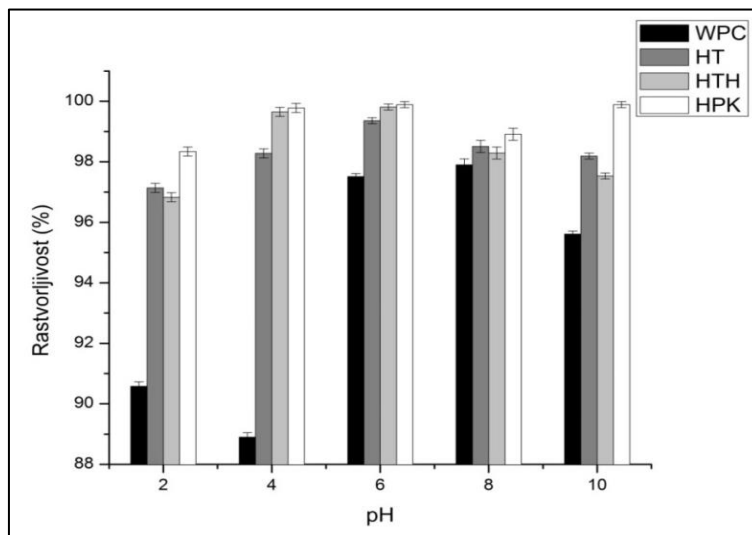
U tabeli 7 prikazan je prosečan stepen dužine lanaca peptida (APCL) u hidrolizatu, izračunat u odnosu na stepen hidrolize po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.3. Uočavamo da je prosečan stepen dužine peptidnih lanaca hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k značajno kraći nego u slučaju hidrolize tripsinom i termolizinom. Međusobni odnosi prosečnih dužina peptidnih lanaca hidrolizata su identični odnosima njihovih stepena hidrolize i stoga ih nije potrebno posebno analizirati.

Stepen hidrolize je značajan parametar karakterizacije hidrolizata, jer je u direktnoj vezi sa prosečnim stepenom dužine lanaca dobijenih peptida i molekulskom masom peptida, što igra važnu ulogu u ispoljenim svojstvima peptida (tehnološkim i biološkim) i njihovoj mogućoj primeni kao dodataka prehranbenim proizvodima. Međutim, hidrolizati sa sličnim ili istim DH i APCL mogu imati potpuno drugačiju raspodelu peptida različitih molekulskih masa, a samim tim i sasvim drugačija tehnološka i biološka svojstva. Enzimska hidroliza proteina ima veliki uticaj na tehnološka svojstva proteina (Diniz i Martin, 1997; Adebisi i sar., 2008).

4.1.1.2. Rastvorljivost

Rastvorljivost hidrolizata i rastvora WPC-a određivana je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.1. Sa slike 19 može se videti da svi ispitivani uzorci imaju veoma dobru rastvorljivost pri svim ispitivanim vrednostima pH što je u skladu sa predhodnim istraživanjima (Palatnik i sar., 2015; Sanmartín i sar., 2013). Očekivano je da rastvorljivost hidrolizata raste sa stepenom hidrolize (Diniz i Martin, 1997; Pokora i sar., 2013). Rastvorljivost je najznačajnije svojstvo peptida, određuje mogućnost

primene u prehrambenim proizvodima i u direktnoj je vezi sa hidrofobnošću, emulgujućim svojstvima, sposobnosti penjenja i sl. (Turgeon i sar., 1991; Walstra, 2003).



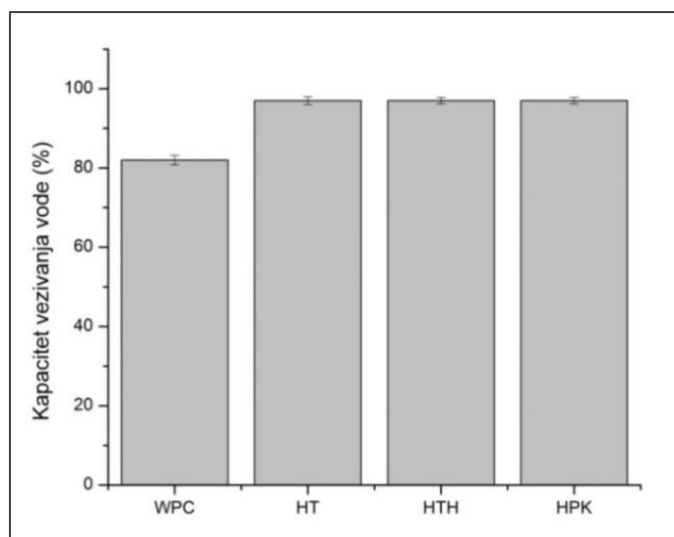
Slika 19. Stepen rastvorljivost nehidrolizovanog uzorka (WPC), hidrolizata dobijenog pomoću tripsina (HT), hidrolizata dobijenog pomoću termolizina (HTH) i hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k (HPK), u vodi, na sobnoj temperaturi pri različitim pH vrednostima.

Iz prikazanih rezultata izvodi se zaključak da su protein-voda interakcije izraženije u svim uzorcima u odnosu na protein-protein interakcije. Nehidrolizovani uzorak ima statistički značajno niži stepen rastvorljivosti u odnosu na hidrolizovane uzorke. Razlika u rastvorljivosti je najizraženija pri pH 4 kada WPC ima najnižu rastvorljivost (oko 85 %). Najviša rastvorljivost WPC ispoljava pri pH 6,0 i 8,0, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u radu Lassissi i sar. (2014) gde se prikazuje porast rastvorljivosti WPC pri pH 8,0. HT pokazuje statistički značajno bolju rastvorljivost u odnosu na WPC pri svim ispitivanim vrednostima pH. Najbolju rastvorljivost uzorak HT kao i WPC ima na pH 6,0 i 8,0. Hidrolizat dobijen pomoću termolizina ima statistički značajno bolju rastvorljivost od WPC-a na svim ispitivanim vrednostima pH, a od uzorka HT na pH 4,0 i 6,0, dok HT ima bolju rastvorljivost od HTH na pH 2,0, 8,0 i 10,0. HPK pokazuje najbolju rastvorljivost u odnosu na sve ispitivane uzorke na svim ispitivanim pH vrednostima. Rezultati pokazuju da pH ne utiče statistički značajno na rastvorljivost uzorka HPK s obzirom da je razlika u najvišoj i najnižoj rastvorljivosti 1,55 %. Kod

uzorka HTH razlika između najveće i najmanje rastvorljivosti je 2,98 %, kod uzorka HT 2,22 %, dok je kod nehidrolizovanog uzorka ta razlika 9,00 %.

4.1.1.2. Kapacitet vezivanja vode

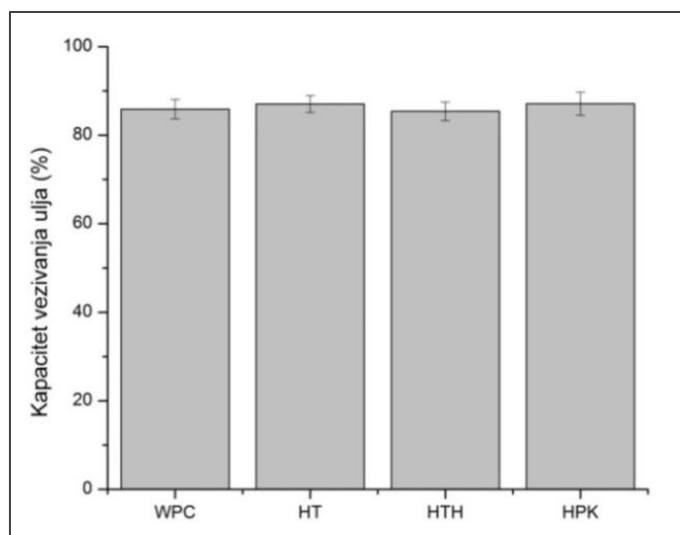
Kapacitet vezivanja vode je određivan po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.2. Na slici 20 može se videti da WPC ima statistički značajno ($p < 0,05$) manji kapacitet vezivanja vode od hidrolizata. Voda može biti „vezana“ od strane proteina i peptida na način da su molekuli vode fizički „zarobljeni“ između molekula peptida, ali uglavnom je voda vezana za peptide vodoničnim vezama (slika 2), tako da je sličnost kapaciteta vezivanja vode i rastvorljivosti očekivana. Kapacitet vezivanja vode je bitan parametar u karakterizaciji peptida i iz prikazanih rezultata možemo zaključiti da nehidrolizovani uzorak ima dobar kapacitet vezivanja vode, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u radu Cassiani i sar. (2013), a da se hidrolizom ovo svojstvo peptida značajno poboljšava i kapacitet vezivanja vode se povećava sa $82,0 \pm 1,2$ % koliko je za nehidrolizovani uzorak na čak $97,0 \pm 1,0$ % koliko je za analizirane hidrolizate. Ovakvo svojstvo hidrolizata može se pripisati povećanju dostupnosti polarnih jonizujućih grupa usled hidrolize.



Slika 20. Kapacitet vezivanja vode (%): nehidrolizovanog uzorka (WPC), hidrolizata dobijenog pomoću tripsina (HT), hidrolizata dobijenog pomoću termolizina (HTH) i hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k (HPK)

4.1.1.3. Kapacitet vezivanja ulja

Metoda određivanja kapaciteta vezivanja ulja opisana je u Odeljku 3.2.6.3. Na slici 21 se može uočiti da je kapacitet vezivanja ulja bez značajne razlike kod svih uzoraka. Kapacitet vezivanja ulja zajedno sa kapacitetom vezivanja vode i rastvorljivošću daje bitnu informaciju kod primene proteina surutke u proizvodima u kojima se tradicionalno koristi meso i proteini mesa. Peptidi sa dobrim kapacitetom vezivanja vode i ulja predstavljaju dobru sirovinu za zamenu mesnih proteina što omogućava spravljanje proizvoda unapređenih nutritivnih svojstava koji su ujedno pogodni za ishranu vegetarijanaca ili u slučaju surutkinih proteina laktovegetarijanaca. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da hidroliza nema statistički značajan uticaj na kapacitet vezivanja ulja proteina i peptida surutke

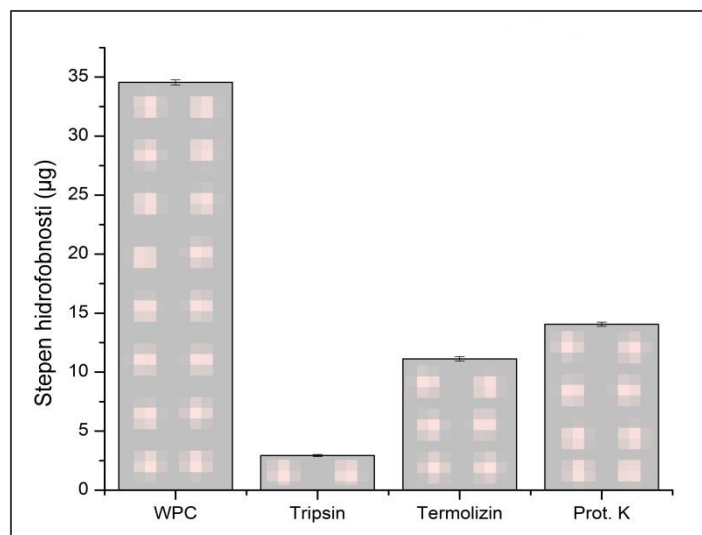


Slika 21. Kapacitet vezivanja ulja (%): nehidrolizovanog uzorka (WPC), hidrolizata dobijenog pomoću tripsina (HT), hidrolizata dobijenog pomoću termolizina (HTH) i hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k (HPK)

4.1.1.4. Hidrofobnost

Hidrofobnost uzoraka određivana je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.7. Hidrofobnost peptida i proteina u direktnoj je vezi sa rastvorljivošću molekula i kapacitetom vezivanja vode. Hidrofobniji rastvori imaju manju rastvorljivost i manji kapacitet vezivanja vode. Na slici 22 može se uočiti da je najhidrofobniji nehidrolizovani uzorak, koji ima najmanju rastvorljivost (slika 19) i kapacitet vezivanja vode (slika 20). Poznato

je da veličina molekula takođe igra značajnu ulogu pri ispoljavanju hidrofobnosti. Veliki molekuli su uglavnom hidrofobniji, jer su vodonične veze pretežno „zauzete“ stabilizacijom nativnog oblika molekula (Lassissi i sar., 2014). Ako uporedimo prosečnu dužinu peptidnih lanaca i ispoljenu hidrofobnost, videćemo da prikazani uzorci odstupaju od ovog pravila. Pored očekivano najizraženije hidrofobnosti nehidrolizovanog uzorka, sledeći najhidrofobniji uzorak je HPK koji ima najmanju prosečnu dužinu peptidnih lanaca, zatim hidrolizat dobijen pomoću termolizina, pa hidrolizat dobijen pomoću tripsina. Razlog ovakvog ponašanja rastvora hidrolizata treba tražiti u specifičnim mestima cepanja proteina karakterističnim za svaki enzim, ali i različitoj raspodeli peptida različitih molekulskih masa u hidrolizatima sa istom ili sličnom prosečnom vrednosti molekulskih masa odnosno dužinom peptidnih lanaca.



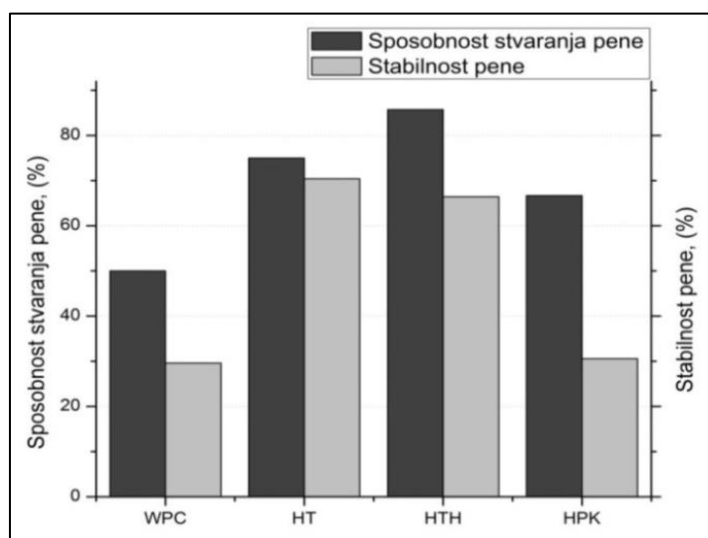
Slika 22. Stepen hidrofobnosti nehidrolizovanog uzorka (WPC), uzorka hidrolizovanog pomoću tripsina (Tripsin), uzorka hidrolizovanog pomoću termolizina (Termolizin) i uzorka hidrolizovanog pomoću proteinaze k (Prot. K) izražen preko količine veza ostvarenih sa reagensom bromfenol plavo

Rezultati pokazuju da hidroliza proteina surutke utiče na drastičan pad hidrofobnosti uzorka. Tako je nehidrolizovani uzorak čak 11,79 puta hidrofobniji od hidrolizata dobijenog pomoću tripsina, 3,10 puta hidrofobniji od hidrolizata dobijenog pomoću termolizina i 2,46 puta hidrofobniji od hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k. Važno je napomenuti, da nije uvek slučaj da se hidrolizom smanjuje hidrofobnost

peptida. Neki enzimi zbog cepanja molekula na specifičnim mestima utiču na povećanje stepena hidrofobnosti nakon hidrolize (Correa i sar., 2014).

4.1.1.4. Sposobnost stvaranja pene i stabilnost pene

Sposobnost stvaranja pene je kod nekih proizvoda poželjna, dok je kod nekih apsolutno nedopustiva. Proizvodi kao što su različiti kremovi i nadevi za torte i kolače kao i različita testa zahtevaju čvrstu i stabilnu penu. Prehrambeni proizvodi često podrazumevaju prevođenje „mokre“ pene u „suvu“ penu, kao što je slučaj kod hleba i drugog peciva, gelastih struktura poput gelastih dezerta i različitih kremova kao što je „marshmallow“ (Foegeding i Davis, 2011). Dobro penjenje nije uvek praćeno i dobrom postojanošću pene. Stabilnost pene i sposobnost stvaranja pene određivana je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.4.



Slika 23. Sposobnost stvaranja pene tokom 1 minuta intenzivnog mešanja i stabilnost pene nakon 30 minuta mirovanja na sobnoj temperaturi za 10 % (m/v) rastvor koncentrata proteina surutke (WPC), hidrolizata dobijenih pomoću: tripsina (HT), termolizina (HTH) i proteinaze k (HPK)

Sa slike 23 se može uočiti da WPC ima najlošiju sposobnost stvaranja pene, kao i stabilnost formirane pene, za razliku od pene koju stvaraju hidrolizati dobijeni pomoću tripsina i termolizina. Hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k ima bolju sposobnost stvaranja pene nego WPC, ali je pena veoma nepostojana. Hidrolizat dobijen pomoću termolizina ima najbolju sposobnost stvaranja pene (za 35,71 % bolju od WPC, za 19,04

bolju od HPK i za 10,71 % bolju od HT), a stabilnost pene je bolja u odnosu na uzorak WPC (za 36,86 %) i HPK (za 35,88 %), međutim hidrolizat dobijen pomoću tripsina iako ima nešto lošiju sposobnost stvaranja pene od HTH, ima znatno bolju postojanošću pene. Uzorak HT ima najbolju stabilnost pene u odnosu na sve testirane uzorke, pa tako ima za 4,03 % bolju stabilnost pene od HTH, za 39,85 % od HTK i za 40,83 % od WPC.

Na stabilnost pene kao i na stvaranje pene utiče dužina molekula peptida. U radu Lassissi i sar. (2014) prikazana je zavisnost sposobnosti stvaranja pene i stabilnosti pene od dužine molekula peptida. Najbolju stabilnost pene pokazala je frakcija hidrolizata sa peptidima između 5 i 10 kDa, dok je najlošiju stabilnost kao i sposobnost stvaranja pene pokazala najmanja frakcija hidrolizata (ispod 5 kDa). Slična zavisnost dokazana je i u ovom istraživanju gde hidrolizat sa najmanjom prosečnom dužinom lanaca peptida ima i najlošiju sposobnost stvaranja pene (HPK), a hidrolizat sa najvećom prosečnom dužinom lanaca peptida ima najbolju sposobnost stvaranja pene (HTH) pene, ali ne i stabilnost pene. Ovom gradacijom očekivalo bi se da najveći proteini (nehidrolizovani) imaju i najbolje karakteristike, ali to nije slučaj. Kao što suviše kratki molekuli nemaju sposobnost da stabilizuju sistem voda-vazduh, tako i suviše veliki molekuli imaju smanjenu mogućnost da doprinesu stabilizovanju ovog sistema (Lam i Nickerson 2015., Lassissi i sar. 2014). Koliko je stabilnost pene bitna opisano je u nekim prethodnim radovima, gde je prikazan postupak spravljanja tipičnog spužvastog peciva za torte „angel food cake“ sa proteinima surutke umesto proteina jaja. Testo je dostiglo željenu penastu strukturu i maksimalnu visinu, ali je tokom pečenja naglo splasnulo (DeVilbiss i sar., 1974; Pernell i sar., 2002). Isto se desilo i sa testom u kome je 25 % proteina jaja zamenjeno proteinima surutke (slika 24) (Berry i sar., 2009).



Slika 24. Presek testa za tortu napravljenog po tradicionalnom receptu sa proteinima jaja-levo i kombinacijom protina jaja i proteina surutke u odnosu 75 : 25 –desno (Berry i sar., 2009)

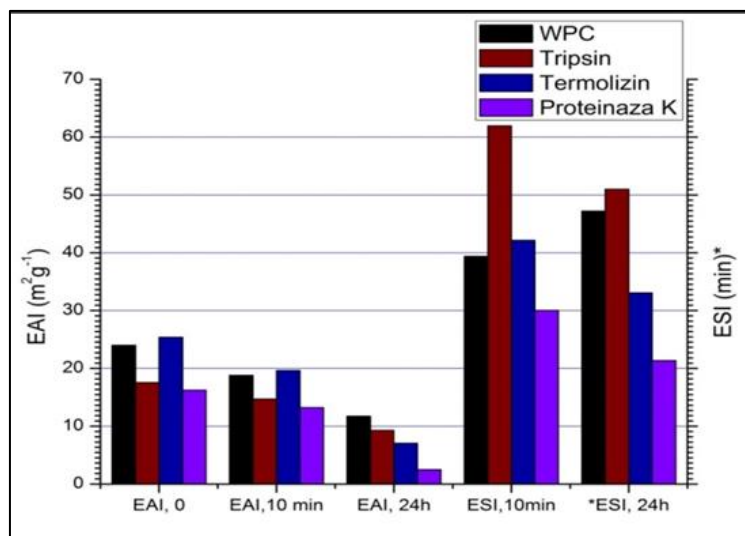
Iako HTH ima najbolju sposobnost stvaranja pene, HT je pokazao najbolju stabilnost pene i zato možemo reći da hidrolizat dobijen pomoću tripsina ima najbolje karakteristike kada je penjenje u pitanju i da je stoga najpogodniji kao dodatak u proizvode koji zahtevaju penastu strukturu.

4.1.1.5. Emulgujuća svojstva

Ono što je stvaranje pene za sistem vodeni rastvor – gas, to su emulgujuća svojstva za sistem vodeni rastvor – ulje. Emulgujuća svojstva predstavljaju sposobnost rastvora da se meša sa uljanom fazom. Što su svojstva emulgovanja izraženija, veća je sposobnost rastvora da se meša sa uljima. Ova osobina je bitna kod spravljanja prehrambenih proizvoda sa značajnim udelom ulja i gde je neophodno mešanje uljane i vodene faze kao što je slučaj kod majoneza kada su u pitanju prehrambeni proizvodi ili većina krema i losiona kada je u pitanju kozmetika. Kao i kod stvaranje pene, tako i kod emulgovanja, bitnu ulogu igra dužina peptidnih lanaca. Sa povećanjem stepena hidrolize smanjuje se prosečna dužina lanaca peptida. Ovo smanjenje utiče povoljno na emulgujuća svojstva kao i na stvaranje pene do određene granice kada ti peptidi postaju suviše mali da bi efikasno stabilizovali granicu faza (Souissi i sar., 2007). Suviše mali molekuli sa slabom amfipatskom sposobnošću (molekuli koji poseduju i hidrofobnu i hidrofilnu osobinu odnosno grupu) destabilizuju emulziju (Pokora i sar., 2013). Turgeon i sar. (1991) su pokazali da produžena hidroliza drastično redukuje emulgujuća svojstva proteinskih rastvora. Emulgujuća svojstva u ovom radu određivana su po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.5.

Na slici 25 može se videti da najbolji emulgujući indeks aktivnosti ima hidrolizat dobijen pomoću termolizina, nešto slabiji je EAI nehidrolizovanog uzorka, dok su HPK i HT približno jednake emulgujuće sposobnosti i čak 1,56 puta odnosno 1,45 puta manji od EAI uzorka HTH. Nakon 10 minuta EAI opada, ali međusobni odnos EAI uzoraka ostaje približno isti (HTH ima najviši EAI, nešto niži ima WPC, zatim sledi HT i najniži HPK). Nakon 24 h dolazi do drastičnog pada EAI kao i do promene odnosa indeksa među uzorcima. Tako je EAI nehidrolizovanog uzorka nakon 24 h opala za 51,04 %, uzorka HT za 47,09 %, uzorka HTH za 72,16 %, a uzorka HPK za 84,76 %. Kako je

EAI uzorka HTH opao za čak 72,16 %, on postaje drugi najlošiji uzorak. WPC pokazuje najviši EAI nakon 24 h, HT pokazuje 1,26 puta manji indeks, HTH 1,66 puta, a HPK 4,75 puta manji EAI od WPC. Međutim, kao i u slučaju pene, stabilnost emulzije igra bitniju ulogu od samog emulgjućeg indeksa aktivnosti. Pa tako, nakon 10 min najstabilniju emulziju ima HT sa ESI 1,57 puta većim od ESI uzorka WPC, 1,47 puta većim od ESI uzorka HTH i 2,06 puta većim ESI od uzorka HPK. Nakon 24h ESI svih uzoraka očekivano opada, međutim indeks ne opada istim intenzitetom kod svih uzoraka. Najstabilniju emulziju nakon 24h i dalje ima hidrolizat dobijen pomoću tripsina, a odmah posle njega po stabilnosti je WPC koji ima 1,08 puta manji ESI, zatim HTH sa 1,54 puta manjim ESI i HPK sa 2,39 puta manjim ESI od HT. Rezultati u ovom radu jasno ukazuju da najbolja emulgjuća svojstav ispoljava uzorak HT. Hidrolizat dobijen pomoću tripsina ima najoptimalniju dužinu lanaca peptida i najuspešnije stabilizuje emulziju, dok HPK ima suviše kratke peptide što nepovoljno utiče na emulgjuća svojstva i stabilnost pene. Slično je prikazano u radu Lassissi i sar. (2014) gde su ispitivana emulgjuća svojstva nehidrolizovanog uzorka i frakcija nakon hidrolize. Najbolja emulgjuća svojstva i najveću stabilnost emulzije imala je frakcija hidrolizata sa peptidima većim od 50 kDa. Manje frakcije (ispod 5 kDa, između 5 i 10 kDa, kao i između 10 i 50 kDa), pokazale su izuzetno malu sposobnost emulgovanja, manju nego nehidrolizovani uzorak. Navedeno u pomenutom radu potvrđuje zaključak da suviše kratki molekuli peptida nemaju mogućnost da stabilizuju granicu faza. Međutim, posmatranje sposobnosti emulgovanja i stvaranja pene samo preko prosečne dužine peptidnih lanaca i stepena hidrolize nije dovoljno. Kao što je prikazano na slici 3. određeni delovi proteina su odgovorni za stabilizaciju granice faza i kod velikih proteinskih lanaca ti delovi često zbog tercijarne i kvaterarne strukture proteina nisu u mogućnosti da reaguju sa površinom mehura ili uljane kapljice. Hidrolizom se neki od tih delova „oslobađaju“ i omogućavaju da deluju na granici faza što je slučaj kod hidrolize tripsinom, dok u nekim slučajevima dolazi do cepanja upravo tih delova ili hidrolize na takvom mestu da nastali peptid poprima formu pri kojoj mesto koje je bilo dostupno za stabilizaciju granice faza u molekupu proteina, sada to prestaje da bude, što je verovatno slučaj kod hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k i termolizina.



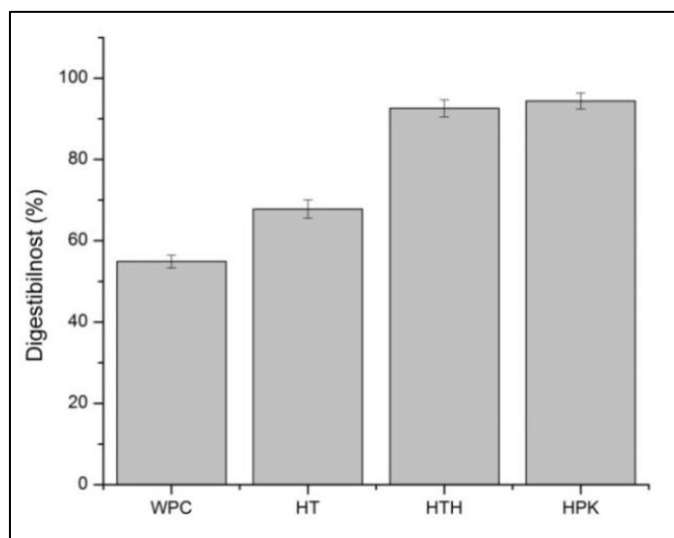
Slika 25. Emulgujući indeks aktivnosti (EAI) nakon 1 minuta intenzivnog vorteksiranja kao i 10 min i 24h nakon vorteksiranja i emulgujući indeks stabilnosti (ESI) 10 minuta i 24 h nakon 1 minuta vorteksiranja za 10 % (m/v) rastvor koncentrata proteina surutke (WPC), hidrolizata dobijenih pomoću tripsina (HT), termolizina (HTH) i proteinaze k (HPK)

4.1.1.6. Digestibilnost

Digestibilnost je svojstvo peptida koja ima ključnu ulogu u određivanju mogućnosti iskorišćenja bioaktivnih peptida kojima se proizvod obogaćuje. Određivanje stepena digestibilnosti izvedeno je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.6.5.

Sa slike 26 može se uočiti da najbolju digestibilnost imaju hidrolizati dobijeni pomoću proteinaze k i termolizina, dok najlošiju digestibilnost ima nehidrolizovani uzorak. Naime uzorak HPK pokazuje digestibilnost od oko 94 %, a uzorak HTH svega 2 % niži procenat. Uzorak HT pokazuje za 28 % slabiju digestibilnost, a WPC za oko 40 % slabiju digestibilnost u odnosu na uzorke HPK i HTH. Veliki uticaj na digestibilnost ima raspodela peptida različitih molekulskih masa po frakcijama, što je prikazano dalje u tekstu (tabela 9, Odeljak 4.1.2.). Kako HPK ima ubedljivo najzastupljenije frakcije ispod 3kDa ($62,96 \pm 2,82$ %), a HTH $53,59 \pm 2,19$ % tako i pokazuju najbolju digestibilnost. Mnogi istraživači su dokazali da peptidi malih molekulskih masa u koje spadaju peptidi molekulske mase ispod 3 kDa gotovo nepromenjeno prolaze gastrointestinalni sistem zadržavajući većinu svojih bioloških aktivnosti (Boza i sar.,

2000; Ismail i Gu, 2009). Takođe, ovako mali molekuli nemaju smetnje pri prolasku kroz zid tankog creva i lako dospevaju do ćelija gde ispoljavaju svoju bioaktivnost. Važno je napomenuti, da je ovo uprošćena metoda određivanja digestibilnosti koja se koristi u svrhu opisivanja tehnoloških svojstava peptida i simulira samo intestinalnu digestiju, dok se za opisivanje digestije kod određivanja bioloških karakteristika peptida koristi složenija metoda koja obuhvata i želučanu digestiju pepsinom.



Slika 26. Digestibilnost nehidrolizovanog rastvora proteina surutke (WPC) i hidrolizata dobijenog pomoću tripsina (HT) termolizina (HTH), proteinaze k (HPK)

4.1.1.7. Zaključak

Tehnološka svojstva proteina i hidrolizata surutke predstavljaju važno svojstvo sirovina radi mogućeg korišćenja u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Prikazana tehnološka svojstva jasno upućuju na mogućnost primene hidrolizata proteina surutke kao dodatka u prehrambene proizvode radi poboljšanja njihovih nutritivnih i tehnoloških karakteristika. Hidrolizati koji pokazuju najbolju sposobnost stvaranja pene i postojanosti pene predstavljaju dobre dodatke u proizvode poput različitih slatkih kremova koji se koriste u proizvodnji konditorskih proizvoda, kolača i torti, kao i u proizvodnji pekarskih proizvoda koji zahtevaju prozračnost i mekoću testa. Hidrolizati koji pokazuju dobra emulgujuća svojstva, kao i kapacitet vezivanja ulja predstavljaju dobre dodatke u različite dresinge za salate kao i masne kremove poput majoneza ili nekih slatkih masnih kremova koji se koriste u spravljanju konditorskih proizvoda.

Takođe, ova karakteristika omogućava njihovo korišćenje u formulaciji različitih krema i losiona u kozmetičkoj industriji. Proteini i peptidi sa izraženim kapacitetom vezivanja vode i ulja predstavljaju dobru zamenu za mesne proteine u prehrambenim proizvodima. Zbog svojih tehnoloških svojstava proteini surutke predstavljaju bolji dodatak u proizvodnji peciva poput biskvita i mafina. Naime, utvrđeno je da biljni proteini predstavljaju jeftin izvor proteina za obogaćivanje ove vrste proizvoda (Chavan i Kadam, 1993), međutim dodatak ovih proteina je ograničen na 10 – 12 % zbog nepovoljnog uticaja na teksturu proizvoda, što nije slučaj za proteine surutke (Jisha i Padmaja, 2011). Wronkowska i sar. (2014) utvrdili su granicu od 20 % dodatka proteina surutke u pekarske proizvode od pšenice i pšenica-raž, a da se ne naruši tekstura proizvoda. U tabeli 8 prikazana su neka od mogućih korišćenja hidrolizata i proteina surutke radi obogaćivanja i poboljšanja nutritivnih i tehnoloških svojstava proizvoda.

Tabela 8. Ispitivana i predložena primena proteina surutke kao dodatak u prehrambenim proizvodima

| Dodatak | Proizvod | Referenca |
|---|--|--|
| Nehidrolizovani proteini surutke | Mafin i biskvit od kasavinog brašna | Jisha i Padmaja (2011) |
| Koncentrat proteina kozje surutke | Dresing | Palatnik i sar. (2015) |
| Koncentrt proteina surutke WPC | Dodatak u pekarske proizvod od pšenice i pšenica-raž Dodatak u jogurt | Wronkowska i sar. (2015) Matumoto-Pintr i sar. (2011) |
| Hidrolizat dobijen pomoću tripsina | Mafin, biskvit, kora za torte | Krunić |
| Hidrolizat dobijen pomoću tripsina | Dresing | Krunić |
| Hidrolizat dobijen pomoću tripsina uz dodatak alginata | Inkapsulacija probiotika | Krunić |
| WPC uz dodatak alginata | Inkapsulacija probiotika | Krunić |

Dodatak nehidrolizovanih proteina surutke predstavljaju dobru zamenu za proteine jaja pri proizvodnji biskvita i mafina od brašna kasave čija je receptura prevashodno osmišljena u odnosu na potrebe osoba koje pate od gojaznosti i dijabetesa nekog vida

alergije na proteine jaja, kao i vegetarijance (Jisha i Padmaja, 2011). Takođe, proteini surutke ne samo da predstavljaju adekvatnu zamenu za proteine jaja, već utiču i na poboljšanje nutritivnih svojstava usled boljih nutritivnih svojstava proteina surutke u odnosu na proteine jaja

Rezultati dobijeni tokom ovog istraživanja pokazuju da bi hidrolizat dobijen pomoću tripsina bio odlična zamena za proteine jaja u pecivima poput biskvita, mafina, „vazdušastih“ kora za torte i sličnih pekarskih proizvoda usled dobrih svojstava penjenja i stabilnosti pene.

Koncentrat proteina kozje surutke moguće je koristiti u formulaciji dresinga za salate usled dobrih tehnoloških svojstava poput rastvorljivosti, kapaciteta vezivanja vode i ulja i emulgujućih svojstava (Palatnik i sar., 2015). Poredeći dobijene rezultate u ovom istraživanju sa svojstvima dresinga iz rada Palatnik i sar. (2015) može se zaključiti da bi uzorak sa najboljim svojstvima za primenu dresinga bio hidrolizat dobijen pomoću tripsina koji je pokazao najbolja emulgujuća svojstva, s obzirom da svi uzorci pokazuju odličnu rastvorljivost i kapacitet vezivanja vode i ulja.

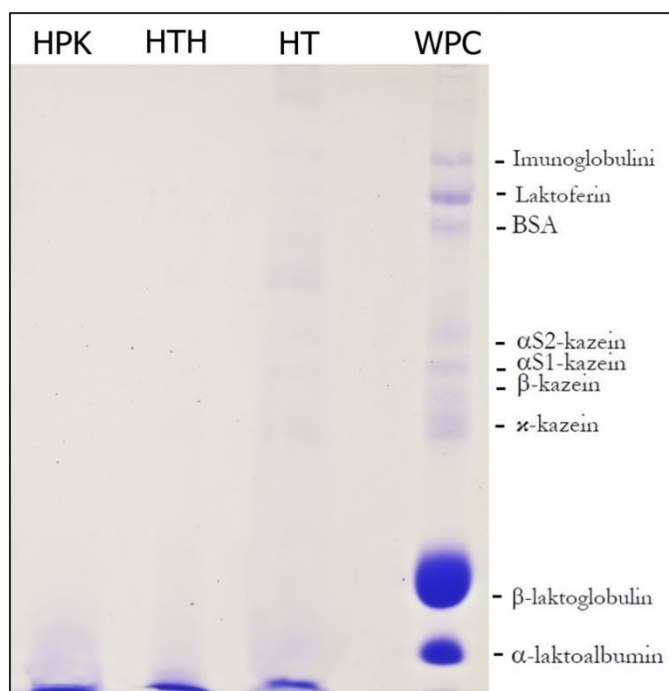
Proteini surutke su okarakterisani kao GRAS (*engl. Generally Recognized As Safe*) sirovine, a poseduju i dobra senzorna svojstva. Ovi proteini poseduju sposobnost geliranja, samoumrežavanja i vezivanja manjih molekula što ih čini dobrim matriksom za inkapsulaciju bioaktivnih komponenata ili probiotika (Li i Nie, 2016). Primena nehidrolizovanih proteina surutke i hidrolizata dobijenog pomoću tripsina kao matriksa za inkapsulaciju probiotskih bakterija opisana je u Odeljku 4.2.3.

Dodatak proteina surutke u jogurt u koncentraciji od 10 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina u mleku čija fermentacija se vrši, dovodi do poboljšanja nekih od svojstava jogurta poput teksture jogurta i smanjenja sinerezisa, dok dodatkom hidrolizovanih proteina surutke postignuti su još bolji rezultati (Matumoto-Pintr i sar., 2011).

4.1.2. Ultrafiltracija i biološka svojstva proteina surutke, hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija hidrolizata

Različiti enzimi poseduju sposobnost cepanja proteina na različitim mestima, što vodi različitosti u biološkim aktivnostima dobijenih peptida. Nekada se dešava da pojedini

enzimi tokom hidrolize znatno naruše prvobitnu bioaktivnost molekula, ali i da naknadnom hidrolizom nekim drugim enzimom dođe do povećanja te bioaktivnosti ne samo do prvobitnog nivoa, nego i preko njega (Ma i Xiong, 2009). U ovom radu prikazane su antioksidativne i antihipertenzivne aktivnosti nehidrolizovanih proteina surutke, tri vrste hidrolizata i njihovih frakcija pomoću tri metode, a sve sa ciljem izbora najadekvatnijeg uzorka za dodatak u prehrambeni proizvod radi povećanja funkcionalnosti istog.



Slika 27. Promena sastava rastvora 10 % (m/v) proteina surutke-WPC nakon hidrolize tripsinom-HT, termolizinom-HTH i proteinazon k-HPK.

Nakon jednočasovne hidrolize WPC-a i inaktivacije enzima, hidrolizati i nehidrolizovani uzorak podvrgnuti su procesu razdvajanja peptida na osnovu molekulske mase metodom elektroforeze. Elektroforeza je vršena po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.8 Na slici 27 prikazani su rezultati elektroforeze. Na slici se jasno vidi da je hidroliza pomoću sva tri korišćena enzima dovela do drastične redukcije molekulske mase proteina prisutnih u uzorku WPC. Uočene karakteristične trake kod uzorka WPC hidrolizovane su na manje molekule peptida i nisu uočljive kod uzoraka HT, HTH i HPK.

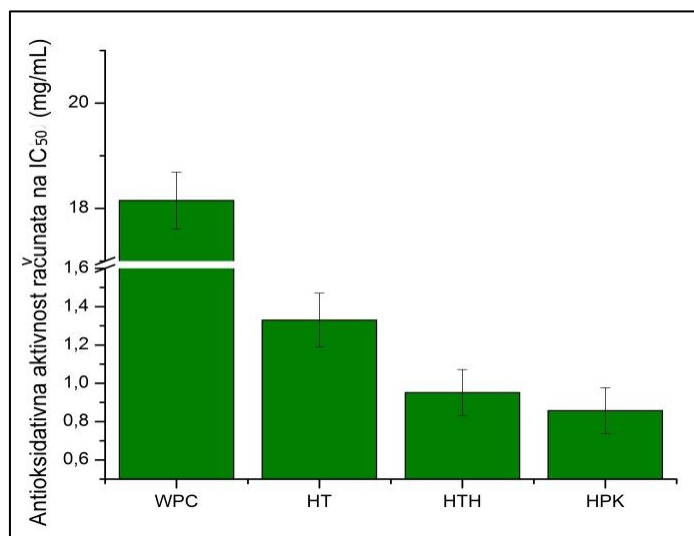
Hidrolizovani i nehidrolizovan uzorak dalje su podvrgnuti procesu ultrafiltracije sa ciljem određivanja udela peptidnih frakcija, kao i određivanja bioaktivnosti datih ultrafiltracionih frakcija. Ultrafiltracija uzorka vršena je po proceduri opisanoj u Odeljku 3.2.7. U tabeli 9 možemo uočiti značajan porast peptidnih frakcija malih molekularnih masa u odnosu na nehidrolizovani uzorak. U nehidrolizovanom uzorku dominantna je frakcija molekula molekulske mase iznad 10 kDa u koju spada preko 90 % molekula. Frakcija molekulske mase između 3 i 10 kDa obuhvata oko 5 % peptida, a frakcija molekulske mase ispod 3 kDa prisutna je u tragovima. Hidrolizom pomoću tripsina sadržaj frakcije koja obuhvata peptide najmanje molekulske mase raste na $31,06 \pm 2,11$ %, udeo frakcije koja sadrži peptide od 3 do 10 kDa povećao se 4,32 puta, dok se udeo frakcije sa peptidima od 10 do 30 kDa smanjio 2,83 puta. Frakcija koja sadrži proteine molekulske mase iznad 30 kDa idalje zauzima visok procenat u ukupnom udelu od skoro 30%. Hidrolizom proteina termolizinom sadržaj frakcije sa molekulima molekulske mase iznad 30 kDa umanjen je 2,55 puta u odnosu na nehidrolizovan uzorak, dok udeo frakcije sa peptidima molekulske mase ispod 3 kDa u ovom slučaju čini $53,59 \pm 2,19$ % od ukupne mase peptida. Hidrolizom proteina surutke proteinazom k značajno se povećava sadržaj frakcije sa peptidima molekulske mase ispod 3 kDa ($62,96 \pm 2,82$ %), a zajedno sa frakcijom koja sadrži peptide molekulske mase od 3 do 10 kDa čini oko 82 % od ukupne mase peptida. Sadržaj peptida većih od 10 kDa sa oko 95 % u nehidrolizovanom uzorku, hidrolizom pomoću proteinaze k smanjuje se na svega oko 19 %.

Tabela 9 Distribucija peptida i proteina po frakcijama na osnovu molekulske mase u nehidrolizovanom uzorku (WPC) i hidrolizatima dobijenim pomoću tripsina (HT), termolizina (HTH) i proteinaze k (HPK) dobijena nakon ultrafiltracije.

| Distribucija po frakcijama | WPC | HT | HTH | HPK |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| > 30 kDa, % | $47,86 \pm 2,86$ | $29,95 \pm 1,99$ | $18,75 \pm 1,19$ | $12,50 \pm 1,31$ |
| 10-30 kDa, % | $46,87 \pm 2,33$ | $16,55 \pm 1,89$ | $7,54 \pm 1,11$ | $6,90 \pm 1,22$ |
| 3-10 kDa, % | $5,02 \pm 1,01$ | $22,44 \pm 1,88$ | $20,13 \pm 1,18$ | $17,77 \pm 1,03$ |
| < 3 kDa, % | $0,20 \pm 0,12$ | $31,06 \pm 2,11$ | $53,59 \pm 2,19$ | $62,96 \pm 2,82$ |

4.1.2.1. Antioksidativna aktivnost hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija

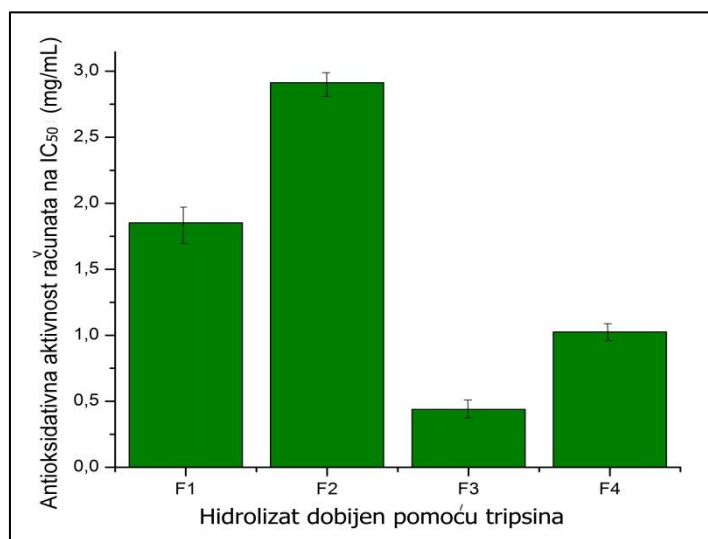
Antioksidativni kapaciteti frakcija, hidrolizata kao i nehidrolizovanog uzorka određivani su po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.9.2., a u cilju određivanja frakcije koja ima najbolje karakteristike kao dodatak prehrbenom proizvodu radi postizanja kriterijuma funkcionalne hrane. ABTS reagens je široko korišćen reagens za ispitivanje antioksidativnih svojstava najviše iz razloga što reaguje i sa lipofilnim i sa hidrofilnim antioksidansima (Arno, 2000).



Slika 28. Antioksidativna aktivnost određivana pomoću ABTS reagensa, računata na IC₅₀ za: nehidrolizovani uzorak WPC, hidrolizat dobijen pomoću tripsina HT, termolizina HTH i proteinaze k

Na slici 28 prikazan je antioksidativni kapacitet nehidrolizovanog uzorka i hidrolizata. Jasno se uočava statistički značajan ($p < 0,05$) pad količine peptida koja je potrebna da se inaktivira 50 % prsutnog ABTS reagensa kod uzoraka koji su hidrolizovani, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Dryakova i sar., 2010; Correa i sar., 2014; O'Keeffe i FitzGerald 2014; Salami i sar. 2010). Nehidrolizovani uzorak poseduje IC₅₀ = 18,15 ± 0,54 mg/mL, dok IC₅₀ kod hidrolizata ne prelazi 1,33 ± 0,14 mg/mL. Hidrolizat dobijen pomoću tripsina iako pokazuje najmanji antioksidativni kapacitet u odnosu na hidrolizate ipak poseduje izuzetno visok antioksidativni kapacitet (IC₅₀ = 1,33 ± 0,14 mg/mL), čak 13,65 puta viši od nehidrolizovanog uzorka. Slaba antioksidativna svojstva hidrolizata dobijenog pomoću tripsina u odnosu na ostale hidrolizate prikazana su i u radu Salami i sar. (2010), gde je takav rezultat objašnjen

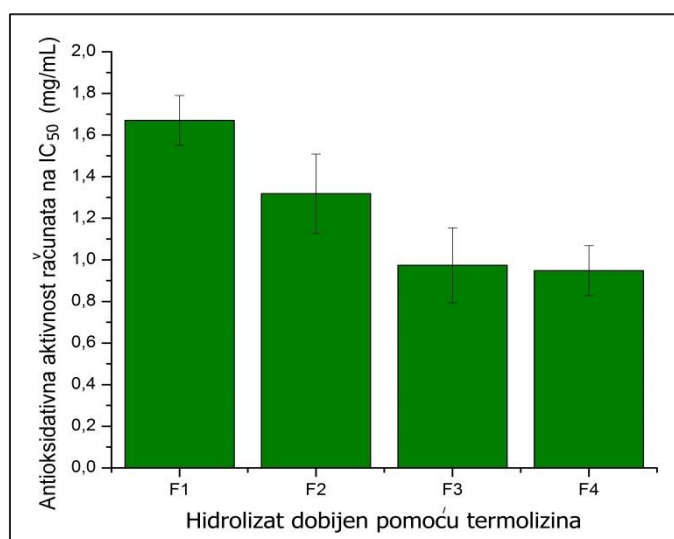
specifičnim mestom cepanja proteina koje je karakteristično za tripsin. Naime, tripsin proteine cepa na takvim mestima gde amino kiseline sa baznim grupom kao što su Lys i Arg ostaju na C kraju peptida, što loše utiče na antioksidativni kapacitet (Antal i sar., 2001). Antal i sar. (2001) kao i Salami i sar. (2010) tvrde da C kraj peptida ima ključnu ulogu u ispoljavanju antioksidativnih svojstava molekula. Hidrolizat dobijen pomoću termolizina poseduje značajno viši (1,40 puta viši) antioksidativni kapacitet od hidrolizata dobijenog pomoću tripsina i iznosi $IC_{50} = 0,9621 \pm 0,12$ mg/ml. Uzorak HPK pokazuje najbolja antioksidativna svojstva i poseduje najviši antioksidativni kapacitet od svih ispitivanih uzoraka ($IC_{50} = 0,8577 \pm 0,12$ mg/ml) što je blago više od HTH, 1,55 puta viši kapacitet od HT i čak 21,16 puta viši antioksidativni kapacitet u odnosu na nehidrolizovani uzorak. To je posledica specifičnog mesta na kome proteinaza k hidrolizuje peptidne veze (koje čine karboksilne grupe alifaticnih i aromaticnih aminokiselina sa amino grupama drugih aminokiselina).



Slika 29. Antioksidativna aktivnost određivana pomoću ABTS reagensa, računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulske mase većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulske mase između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulske mase između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulske mase manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću tripsina.

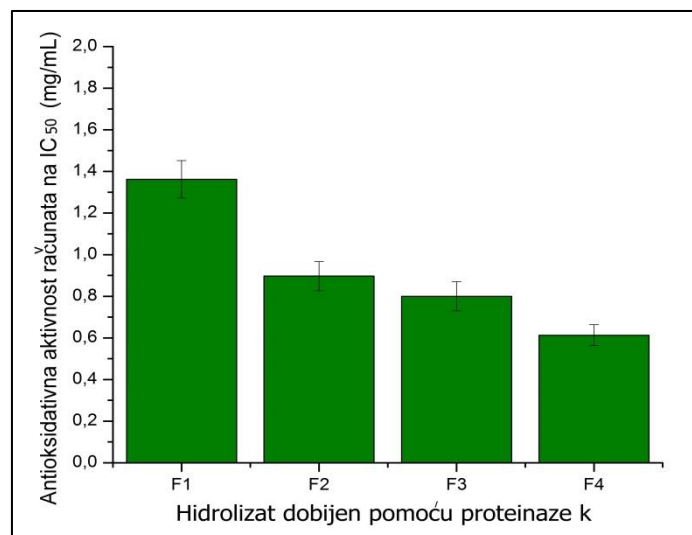
Na slici 29 prikazane su antioksidativni kapaciteti frakcija hidrolizata dobijenog pomoću tripsina. Frakcija F2 poseduje najlošiji antioksidativni kapacitet ($IC_{50} = 2,913 \pm 0,81$ mg/mL), dok frakcija F1 poseduje statistički značajno viši antioksidativni

kapacitet, 1,57 puta viši u poređenju sa frakcijom F2. Frakcija F3 poseduje najviši antioksidativni kapacitet u odnosu na ostale frakcije hidrolizata dobijenog pomoću tripsina ($IC_{50} = 0,438 \pm 0,11$ mg/mL), 2,34 puta je bolja od frakcije F4, 4,23 puta bolja od frakcije F1, a čak 6,65 puta bolja od najlošije frakcije F2. Ova frakcija obuhvata $22,44 \pm 1,88$ % od ukupnog sadržaja peptida u hidrolizatu, dok sledeća frakcija sa najboljim antioksidativnim kapacitetom F4 ($IC_{50} = 1,025 \pm 0,18$ mg/mL), obuhvata $31,06 \pm 2,11$ % (tabela 9) od ukupnih peptida u hidrolizatu. Razlike u antioksidativnim kapacitetima peptidnih frakcija su značajne, što navodi na zaključak da eliminisanjem neke frakcije iz hidrolizata dovodi do značajnih promena u ukupnom antioksidativnom kapacitetu hidrolizata. Poboljšanje karakteristika hidrolizata dobijenog pomoću tripsina moguće je odbacivanjem frakcija iznad 10 kDa čime preostaje preko 50 % ukupnih peptida, odnosno frakcije F3 i F4 sa najboljim antioksidativnim karakteristikama. Dodatnom ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 3 kDa i odbacivanjem permeata (frakcija F4), preostali retentat poseduje drastično bolje karakteristike. Ovako ultrafiltriran hidrolizat poseduje 3,04 puta viši antioksidativni kapacitet u odnosu na netretiran hidrolizat, ali poseduje i svega $22,44 \pm 1,88$ % peptida u odnosu na ukupni hidrolizat.



Slika 30. Antioksidativna aktivnost određivana pomoću ABTS reagensa, računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću termolizina.

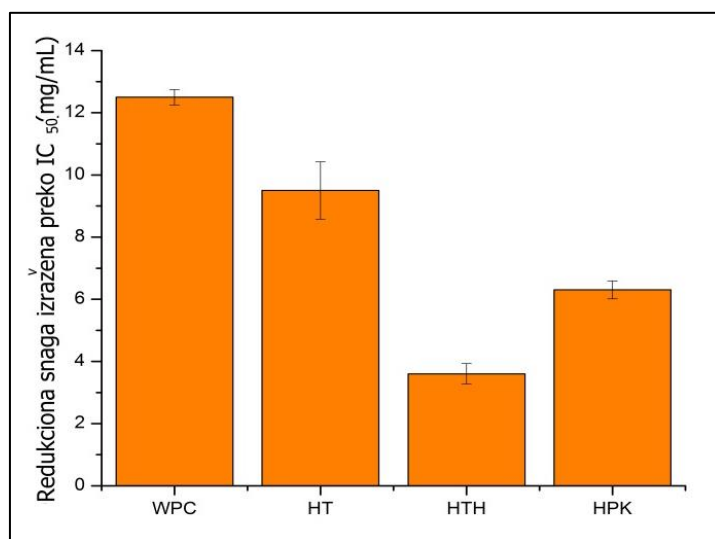
Na slici 30 prikazani su antioksidativni kapaciteti frakcija hidrolizata dobijenog pomoću termolizina. Kod ovog hidrolizata, za razliku od hidrolizata dobijenog pomoću tripsina, nema drastičnih razlika u antioksidativnom kapacitetu pojedinačnih frakcija. Frakcije ispod 10 kDa pokazuju veoma bliske vrednosti antioksidativnog kapaciteta statistički ($p < 0,05$) bez značajnih razlika. Najbolja frakcija F4 ($IC_{50} = 0,948 \pm 0,12$ mg/mL) je samo 1,74 puta bolja od najlošije frakcije F1 ($IC_{50} = 1,670 \pm 0,20$ mg/mL) i 1,39 puta bolja od frakcije F2 ($IC_{50} = 1,318 \pm 0,18$ mg/mL). U slučaju hidrolizata dobijenog pomoću termolizina, zbog bliskih vrednosti IC_{50} svih frakcija, ultrafiltracionom metodom nije moguće značajno poboljšanje antioksidativnog kapaciteta hidrolizata. Bliske vrednosti antioksidativnih kapaciteta frakcija hidrolizata dobijenog pomoću termolizina prikazane su u radu Salami i sar. (2010).



Slika 31. Antioksidativna aktivnost određivana pomoću ABTS reagensa, računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k.

Na slici 31 prikazani su antioksidativni kapaciteti frakcija hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k i može se uočiti da sve četiri frakcije pokazuju veoma visok antioksidativni kapacitet. Međusobni odnos vrednosti IC_{50} frakcija hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k veoma podseća na međusobni odnos frakcija hidrolizata dobijenog pomoću termolizina, s tim što su vrednosti značajno niže, odnosno antioksidativni kapacitet viši.

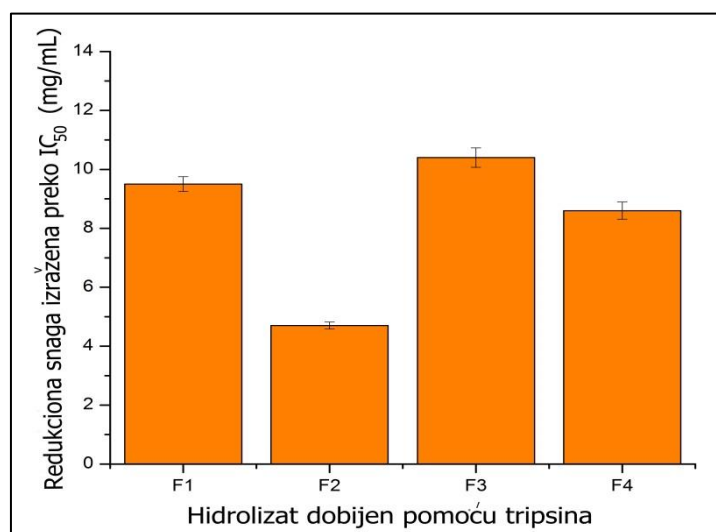
Frakcija F2 ($IC_{50} = 1,362 \pm 0,09$ mg/mL) ima statistički značajno viši antioksidativni kapacitet od frakcije F1 od koje je 1,52 puta bolja, dok frakcija F4 pokazuje 1,45 odnosno 1,30 puta viši antioksidativni kapacitet od frakcije F2 ($IC_{50} = 0,897 \pm 0,07$ mg/mL), odnosno F3 ($IC_{50} = 0,800 \pm 0,07$ mg/mL), koje imaju statistički vrlo bliske vrednosti bez značajne razlike. Najbolja frakcija F4 ($IC_{50} = 0,613 \pm 0,05$ mg/mL) čini čak $62,96 \pm 2,82$ % od ukupnog sadržaja peptida u hidrolizatu dobijenom pomoću proteinaze k, pa je i njen uticaj na antioksidativni kapacitet hidrolizata najdominantniji. Pošto sve frakcije hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k, kao i ukupan hidrolizat, pokazuju visok antioksidativni kapacitet, ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 3 kDa, statistički ne povećavamo značajno antioksidativni kapacitet uzorka, ali ono što je važno napomenuti jeste da na ovaj način dobijama peptide čija molekulska masa ne prelazi 3 kDa, a za njih odnosno za peptide malih molekulskih masa je karakteristično da ne podležu procesu digestije u želucu i da u velikom procentu u intestinalni sistem dospevaju nepromenjene strukture i bioaktivnosti (Boza i sar., 2000; Ismail i Gu, 2009).



Slika 32. Redukciona snaga računata na IC_{50} za: nehidrolizovani uzorak WPC, hidrolizat dobijen pomoću: tripsina (HT), termolizina (HTH) i proteinaze k (HPK)

Redukciona snaga uzorka određivana je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.9.3. Na slici 32 prikazana je redukciona snaga nehidrolizovanog uzorka i hidrolizata. FRAP se često koristi za određivanje sposobnosti antioksidanta da doniraju elektron ili vodonik, a neka istraživanja su pokazala da postoji direktna veza između antioksidativne sposobnosti i

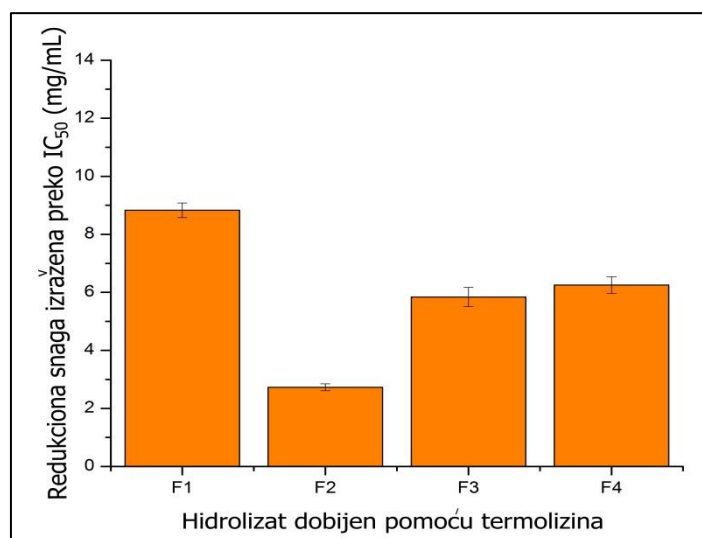
redukcijske snage peptida (Li i sar., 2010; Tang i sar., 2012). U slučaju redukcijske snage kao i u slučaju antioksidativnih karakteristika određivanih ABTS metodom, hidroliza značajno doprinosi smanjenju IC_{50} vrednosti uzoraka. Nehidrolizovani uzorak (WPC) poseduje značajno nižu redukcijsku snagu u odnosu na hidrolizate, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima (He i sar. 2013 Salami i sar. 2010). Uzorak HT poseduje znatno višu redukcijsku snagu u odnosu na nehidrolizovani uzorak, dok HPK poseduje znatno višu redukcijsku snagu u odnosu na hidrolizat dobijen pomoću tripsina. Najvišu redukcijsku snagu poseduje hidrolizat dobijen pomoću termolizina koji je u eksperimentu sa ABTS radikalom pokazao drugu najvišu antioksidativnu karakteristiku, odmah posle uzorka HPK koji je u eksperimentu određivanja redukcijske snage pokazao drugu najvišu redukcijsku snagu. Smanjena redukcijska snaga hidrolizata u odnosu na nehidrolizovani uzorak je u skladu sa istraživanjima He i sar. (2013) gde je opisano znatno smanjenje redukcijske moći proteina uljane repice nakon hidrolize proteinazom k, termolizinom, kao i enzimima koji nisu korišćeni u ovom istraživanju.



Slika 33. Redukcijska snaga računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekularnih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekularnih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekularnih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekularnih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću tripsina.

Ukupnu redukcijsku snagu hidrolizata čine redukcijske snage njegovih frakcija. Tako, kod hidrolizata dobijenog pomoću tripsina, najvišu redukcijsku snagu pokazuje frakcija

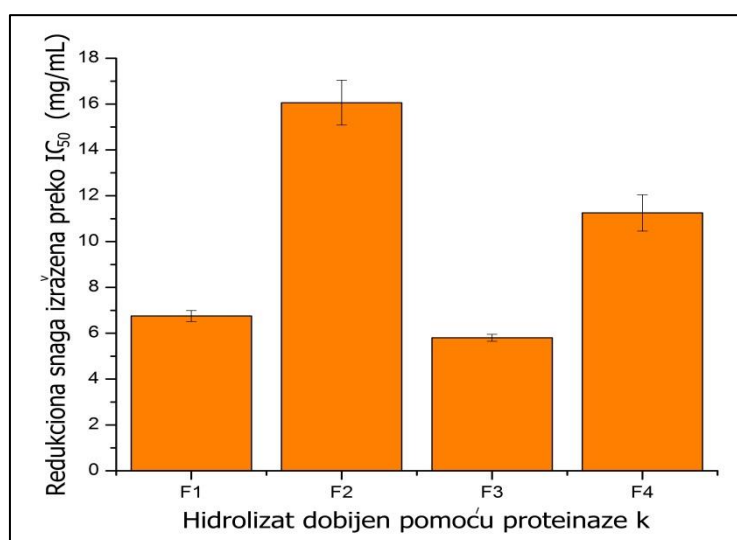
F2 i to ($IC_{50} = 4,70 \pm 0,12$ mg/mL) (slika 30). Ovo međutim ne prati antioksidativne karakteristike dobijene ABTS metodom gde ova frakcija pokazuje najslabije karakteristike. Sledeća frakcija sa najboljim karakteristikama je frakcija sa peptidima molekulske mase ispod 3 kDa od koje je frakcija F2 1,83 puta bolja, zatim frakcija F1, a najlošije karakteristike poseduje frakcija F3 koja je 2,21 put lošija od frakcije F2. Frakcija sa najnižom redukcionom snagom je ujedno frakcija koja je pokazala najbolje antioksidativne karakteristike u eksperimentu sa ABTS reagensom. Sve navedeno ukazuje na to da izdvajanje najbolje frakcije kod hidrolizata dobijenog pomoću tripsina zahteva dvostepenu ultrafiltraciju gde bi se membranom veličine pora 30 kDa odstranila frakcija F1, a zatim membranom veličine pora 10 kDa odstranile frakcije F3 i F4. Na taj način preostala bi samo frakcija F2 sa peptidima molekulskih masa između 30 i 10 kDa, koja je pokazala najbolju redukcionu snagu.



Slika 34. Redukciona snaga računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću termolizina

U slučaju hidrolizata dobijenog pomoću termolizina najbolja frakcija je ponovo F2 sa $IC_{50} = 2,73 \pm 0,12$ mg/mL (slika 34), kao i u slučaju hidrolizata dobijenog pomoću tripsina. Sledeća frakcija sa najvišom redukcionom snagom je frakcija F3 sa $IC_{50} = 5,84 \pm 0,33$ mg/mL, a frakcija F4 pokazuje blago nižu redukcionu snagu od frakcije F3 sa

$IC_{50} = 6,25 \pm 0,29$ mg/mL. Frakcije F3 i F4 pokazuju vrlo bliske vrednosti redukcionne snage, baš kao što pokazuju bliske vrednosti antioksidativnih karakteristika u testu sa ABTS reagensom. Najlošije karakteristike pokazuje frakcija F1 ($IC_{50} = 8,83 \pm 0,25$ mg/mL). Frakcija F1 je ujedno i frakcija koja pokazuje najlošije antioksidativne karakteristike u eksperimentu sa ABTS radikalom (slika 25). U slučaju hidrolizata dobijenog pomoću termolizina primećuje se veće poklapanje antioksidativnih karakterisitka dva različita testa (ABTS i FRAP) nego što je to slučaj kod hidrolizata dobijenog pomoću tripsina. Kao u slučaju hidrolizata dobijenog pomoću tripsina i ovdje je neophodna identična dvostepenu ultrafiltraciju gde bi se membranom veličine pora 30 kDa odstranila frakcija F1, a zatim membranom veličine pora 10 kDa odstranile frakcije sa peptidima molekulskih masa ispod 10 kDa, tako bi preostala frakcija F2 sa peptidima molekulskih masa između 30 i 10 kDa, koja je pokazala najbolju redukcionu moć.



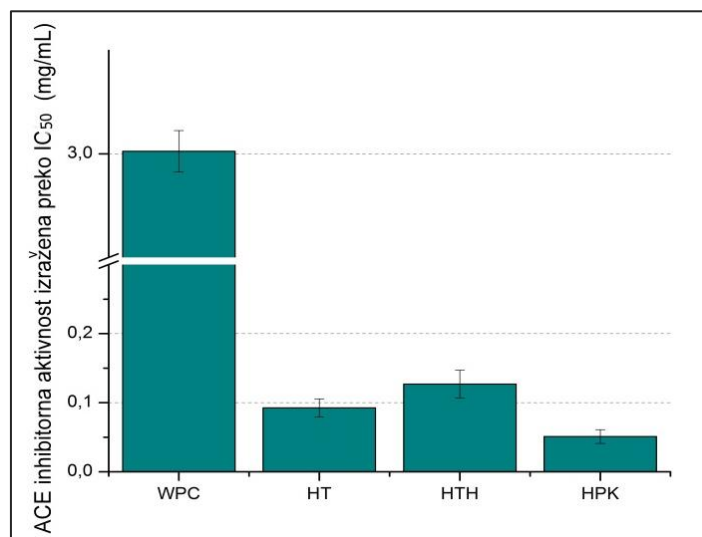
Slika 35. Redukciona snaga računata na IC_{50} za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k

Uzorak HPK koji pokazuje najbolje karakteristike u eksperimentu sa ABTS radikalom u slučaju FRAP testa pokazuje drugu po redu najvišu redukcionu snagu, posle uzorka HTH. Hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k pokazuje najveće razlike u vrednostima redukcionne snage po frakcijama (slika 35). Najlošije karakteristike pokazuje frakcija F2

sa čak $IC_{50} = 16,60 \pm 0,98$ mg/mL i predstavlja jedinu frakciju čija IC_{50} premašuje vrednost IC_{50} nehidrolizovanog uzorka (nehidrolizovani uzorak pokazuje 1,28 puta višu redukcionu snagu od F2, a HPK 2,63 puta višu vrednost). Međutim ova frakcija procentualno čini najmanji udeo u ukupnim peptidima, svega $6,90 \pm 1,22$ % (tabela 9) pa tako i njen uticaj na ukupnu vrednost redukcione snage hidrolizata nije značajan. Frakcija F4 koja čini najveći udeo od $62,96 \pm 2,82$ % poseduje značajno višu redukcionu snagu ($IC_{50} = 11,25 \pm 0,79$ mg/mL), ali i dalje veoma lošu, 1,94 puta lošiju od najbolje frakcije i 1,66 puta lošiju od frakcije F1. Frakcije F1 i F3 imaju bliske vrednosti redukcione snage, a značajno više od frakcije F4 i F2. Najbolje karakteristike pokazuje frakcija F3 koja čini oko 18 % od ukupnih peptida. U slučaju hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću proteinaze k nijedna frakcija ne pokazuje značajno bolju redukcionu snagu od hidrolizata stoga se izvodi zaključak da ne postoji opravdanost postupka ultrafiltracije kada je redukciona snaga u pitanju.

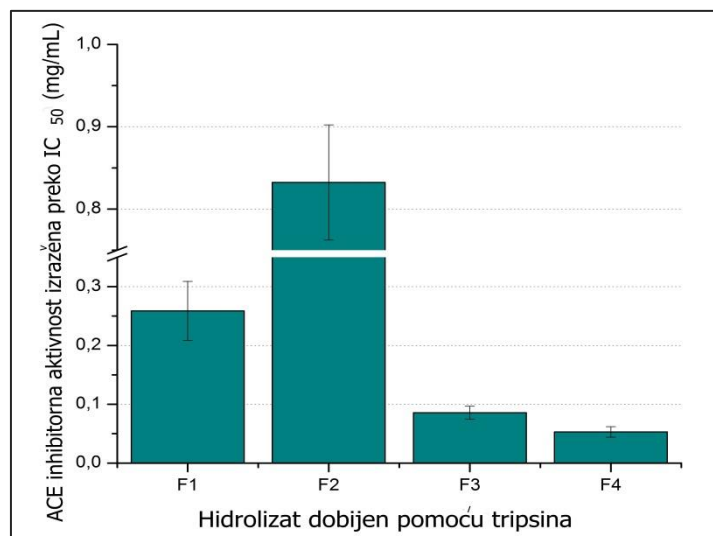
4.1.2.2. ACE inhibitorna aktivnost hidrolizata i ultrafiltracionih frakcija

ACE inhibitorna aktivnost određivana je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.10. Na slici 36 prikazane su vrednosti ACE inhibitorne aktivnosti nehidrolizovanog uzorka i hidrolizata.



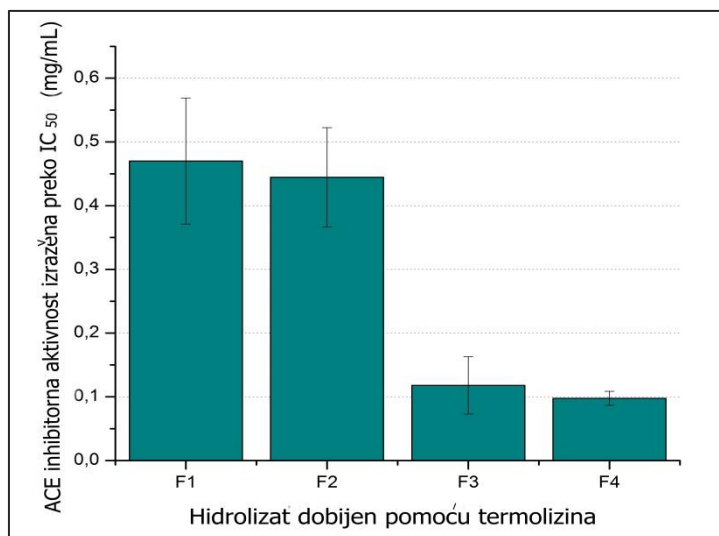
Slika 36. ACE inhibitorna aktivnost računata na IC_{50} za nehidrolizovani uzorak (WPC) i hidrolizate dobijen pomoću: tripsina (HT), termolizina (HTH) i proteinaze k (HPK)

ACE inhibitorna aktivnost nehidrolizovanih proteina surutke je najslabija i iznosi čak $IC_{50} = 3,05 \pm 0,04$ mg/mL. Hidroliza proteina surutke sa bilo kojim od tri korišćena enzima statistički značajno ($p < 0,05$) povećava ACE inhibitornu aktivnost uzorka. Hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k pokazuje čak 59,80 puta višu ACE inhibitornu aktivnost od nehidrolizovanog uzorka, hidrolizat dobijen pomoću tripsina 32,97 puta višu aktivnost, a hidrolizat dobijen pomoću termolizina 24,02 puta višu ACE inhibitornu aktivnost od nehidrolizovanog uzorka. Hidrolizati dobijeni pomoću tripsina i termolizina imaju bliske vrednosti ACE inhibitorne aktivnosti, dok hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$) bolju aktivnost od svih testiranih uzoraka, što je u skladu sa rezultatima prikazanim u radu Hernandez–Ledesma i sar. (2002). Naime, uzorak HPK ima 1,81 puta bolju ACE inhibitornu aktivnost od uzorka HT, 2,49 puta bolju aktivnost od HTH i kao što je prethodno navedeno čak 59,80 puta bolju aktivnost od nehidrolizovanog uzorka. Ako uporedimo prosečnu dužinu peptidnih lanaca, odnosno stepen hidrolize sa ACE inhibitornom aktivnošću, uočavamo da postoji direktna veza ova dva faktora. Naime, sa povećanjem stepena hidrolize i smanjenjem prosečne dužine peptidnih lanaca, povećava se i ACE inhibitorna aktivnost uzorka, što je u saglasnosti sa tvrdnjom da su nosioci ACE inhibitorne aktivnosti upravo peptidi molekulske mase ispod 3 kDa (Hernandez–Ledesma i sar., 2011; O’Loughlin i sar., 2014; Uluko i sar., 2014). U prilog ovoj tvrdnji govori i rezultat da hidrolizat koji pokazuje najvišu ACE inhibitornu aktivnost sadrži čak $62,96 \pm 2,82$ % peptida molekulske mase ispod 3 kDa (HPK). Takođe, važno je napomenuti da povećanje stepena hidrolize ne vodi nužno povećanju bioaktivnosti uzorka. Ukoliko hidroliza traje previše dugo, dolazi do razgradnje i nastalih peptida koji poseduju određenu bioaktivnost, a time i do smanjenja bioaktivnosti uzorka (Hernandez–Ledesma i sar., 2002).



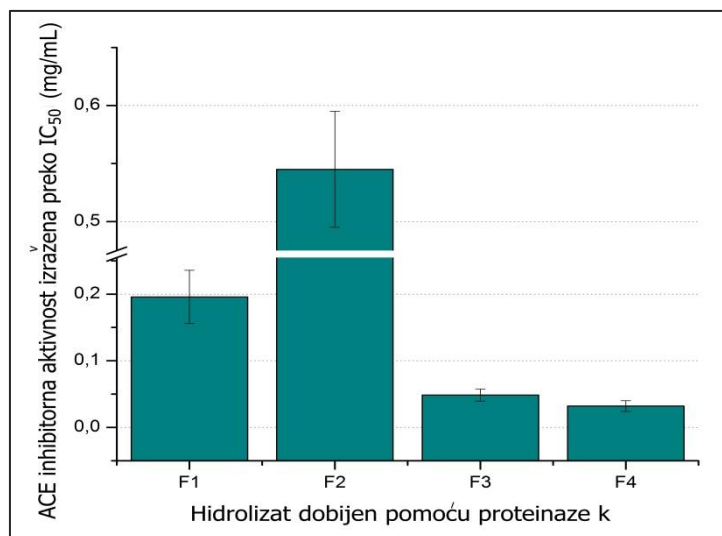
Slika 37. ACE inhibitorna aktivnost računata na IC₅₀ za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina

Na slici 37 prikazana je ACE inhibitorna aktivnost ultrafiltracionih frakcija hidrolizata dobijenog pomoću tripsina. Najizraženiju ACE inhibitornu aktivnost pokazala je frakcija F4 (IC₅₀ = 0,053 ± 0,0089 mg/mL), što je u skladu sa prethodno navedenom tvrdnjom da su peptidi molekulske mase ispod 3 kDa najčešće nosioci ACE inhibitorne aktivnosti. Frakcija F4 je ujedno i najdominantnija frakcija sa oko 30 % ukupnih peptida. Frakcija F3 je sledeća najbolja frakcija čija je ACE inhibitorna aktivnost 1,62 puta (IC₅₀ = 0,0857 ± 0,011 mg/mL) slabija od aktivnosti F4 frakcije, ali je statistički značajno bolja od frakcija F1 i F2. Frakcija F1 poseduje ACE inhibitornu aktivnost (IC₅₀ = 0,2588 ± 0,05 mg/mL) koja je 4,88 puta slabija od aktivnosti frakcije F4, 3,02 puta slabija od frakcije F3, ali 3,22 puta bolja od frakcije F2 koja je ujedno i najmanje zastupljena frakcija sa oko 17 % od ukupnih peptida. Najlošija frakcija, F2 je čak 15,70 puta slabija od najbolje frakcije F4. Kako najlošija frakcija predstavlja i najmanji udeo u odnosu na ukupne peptide, njenim izdvajanjem ne bi se značajnije doprinelo povećanju ACE inhibitorne aktivnosti hidrolizata. Međutim, ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 3 kDa i izdvajanjem frakcije F4 ACE inhibitorna aktivnost filtrata bi se udvostručila.



Slika 38. ACE inhibitorna aktivnost računata na IC₅₀ za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću termolizina

Na slici 38 prikazana je ACE inhibitorna aktivnost ultrafiltracionih frakcija hidrolizata dobijenog pomoću termolizina. Najvišu ACE inhibitornu aktivnost pokazuje frakcije F4 (IC₅₀ = 0,0976 ± 0,011 mg/mL), ali i F3 (IC₅₀ = 0,118 ± 0,045 mg/mL) koje zajedno čine oko 73,4 % ukupnih peptida. Frakcija F2 pokazuje 4,56 puta nižu vrednost ACE inhibitorne aktivnosti od najbolje frakcije F4, a frakcija F1 čak 4,82 puta nižu aktivnost od najbolje frakcije. Hidrolizat dobijen pomoću termolizina ima takavu raspodelu aktivnosti gde dve niže frakcije F3 i F4 poseduju blisku i visoku ACE inhibitornu aktivnost, a druge dve frakcije sa peptidima molekulske mase između 10 i 30 kDa (F2) i preko 30 kDa (F1) takođe bliskih vrednosti, ali značajno nižih od prvog para frakcija. Ovakva raspodela bioaktivnosti po frakcijama ukazuje da jednostepena ultrafiltracija vodi poboljšanju aktivnosti hidrolizata. Jednostavnom ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 10 kDa i odbacivanjem frakcija F1 i F2, preostaje oko 73,4 % od ukupnih peptida sa višom ACE inhibitornu aktivnost od prvobitne aktivnosti hidrolizata.



Slika 39. ACE inhibitorna aktivnost računata na IC₅₀ za ultrafiltracione frakcije (F1 – frakcija peptida molekulskih masa većih od 30 kDa, F2 – frakcija peptida molekulskih masa između 10 i 30 kDa, F3 – frakcija peptida molekulskih masa između 3 i 10 kDa, F4 – frakcija peptida molekulskih masa manjih od 3 kDa) hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k

Na slici 39 prikazana je ACE inhibitorna aktivnost ultrafiltracionih frakcija hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k. Međusobni odnos bioaktivnosti ovih frakcija sličan je onome koji je opisan za frakcije hidrolizata dobijenog pomoću tripsina. Najvišu ACE inhibitornu aktivnost pokazuju frakcije F4 (IC₅₀ = 0,0321 ± 0,008 mg/mL) i F3 (IC₅₀ = 0,0485 ± 0,009 mg/mL) koje se statistički ne razlikuju značajno. Frakcija F1 pokazuje 6,10 puta lošiju ACE inhibitornu aktivnost od najbolje frakcije, ali i 2,78 puta bolju aktivnost od nalošije frakcije F2. Frakcija F2 koja obuhvata svega 6,90 % od ukupnih peptida i predstavlja najlošiju frakciju sa IC₅₀ = 0,545 ± 0,05 mg/mL ima čak 14,14 puta nižu ACE inhibitornu aktivnost od frakcije F4. Kod hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k kao i kod hidrolizata dobijenog pomoću termolizina, jednostepenom ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 10 kDa, odbacuju se značajno lošije frakcije, ali se zbog veoma visokog ACE inhibitornog dejstva ukupnog hidrolizata time ne doprinosi značajnije toj aktivnosti. Naime, ukupan hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k pokazao je višu ACE inhibitornu aktivnost od najboljih frakcija ostalih hidrolizata, a njegove frakcije F3 i pogotovo F4 pokazale su višu aktivnost od samog hidrolizata. Ultrafiltracijom pomoću membrane veličine pora 3 kDa se dobija

frakcija koja poseduje 1,59 puta višu ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na početnu aktivnost hidrolizata pre ultrafiltracije i kao što je navedeno za antioksidativni kapacitet ove frakcije, njen značaj nije samo u višoj bioaktivnosti već i u sposobnosti da gastrointestinalnu digestiju prođe bez značajnih promena u strukturi, odnosno promeni u bioaktivnosti.

4.1.2.3. Zaključak

U Odeljku 4.1.2. su prikazani rezultati bioaktivnosti proteina i peptida pre i nakon hidrolize sve u cilju određivanja najadekvatnijeg uzorka za obogaćivanje prehrambenih proizvoda i proizvodnje funkcionalne hrane i napitaka.

Najbolja antioksidativna svojstva pokazao je hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k. Ovaj enzim je i u drugim radovima pokazao osobinu da daje peptide dobrih antioksidativnih svojstava, ali lošije redukcionne snage (He i sar., 2013). Naime, hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k je pokazao da poseduje frakcije koje imaju antioksidativni kapacitet blizak vrednosti kapaciteta ukupnog hidrolizata i da ne postoji mogućnosti izdvajanja ultrafiltracione frakcije koja poseduje znatno bolje osobine od hidrolizata. Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću termolizina koji je po vrednostima antioksidativnog kapaciteta najbliži HPK uzorku takođe poseduje frakcije koje su po antioksidativnom kapacitetu bliske vrednostima hidrolizata dobijenog pomoću termolizina, a lošije od vrednosti koje pokazuje hidrolizat i frakcije hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k. Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina iako pokazuje najlošiji antioksidativni kapacitet u poređenju sa ostalim hidrolizatima, poseduje frakciju F3 (peptidi molekulske mase između 10 i 3 kDa) koja pokazuje antioksidativna svojstva bolja od hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k, ali i od njegove najbolje frakcije F4. Ova frakcija hidrolizata dobijenog pomoću tripsina nažalost obuhvata svega $22,44 \pm 1,88$ % peptida u hidrolizatu. Upoređivanjem tri uzorka koji predstavljaju najbolje kandidata za dodatak u prehrambeni proizvod sa aspekta antioksidativnih svojstava F3 hidrolizata dobijenog pomoću tripsina (HT-F3), F4 hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k (HPK-F4) i ukupnog hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k (HPK) dobijamo sledeće odnose. Peptidi iz uzorka HT-F3 su 1,96 puta bolji antioksidansi od peptida iz uzorka HPK, ali ih ima 4,46 puta

manje nego peptida HPK uz veće troškove proizvodnje (pošto pored identičnih uslove hidrolize, ova frakcija zahteva i dvostepenu ultrafiltraciju). Takođe, peptidi iz uzorka HT-F3 su 1,40 puta bolji antioksidansi od peptida iz uzorka HPK-F4, ali ih uz vrlo slične troškove proizvodnje (u prvom slučaju je dvostepena ultrafiltracija, a u drugom slučaju jednostepena ultrafiltracija) dobijamo 2,81 put manje. Peptidi iz uzorka HPK-F4 su 1,40 puta bolji antioksidansi od peptida iz uzorka HPK, ali ih ima 1,59 puta manje nego peptida HPK uz veće troškove proizvodnje, jer HPK-F4 pored hidrolize zahteva i jednostepenu ultrafiltraciju. Dakle, najpogodniji uzorci za obogaćivanje proizvoda u cilju postizanja više antioksidativne sposobnosti proizvoda su HPK-F4 i HPK.

Redukciona snaga predstavlja sposobnost molekula da redukuje trovalentno gvožđe do dvovalentnog time što će donirati elektron, a dovodi se u direktnu vezu sa antioksidativnom sposobnošću molekula (Yun-hui i sar., 2006; Wang i sar., 2007). Ispitivani uzorci su pokazali takve karakteristike gde su hidrolizati pokazali bolje sposobnosti redukcije trovalentnog gvožđa, od nehidrolizovanog uzorka, dok su frakcije koje su pokazale bolje karakteristike od hidrolizata one koje obuhvataju procentualno veoma malo peptida. Frakcije koje pokazuju visoku redukcionu snagu su frakcije peptida većih molekulskih masa nego što je to slučaj kod antioksidativnih svojstava određivanih pomoću ABTS reagensa, što je u skladu sa literaturom (Girgih i sar., 2011; Li i sar., 2008; Uluko i sar., 2014), dok je u radu He i sar. (2013) jedina frakcija koja pokazuje redukcionu snagu upravo najmanja frakcija. Bolja redukciona snaga dužih molekula objašnjava se prisustvom većeg broja redukcionih grupa kod ovih molekula nego kod kraćih peptida (Girgih i sar., 2011). Hidrolizati sa najboljom redukcionim snagom su kao i u slučaju antioksidativnih kapaciteta HPK i HTH.

Antihipertenzivno svojstvo peptida ispitivano je preko ACE inhibitorne aktivnosti uzoraka. Dobijeni rezultati jasno ukazuju da hidroliza pozitivno utiče na antihipertenzivno svojstvo peptida i da se procesom hidrolize drastično povećava ACE inhibitorna aktivnost proteina surutke. Najviše vrednosti ACE inhibitorne aktivnosti pre ultrafiltracije pokazao je hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k. Uzorak HPK pokazuje višu ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na sve frakcije ostalih hidrolizata, dok frakcije F3 i F4 hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k pokazuju bolje ACE inhibitorne aktivnosti od ukupnog hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze

k. Frakcija HPK-F4 poseduje 1,59 puta višu ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na aktivnost ukupnog hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k, ali isto toliko puta manje peptida. Opravdanost ultrafiltracije u ovom slučaju ogleda se u tome što pored bolje bioaktivnosti peptidi male molekulske mase u većem procentu nepromenjeni prolaze gastrointestinalni sistem čoveka i sa nepromenjenom bioaktivnošću dospevaju do mesta u organizmu gde ispoljavaju svoju aktivnost.

Iz svega navedenog, zaključuje se da je uzorak sa najboljim karakteristikama antioksidativnim i antihipertenzivnim hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k kao i njegova frakcija F4. Ovaj hidrolizat se zbog pokazane značajno bolje bioaktivnosti u odnosu na ostale ispitivane uzorke, preporučuje za obogaćivanje prehrambenih proizvoda u cilju postizanja ili poboljšanja njihove funkcionalnosti. Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k, kao i njegova frakcija HPK-F4 biće dodati u fermentisani probiotski napitak na bazi surutke i mleka, probiotski jogurt kao i u masni krem koji se koristi u konditorskoj industriji, u cilju njihovog obogaćivanja (rezultati prikazani dalje u radu).

U tabeli 10 navedeni su neki od proizvoda koji poseduju bioaktivne peptide kao i naša preporuka obogaćivanja proizvoda peptidima na osnovu pokazanih najboljih svojstava.

Tabela 10. sa postojećim proizvodima koji poseduju bioaktivne peptide kao nosioce funkcionalnosti i predloženi novi proizvodi

| Naziv | Tip proizvoda | Dejstvo | Proizvođač | Izvor |
|------------|---|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| „Calpis” | Mlečni napitak sa kulturama <i>Lactobacillus helveticus</i> CP790 i <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Antihipertenzivno | Calpis Co., Japan | (Haque i Rattan, 2006). |
| „Evolus” | Mlečni napitak sa kulturom <i>Lactobacillus helveticus</i> LBK-16H | Antihipertenzivno | Valio Oy, Finland | (Seppo i sar., 2002). |
| „PeptoPro” | Sportski napitak sa dodoatom di- i tri-peptida | Stimuliše produkciju insulina | Dutch State Mines, 2004). | (Korhonen i Pihlanto, 2006). |
| „BioZate” | Hidrolizovani proteini surutke | Antihipertenzivno | Davisco, USA | (Korhonen i Pihlanto, 2006). |

| | | | | |
|------------------------|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| „BioPure-GMP” | Glikomakropeptid | Prevenција zuba od karijesa | Davisco, USA | (Korhonen i Pihlanto, 2006). |
| „Vivinal Alpha” | Peptidi dobijeni iz surutke | Umanjenje stresa i lakši san | Borculo Domo Ingredients (BDI), The Netherlands | (Korhonen i Pihlanto, 2006). |
| / | Čokoladni sladoled | Antioksidativna | / | Kumari 2013 |
| / | Mleko obogaćeno različitim aromama | Antioksidativna | / | Pellagrani 2003; Mann i sar. 2014 |
| / | Fermentisani napitak na bazi surutke i mleka | Antioksidativna i ACE inhibitorna | / | Krunić |
| / | Fermentisani napitak na bazi mleka | Antioksidativna i ACE inhibitorna | / | Krunić |
| / | Masni krem-punjenje za konditorske proizvode | Antioksidativna i ACE inhibitorna | / | Krunić |

4.2. Primena proteina i peptida surutke

4.2.1. Dodatak bioaktivnih peptida surutke u različite prehrambene proizvode

4.2.1.1. Stabilnost bioaktivnih peptida u masnom kremu koji se koristi kao punjenje za različite konditorske proizvode

Dodatak bioaktivnih peptida u masni krem opisan je u Odeljku 3.2.11.7., a rezultati su prikazani u tabeli 11.

Tabela 11. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke u masni krem na antioksidativnu (ABTS i FRAP) i ACE inhibitornu (ACEI) aktivnost proizvoda. Kontrola predstavlja uzorak mlečnog krema u koji nisu dodati bioaktivni peptidi, MK-H – uzorak u koji je dodan hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k, u koncentraciji od 5 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina u kremu, MK-F4 – uzorak u koji je dodata frakcija peptida hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću proteinaze k, a čiji peptidi imaju molekulsku masu ispod 3 kDa, u koncentraciji od 5 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina u masnom kremu

| Bioaktivnost uzoraka | | | | |
|----------------------|-----|------------|-------------|------------|
| Uzorak | Dan | ABTS, % | FRAP, aps | ACEI, % |
| Kontrola | 0 | 16,24±1,01 | 0,213±0,016 | 25,77±1,01 |
| | 30 | 16,26±1,16 | 0,220±0,012 | 24,55±2,22 |
| | 60 | 16,44±1,18 | 0,216±0,020 | 25,42±2,12 |
| MK-H | 0 | 19,97±1,80 | 0,224±0,020 | 58,74±2,16 |
| | 30 | 20,02±1,32 | 0,228±0,018 | 59,01±2,00 |
| | 60 | 20,22±1,18 | 0,230±0,022 | 59,91±1,88 |
| MK-F4 | 0 | 20,12±1,11 | 0,209±0,018 | 70,00±1,00 |
| | 30 | 20,20±1,08 | 0,210±0,020 | 70,02±1,21 |
| | 60 | 20,33±1,06 | 0,208±0,020 | 70,00±1,11 |

Dobijeni rezultati ukazuju na znatno povećanje antioksidativne kao i ACE inhibitorne aktivnosti masnog krema nakon dodatka peptida. Antioksidativni kapacitet izražen

preko inhibicije ABTS radikala povećao se u proseku za 3,5 % odnosno 1,23 puta, dok se redukciona snaga nije statistički značajno promenila. ACE inhibitorna aktivnost povećala se za 32,98 % odnosno 2,35 puta u masnom kremu kome je dodat hidrolizat, a čak za 44,23 %, odnosno 2,77 puta u uzorku kome je dodata frakcija HPK-F4. Vrednosti antioksidativnog kapaciteta kao i ACE inhibitorne aktivnosti tokom 2 meseca čuvanja u frižideru ostale su nepromenjene u svim uzorcima. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da su bioaktivni peptidi veoma dobar izbor za dodatak u masni krem sa ciljem poboljšanja nutritivnih i funkcionalnih svojstava proizvoda, kao i da peptidi dodati u masni krem pokazuju izuzetno dobru stabilnost tokom dva meseca čuvanja, što znači da je na ovaj način moguće dobiti obogaćen proizvod nepromenjenih funkcionalnih svojstava tokom dužeg perioda čuvanja. Važno je naglasiti, da je masni krem utoliko bolji izbor proizvoda za obogaćivanje, jer se može koristiti za punjenje različitih konditorskih proizvoda. Obogaćenim masnim kremom, moguće je puniti proizvode poput: napolitanki, keksa, biskvita, čokolada i mnogih drugih, čime se omogućava poboljšanje funkcionalnih svojstava tih proizvoda. Kako se ovaj krem pokazao kao pogodno okruženje za bioaktivne peptide, koji ne gube na svojoj aktivnosti tokom perioda čuvanja, ovakav krem predstavlja dobar izbor za punjenje onih proizvoda koji pokazuju pad bioaktivnosti tokom čuvanja ili nemogućnost obogaćivanja bioaktivnim peptidima surutke iz bilo kog razloga.

4.2.1.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije, karakteristike proizvoda i probiotski karakter fermentisanog napitka

4.2.1.2.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na fermentisani napitak na bazi mleka

Uticaj dodatka bioaktivnih peptida na tok fermentacije i karakteristike gotovog proizvoda rađen je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.6. Dodatak hidrolizata odnosno HPK-F4 frakcije od 1, 3 i 5 % (m/m) su odabrani u datom procentu da se ne bi uticalo na ukus proizvoda. Dodatak peptida u jogurt od preko 5 % ili po nekim istraživačima preko 10 % u odnosu na ukupan sadržaj proteina doprinosi porastu gorčine proizvoda koji su konzumenti na testiranju označili kao nepoželjan (Christopher i sar., 2009; Matumoto-Pintro i sar., 2011). Uticaj dodatka peptida predstavljen je u tabeli 12.

4.2.1.2.1.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije napitka na bazi mleka

Metoda ispitivanja uticaja dodatka peptida surutke na fermentacioni proizvod na bazi mleka opisana je u Odeljku 3.2.11.6. i 3.2.11.6.1.

Tabela 12. Parametri mleka sa 0,5 % mlečne masti u koje je dodato 1, 3 i 5 % hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću proteinaze k (1HJ, 3HJ, 5HJ) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4J, 3F4J, 5F4J) računato na ukupan sadržaj proteina u mleku, pre i nakon fermentacije pomoću ABY 6 jogurtne kulture.

| | Kontrola | | 1HJ | | 3HJ | | 5HJ | | 1F4J | | 3F4J | | 5F4J | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. |
| Broj živih ćelija, log₁₀ CFU/mL | 6,667 ±0,02 | 8,709 ±0,12 | 6,667 ±0,02 | 8,839 ±0,11 | 6,667 ±0,02 | 8,530 ±0,10 | 6,667 ±0,02 | 8,617 ±0,12 | 6,667 ±0,02 | 8,768 ±0,11 | 6,667 ±0,02 | 8,405 ±0,10 | 6,667 ±0,02 | 8,600 ±0,12 |
| pH | 6,701 ±0,10 | 4,84 ±0,08 | 6,701 ±0,10 | 4,712 ±0,07 | 6,701 ±0,10 | 4,672 ±0,08 | 6,701 ±0,10 | 4,718 ±0,06 | 6,701 ±0,10 | 4,706 ±0,07 | 6,701 ±0,10 | 4,756 ±0,07 | 6,701 ±0,10 | 6,826 ±0,08 |
| Titracijska kiselost, °SH | 5,6 | 22,0 ±0,8 | 5,6 | 24,0 ±0,6 | 5,6 | 26,0 ±0,6 | 5,6 | 25,6 ±0,4 | 5,6 | 24,8 ±0,6 | 5,6 | 25,6 ±0,6 | 5,6 | 25,2 ±0,4 |
| DPPH, % | 1,80 ±0,85 | 6,93 ±0,89 | 2,39 ±0,99 | 3,91 ±1,22 | 3,55 ±0,99 | 10,12 ±2,18 | 5,69 ±0,98 | 16,23 ±2,29 | 2,80 ±0,97 | 9,20 ±1,68 | 2,45 ±0,99 | 5,15 ±1,79 | 3,60 ±0,89 | 6,93 ±0,88 |
| ABTS, % | 36,34 ±1,81 | 40,17 ±2,80 | 34,12 ±1,89 | 41,83 ±2,25 | 37,82 ±1,65 | 46,12 ±2,52 | 40,47 ±2,85 | 48,34 ±2,93 | 34,86 ±1,89 | 42,67 ±1,95 | 38,7 ±2,86 | 44,60 ±1,95 | 43,72 ±2,95 | 49,72 ±2,89 |
| FRAP, aps | 0.409 ±0,01 | 0.626 ±0,03 | 0.512 ±0,02 | 0.635 ±0,03 | 0.540 ±0,02 | 0.584 ±0,02 | 0.592 ±0,01 | 0.650 ±0,02 | 0.489 ±0,03 | 0.552 ±0,02 | 0.491 ±0,01 | 0.599 ±0,02 | 0.426 ±0,03 | 0.604 ±0,04 |
| ACEI, % | 9,69 ±2,80 | 8,24 ±2,89 | 23,02 ±2,90 | 9,18 ±1,88 | 21,92 ±2,85 | 9,18 ±1,90 | 33,05 ±3,30 | 17,42 ±2,99 | 23,50 ±2,95 | 14,16 ±2,59 | 35,20 ±3,90 | 16,57 ±2,90 | 39,71 ±3,96 | 15,59 ±2,98 |

U tabeli 12 prikazani su parametri fermentacije mleka u zavisnosti od tipa i procenta dodatka bioaktivnih peptida surutke. Broj živih ćelija (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.3.) nakon fermentacije bio je blago povećan u uzorcima koji su sadržali dodatak frakcije hidrolizata od 1,0 %. Uzorak sa dodatkom 1,0 % ukupnog hidrolizata pokazao je porast od 0,13 log₁₀ CFU/mL u odnosu na kontrolni uzorak, a uzorak sa dodatkom frakcije hidrolizata pokazao je nešto manji rast (0,049 log₁₀ CFU/mL). Ostali uzorci su pokazali blagi pad ukupnog broja živih ćelija nakon fermentacije u odnosu na kontrolni uzorak. Iz predstavljenih rezultata možemo zaključiti da ispitivani dodatak bioaktivnih peptida surutke nema statistički značajan ($p < 0,05$) uticaj na rast mlečnih bakterija tokom fermentacije mleka. Ova tvrdnja je u skladu sa literaturom, gde se uticaj peptida na rast tokom fermentacije ispoljava različito u zavisnosti od korišćenog soja, a za soj *S thermophilus* i *L. acidophilus* je utvrđeno da dodatak peptida utiče nepovoljno na rast kulture tokom fermentacije, ali pozitivno na broj živih ćelija tokom procesa čuvanja (Lucas i sar., 2004). Mccomas i Gilliland (2003) utvrdili su da dodatak hidrolizata nema uticaja na rast kultura *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* i *Streptococcus thermophiles*, ali ima značajan uticaj na rast kultura *Bifidobacterium longum* i *L. acidophilus*.

pH vrednost kao važan parametar fermentacije (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.1.) pokazuje da je fermentacija najsporije tekla u kontrolnom uzorku (pH uzorka se tokom fermentacije smanjena je sa 6,701 na 4,840), a najbrže u uzorku sa dodatkom 3,0 % ukupnog hidrolizata, kod koga je pH vrednost nakon fermentacije iznosila 4,672. Sledeći najbolji uzorak je 1F4J sa pH 4,706 posle fermentacije, zatim sledi uzorak 1HJ, pa 5HJ, a posle njega 3F4J i 5F4J. pH vrednosti ispitivanih uzoraka ukazuju na to da je dodatak proteina i peptida surutke imao značajan uticaj na tok fermentacije, pri čemu je dodatak peptida u vidu ukupnog hidrolizata više uticao na tok fermentacije i pad pH vrednosti uzoraka od dodatka peptidne frakcije hidrolizata molekulske mase ispod 3 kDa.

Titracijska kiselost je još jedan bitan parametar koji pokazuje fermentacionu aktivnost bakterijske kulture (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.2.). Iz prikazanih rezultata se potvrđuje zaključak dobijen analizom pH vrednosti parametara. Naime, najmanju titracijsku kiselost pokazuje kontrola sa svega $22,0 \pm 0,8$ °SH, statistički značajno ($p <$

0,05) nižu od ostalih uzoraka. Uzorci sa 1,0 % dodatka bioaktivnih peptida pokazuju nešto višu vrednost i to 1HJ $24,0 \pm 0,6$ °SH, a 1F4J $24,8 \pm 0,6$ °SH. Najveće povećanje titracijske kiselosti pokazuju uzorci sa dodatkom 3,0 % proteina i peptida surutke i to 3HJ pokazuje $26,0 \pm 0,6$ °SH, a 3F4J nešto nižu vrednost $25,6 \pm 0,6$ °SH. Uzorci sa dodatkom proteina i peptida surutke od 5,0 % pokazuju blagi pad porasta titracijske kiselosti u odnosu na uzorke sa 3,0 % dodatka. Kako su uzorci sa dodatkom proteina i peptida surutke od 3,0 % pokazali najbolju fermentativnu aktivnost možemo zaključiti da je ta količina dodatka proteina i peptida surutke optimalna za rast korišćene kulture pre svega najdominantnijeg soja *S. thermophilus*. Soj *S. thermophilus* ne poseduje izraženu proteolitičku aktivnost, ali je odgovoran za proizvodnju najvećeg dela mlečne kiseline u dobijenim uzorcima. Soj *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, s druge strane kao najmanje dominantna kultura zastupljena u procentu od 1,0 % u kulturi ABY 6, sa izraženim proteolitičkim dejstvom ima važnom ulogom u obezbeđivanju dovoljne količine aminokiselina za nesmetan rast soja *S. thermophilus*.

Dodatak bioaktivnih peptida imao je za cilj ne samo uticaj na rast bakterijske kulture i tok fermentacije, već i na biološku aktivnost napitka. U tabeli 12 su prikazane vrednosti antioksidativne aktivnosti uzoraka mleka pre i nakon fermentacije određivane pomoću tri različite metode (inhibicije DPPH radikala, inhibicije ABTS radikala i FRAP metoda). Metoda određivanja inhibicija DPPH radikala opisan u Odeljku 3.2.11.6.3.4.1. i ograničena je isključivo na detektovanje antioksidanasa rastvornih u metanolu, što je limitirajuće za detektovanje proteina i peptida veće molekulske mase. Ovom metodom utvrđeno je da dodatak peptida značajno utiče na povećanje antioksidativne aktivnosti mleka pre same fermentacije pri čemu je stepen porasta direktno zavisao od procenta dodatih peptida. Najbolje karakteristike pokazuje uzorak 5HJ koji poseduje statistički ($p < 0,05$) značajno višu antioksidativnu aktivnost od 16,23 % posle fermentacije, ali i najveći porast antioksidativnog kapaciteta tokom fermentacije od 9,54 %. Sledeći najbolji porast antioksidativnog kapaciteta pokazuje uzorak 3HJ sa porastom sa 3,55 % na 10,12 %. Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta pomoću ABTS reagensa opisan je u Odeljku 3.2.11.6.3.4.2. a podrazumeva identičan mehanizam kao i metoda sa DPPH reagensom (*engl. „scavenging activity“*) s tim što ova metoda detektuje kako hidrofilne tako i lipofilne antioksidanse. Ovom metodom je utvrđeno da se dodatkom bioaktivnih peptida značajno povećava antioksidativni kapacitet kod svih uzoraka, što je

kao i kod inhibicije DPPH radikala u direktnoj vezi sa količinom dodatih bioaktivnih peptida. Najvišu vrednost pre ($43,72 \pm 2,95$ %) ali i posle ($49,72 \pm 2,89$ %) fermentacije poseduje uzorak 5F4J, statistički ($p < 0,05$) značajno višu od kontrolnog uzorka. Uzorak 5HJ koji pokazuje najbolju vrednost inhibicije DPPH radikala, ovde pokazuje drugu najbolju aktivnost sa 48,34 % nakon fermentacije. Takođe, uzorak 3HJ pokazuje bliske vrednosti antioksidativnog kapaciteta uzorcima 5F4J i 5HJ, dok ostali uzorci pokazuju statistički ($p < 0,05$) značajno nižu antioksidativnu aktivnost. FRAP metoda, opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.4.3., takođe pokazuje da se dodatkom bioaktivnih peptida znatno povećava antioksidativni kapacitet kod svih uzoraka kao i da se fermentacijom dodatno povećava redukciona snaga uzoraka. Ipak, najveće povećanje redukcionne snage uočeno je kod kontrolnog uzorka. Formiranje reduktanata tokom fermentacije može biti razlog za povećanje redukcionne snage. Oni mogu da reaguju sa slobodnim radikalima, stabilizuju ih i suzbiju radikalsku lančanu reakciju. U literaturi postoje podaci o uticaju mnogih bakterija mlečne kiseline na povećanje redukcionne snage fermentisanih supstrata (Lin i Yen, 1999). Takođe, povećanju redukcionne snage mogu da doprinesu i unutarćelijski antioksidansi i peptidi starter kultura i njihova hidrogen donorska sposobnost (Yang i sar., 2000). Ostali uzorci pokazuju manji porast redukcionne snage tokom fermentacije, ali kako dodatak bioaktivnih peptida utiče na povećanje antioksidativnog kapaciteta pa i redukcionne snage u uzorcima pre same fermentacije, neki uzorci i pored manjeg porasta tokom fermentacije, poseduju višu redukcionu snagu gotovog proizvoda. Najveću redukcionu snagu poseduje 5HJ uzorak koji pokazuje i najviši antioksidativni kapacitet određivan metodom inhibicije DPPH radikala i drugi najviši kapacitet određivan metodom inhibicije ABTS radikala.

Veoma bitna karakteristika obogaćenog napitka je ACE inhibitorna aktivnost određivana po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.6.3.5. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se fermentacijom ACE inhibitorna aktivnost napitka smanjuje. Mleko pre fermentacije poseduje višu aktivnost od jogurta koji se dobija nakon fermentacije mleka. Uzorci sa dodatkom bioaktivnih peptida surutke očekivano poseduju i višu ACE inhibitornu aktivnost od kontrolnog uzorka, ali je prisutno znatno veće opadanje te aktivnosti tokom fermentacije. Najvišu ACE inhibitornu aktivnost nakon fermentacije pokazuje uzorak 5HJ koji pokazuje i najbolje antioksidativne karakteristike. Produkcija ACE inhibitornih peptida je moguća pomoću BMK, ali je bitan odabir adekvatne

proteolitičke kulture i uslova fermentacije (Gupta i sar., 2013). Mnogi radovi potvrđuju mogućnost proizvodnje napitka sa ACE inhibitornim peptidima pomoću BMK (Donkor i sar., 2005; Gobbetti i sar., 2000), ali produkcija ovakvih bioaktivnih peptida često ne prati onu metaboličku aktivnost koja je potrebna za dobijanje fermentisanog proizvoda zadovoljavajućih organoleptičkih karakteristika. Dodatak bioaktivnih peptida u fermentisani proizvod predstavlja jednostavan način za poboljšanje funkcionalnih svojstava proizvoda, bez narušavanja organoleptičkih i drugih poželjnih karakteristika fermentisanog napitka.

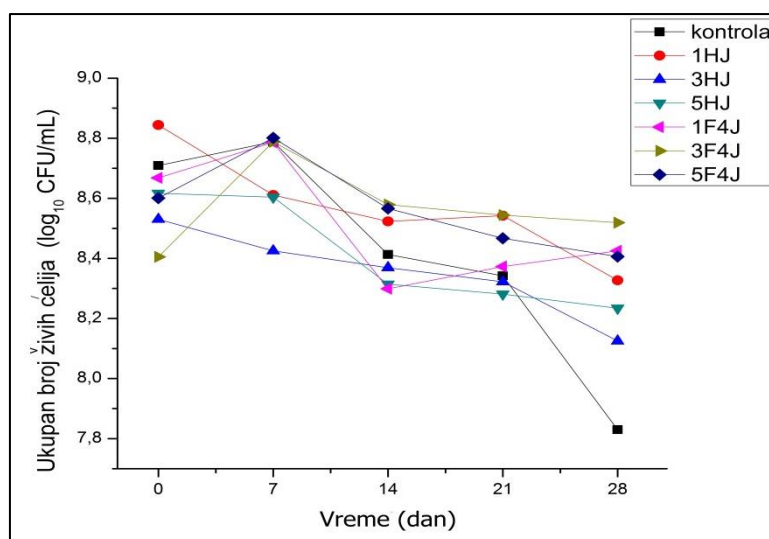
Analizom rezultata prikazanih u tabeli 12 izvodi se zaključak da iako dodatak proteina i peptida surutke ne utiče značajno na povećanje ukupnog broja živih ćelija ABY 6 kulture nakon fermentacije, zasigurno utiče na promenu međusobnog odnosa 4 bakterijska soja koja čine ovu mešanu jogurtanu kulturu, kao i na samu metaboličku aktivnost korišćenih sojeva, na šta upućuje promena pH vrednosti i titiracijske kiselosti u zavisnosti od količine i vrste dodatih peptida. Različito ponašanje probiotske kulture u zavisnosti od količine i vrste dodatih peptida pokazano je i u radu Lucas i sar. (2004). Takođe, u radu Prasanna i sar., (2012) pokazano je kao i u ovom radu da na ponašanje BMK značajan uticaj ima tip odnosno veličina dodatih peptida. Uzorak bez dodatka peptida pokazuje porast antioksidativnog kapaciteta, što je delom uzrok proteolitičke aktivnosti BMK, a najviše soja *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, koji ima sposobnost da hidrolizuje velike molekule proteina i peptida, na manje peptide i slobodne aminokiseline, koji su često nosioci određenih bioaktivnosti poput antioksidativne ili ACE inhibitorne. Uzorci sa dodatkom proteina i peptida surutke pokazali su smanjenje ACE inhibitorne aktivnosti nakon fermentacije u daleko većoj meri nego što je slučaj kod kontrolnog uzorka što je direktna posledica potrošnje bioaktivnih peptida od strane BMK, a pre sveha soja *S. thermophilus*. Mešana kultura ABY 6 je kultura koja se komercijalno koristi za fermentaciju mleka i kombinovana je u takvom odnosu bakterijskih sojeva da mleko predstavlja idealan supstrat da bi ona ispoljila svoje najbolje karakteristike. Dodatkom peptida u ovakav fermentacioni supstrat po čijem sastavu je mešana kultura koncipirana veoma malo remeti i menja njeno prvobitno funkcionisanje. Tome u prilog ide i činjenica da su mali rast ukupnog broja živih ćelija pokazali samo uzorci sa minimalnim dodatkom bioaktivnih peptida (1HJ i 1F4J), svako dalje dodavanje peptida dovodi do smanjenja ukupnog broja živih ćelija nakon

fermentacije. Objašnjenje smanjenja broja ukupnih živih ćelija može se naći u favorizovanju aktivnosti soja *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* dodatkom peptida u fermentacioni supstrat. Favorizovanje i podsticanje rasta soja *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* nije dobro, jer ovaj soj proizvodi veće količine vodonik-peroksida nego što je to slučaj sa sojem *S. thermophilus*, a to nepovoljno utiče na rast probiotskih sojeva sadržanih kulturama tipa ABY (Korbekandi i sar., 2011; Mortazavian i sar., 2007; Mortazavian i sar., 2008; Tamime i sar., 2005).

Ovo ipak nije slučaj sa bioaktivnosti odnosno funkcionalnim svojstvima proizvoda. Dodatak bioaktivnih peptida utiče povoljno na povećanje antioksidativnog kapaciteta, redukcione snage kao i ACE inhibitorne aktivnosti uzoraka nakon fermentacije. Dodatak bioaktivnih peptida daje veliki doprinos kvalitetu proizvoda kroz povećanje funkcionalnosti proizvoda. Najbolje parametre bioaktivnosti poseduje uzorak 5HJ, što je u vezi sa sadržajem peptida u uzorku.

4.2.1.2.1.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na stabilnost fermentisanog napitak na bazi mleka

Parametri koji su određivani pre i posle fermentacije mleka, praćeni su i tokom čuvanja dobijenog fermentisanog proizvoda u frižideru na temperaturi od 4 ± 1 °C (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.6). Na slici 40 prikazan je uticaj dodatka bioaktivnih peptida na broja živih ćelija mešane kulture u fermentisanom proizvodu tokom čuvanja.

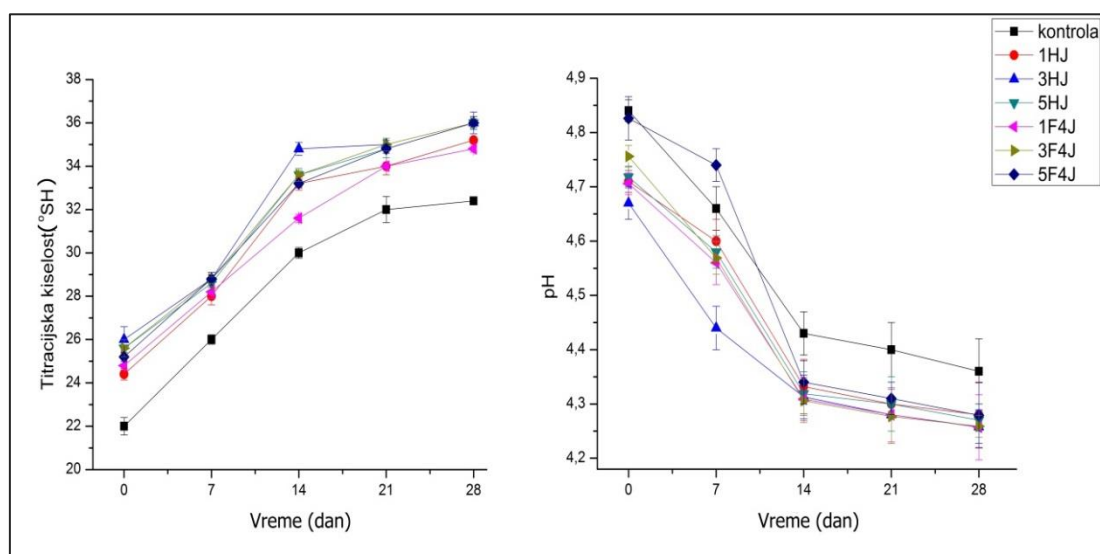


Slika 40. Broj živih ćelija u fermentisanom mleku sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HJ, 3HJ, 5HJ) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4J, 3F4J, 5F4J), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C

Iako bioaktivni peptidi nisu ispoljili značajan uticaj na rast primenjene kulture tokom procesa fermentacije, njihov pozitivan uticaj je prisutan tokom čuvanja proizvoda na 4 ± 1 °C i to za ceo period od 28 dana (slika 40). Ovi rezultati su u skladu sa literaturom (Akalin i sar., 2007; Christopher i sar., 2009; Gustaw i sar., 2016), dok su McComas i Gilliland (2003) pokazali suprotan efekat (da postoji pad u broju BMK) tokom čuvanja na 4 ± 1 °C u trajanju od 28 dana. Važno je napomenuti razliku u delovanju ukupnog hidrolizata i frakcije hidrolizata na broj živih ćelija. U period od 0. do 7. dana čuvanja, svi uzorci ispoljili su rast broja živih ćelija, osim uzoraka u koje je dodat hidrolizat. Kontrola pokazuje blagi rast u prvih 7 dana, dok uzorci sa dodatkom frakcije HPK-F4 pokazuju znatan rast, pogotovo uzorak 3F4J koji pokazuje rast od čak $\Delta \log = 0,4$. Nakon sedmog dana čuvanja svi uzorci pokazuju pad broja živih ćelija. Kontrolni uzorak pokazuje najveći pad od čak $\Delta \log = -0,879$. Uzorak 1HJ koji je imao najveći rast tokom fermentacije, pokazao je posle kontrole najveći smanjenje broja živih ćelija tokom čuvanja ($\Delta \log = -0,517$), 3HJ i 5HJ pokazuju smanjenje od $\Delta \log = -0,405$ odnosno $\Delta \log = -0,383$. Uzorci 1F4J i 5F4J imaju međusobno gotovo identičan broj živih ćelija nakon 28 dana čuvanja što odgovara smanjenju viabilnosti od $\Delta \log = -0,243$ odnosno $\Delta \log = -0,195$. Jedini uzorak koji ispoljava povećanje broja živih ćelija je uzorak 3F4J koji je nakon fermentacije imao upravo najmanji broj živih ćelija. Ovaj uzorak imao je najveće povećanje vijabilnosti između nultog i sedmog dana, a zatim je pokazivao blago smanjenje, da bi nakon 28. dana čuvanja zadržao rast u broju živih ćelija u odnosu na nulti dan od $\Delta \log = 0,114$.

Na slici 41 prikazana je promena pH vrednosti i titracijske kiselosti tokom čuvanja uzoraka u frizideru u trajanju od 28 dana. Svi uzorci su zadržali isti trend koji su imali nakon fermentacije, odnosno nultog dana čuvanja. Kontrola zadržava najnižu titracijsku kiselost koja nakon 28 dana čuvanja iznosi $32,4 \pm 0,15$ °SH, što predstavlja povećanje od 10,4 °SH. Isto povećanje imali su uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata, čija je titracijska kiselost nakon 28 dana čuvanja iznosila u proseku 35,7 °SH. Identičan trend

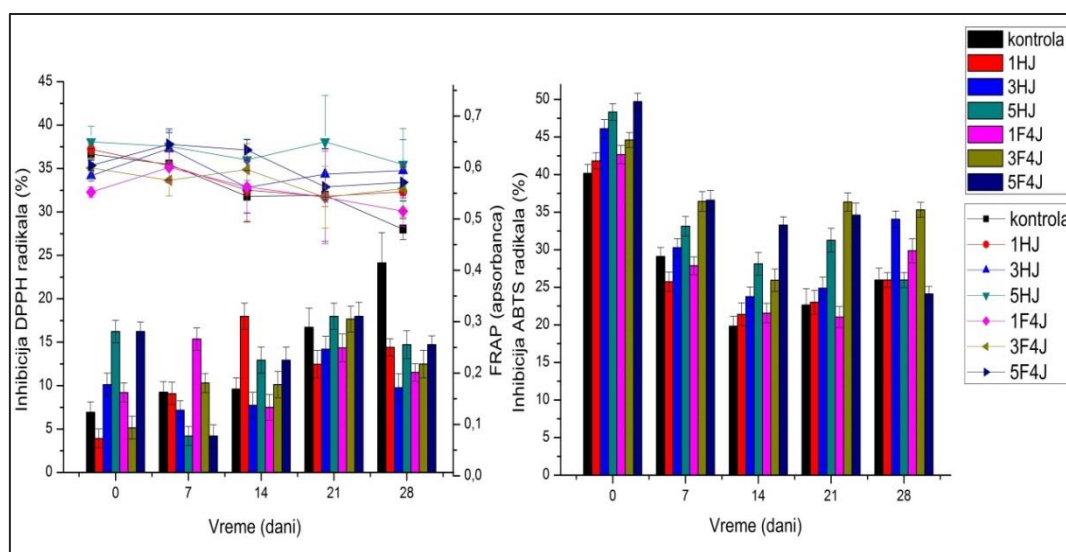
zabeležen je i kod pH vrednosti. Kontrola je zadržala najvišu pH vrednostu u odnosu na ostale uzorke i nakon 28 dana čuvanja pH vrednost se spustila za 0,480 jedinica. Uzorci sa dodatkom bioaktivnih peptida imali su u proseku smanjenje od 0,490 jedinica, gde je najveće smanjenje od 0,547 jedinica zabeležen u uzorku 5F4J. Sledeće najveće smanjenje pH vrednosti, ali i rast titracijske kiselosti imao je uzorak 3F4J koji je pokazao i najveću vijabilnost. Slični rezultat dobijeni su sa kombinovanom kulturom *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus rhamnosus* LR-35 i *Streptococcus thermophilus* (Lucas i sar., 2004).



Slika 41. Titracijska kiselost odnosno pH vrednost fermentisanog mleka sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HJ, 3HJ, 5HJ) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4J, 3F4J, 5F4J), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C

Kao i u ovom istraživanju Lucas i sar. (2004) zabeležili su nepovoljan uticaj dodatka peptida surutke na rast probiotske kulture tokom fermentacije, pogotovo pri većim koncentracijama peptida. Međutim, tokom čuvanja u frižideru, zabeležen je pozitivan uticaj peptida na rast kultura (Akalin i sar., 2007; Lucas i sar., 2004). Iako su u svim uzorcima kulture beležile pad broja tokom čuvanja, dodatak hidrolizata proteina surutke uticao je na smanjenje razlike u broju živih ćelija nultog i poslednjeg dana čuvanja, što je u saglasnosti sa našim radom. Takođe, dodatak peptida uticao je na povećanu kiselost

uzoraka (Akalin i sar., 2007; Horackova i sar., 2014; Lucas i sar., 2004), što je slučaj i sa uzorcima ispitivanim u ovom radu.



Slika 42. Antioksidativna aktivnost fermentisanog mleka sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HJ, 3HJ, 5HJ) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4J, 3F4J, 5F4J), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C, računata preko inhibicije DPPH radikala, Redukcione snage i Inhibicije ABTS radikala

Prema podacima iz literature, fermentacija pomocu BMK dovodi do povećanja antioksidativnog kapaciteta (Virtanen i sar., 2007), ali tokom perioda čuvanja antioksidativni kapacitet opada. Na slici 42 prikazana je promena antioksidativne aktivnosti uzoraka tokom čuvanja na 4 ± 1 °C u trajanju od 28 dana. Inhibicija DPPH radikala pokazuje značajno povećanje kod uzorka kome nisu dodati peptidi. Inhibicija DPPH radikala je 28. dana čak 3,48 puta viša nego nultog dana čuvanja, odnosno odmah nakon fermentacije. Porast antioksidativnog kapaciteta posebno je izraženu u drugoj polovini perioda čuvanja, od 14. do 21. dana (1,64 puta) i od 21. do 28. dana (1,44 puta). Uzorak 1HJ koji je jedan od uzoraka sa najvećim smanjenjem broja živih ćelija tokom čuvanja, pokazuje porast inhibicije DPPH radikala od 3,69 puta, što je znatno više od kontrolnog uzorka. Uzorak 1HJ je pokazao znatno nižu vrednost inhibicije DPPH radikala nakon fermentacije, tako da i pored manjeg pada inhibicije DPPH

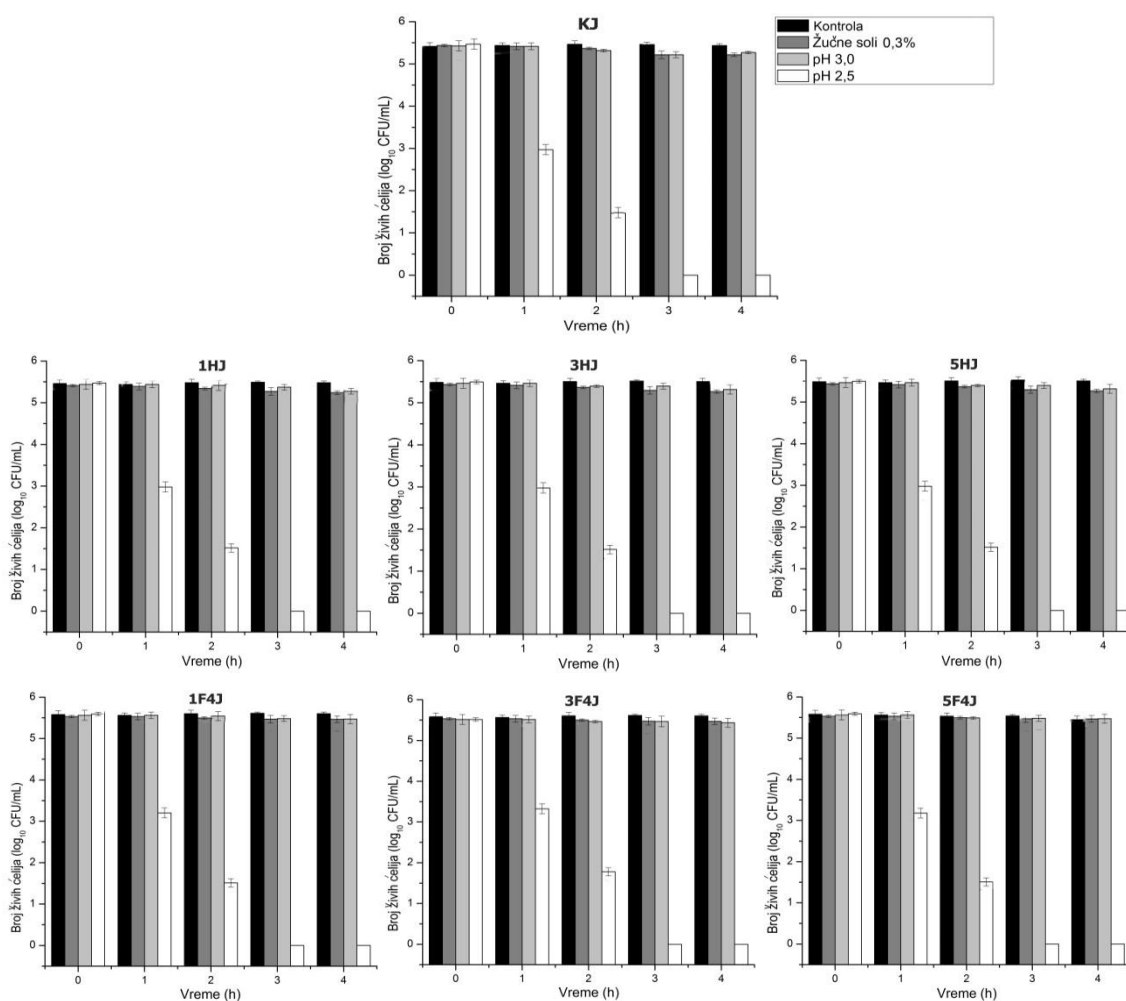
radikala od kontrolnog uzorka, kontrola u 28. dana pokazuje veći stepen inhibicije DPPH radikala od ovog uzorka. Ostali uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata beleže pad inhibicije DPPH radikala i nižu vrednost 28. dana u odnosu na kontrolni uzorak. Uzorci sa dodatkom frakcije hidrolizata takođe beleže nižu vrednost inhibicije DPPH radikala 28. dana u odnosu na kontrolu, s tim da uzorci 1F4J, 3F4J i 5F4J beleže rast od 1,25 odnosno 2,42 , odnosno 1,82 puta u odnosu na početnu vrednost. Inhibicija ABTS radikala beleži pad kod svih uzoraka tokom perioda čuvanja od 28 dana. Najmanji pad u inhibiciji ABTS radikala (1,26 puta) ostvario je uzorak sa najmanjim padom u broju živih ćelije, uzorak 3F4J. Sledeći najmanji pad od 1,35 puta zabeležen je u uzorku 3HJ koji zajedno sa 3F4J pokazuje i najveću inhibiciju ABTS radikala posle 28 dana čuvanja od 34,06 % (što je 1,31 puta viša vrednost od kontrolnog uzorka), odnosno 35,31 % (što je 1,36 puta viša vrednost od kontrolnog uzorka) za 3F4J uzorak. Jedini uzorak pored pomenuta dva koji pokazuje višu inhibiciju ABTS radikala u odnosu na kontrolu posle 28 dana čuvanja je 1F4J, sa 1,15 puta većom inhibicijom od kontrolnog uzorka. Ostali uzorci pokazuju inhibiciju ABTS radikala koja je u granicama one koju ispoljava kontrolni uzorak. Redukciona snaga je takođe pokazatelj antioksidativnog kapaciteta uzoraka. Kao i inhibicija DPPH i ABTS radikala, redukciona snaga pokazuje opadanje tokom čuvanja. Kontrolni uzorak pokazuje ravnomerno opadanje tokom vremena čuvanja i najveći pad redukcionne snage u odnosu na početnu vrednost (1,30 puta). Redukciona snaga kontrolnog uzorka iako nultog dana čuvanja pokazuje višu vrednost od čak 4 uzorka sa dodatkom peptida (3HJ, 1F4J, 3F4J, 5F4J), predstavlja najnižu vrednost u odnosu na druge uzorke nakon 28 dana čuvanja. Uzorak koji pokazuje najvišu vrednost je uzorak 5HJ koji je imao i najvišu vrednost posle fermentacije i pad od svega 1,07 puta. Sledeći uzorak sa najvišom redukcionom snagom nakon 28 dana čuvanja je uzorak 3HJ, koji nije pokazao ukupan pad redukcionne snage, za šta je zaslužan veliki skok aktivnosti u 7. danu čuvanja i postepeno opadanje u narednim danima. Uzorci sa hidrolizatom pokazali su bolju redukcionu snagu kako nakon fermentacije, tako i nakon 28 dana čuvanja, poredeći sa kontrolom ali i uzorcima kojima je dodata frakcija hidrolizata. Redukciona snaga uzorka 5HJ nakon 28 dana čuvanja je 1,26 puta viša od redukcionne snage kontrole, a redukciona snaga 3HJ uzorka je 1,24 puta viša od redukcionne snage kontrole. Svi uzorci sa dodatkom peptida pokazuju statistički značajno ($p < 0,05$) višu redukcionu snagu poredeći sa kontrolnim uzorkom.

Zaključak

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da dodatak bioaktivnih peptida ne utiče značajno na povećanje broja živih ćelija ABY 6 kulture nakon fermentacije, što se može pripisati kratkom trajanju fermentacije od svega 3 sata i 45 minuta, ali utiče na metabolizam korišćenih bakterija i dovodi do statistički značajno ($p < 0,05$) bržeg pada pH odnosno povećanja titracijske kiselosti u svim uzorcima. Dodatak peptida pozitivno utiče na ukupan broj živih ćelija tokom procesa čuvanja na 4 ± 1 °C u trajanju od 28 dana, a sama efikasnost zavisi od tipa korišćenih peptida. Frakcija HPK-F4 ima bolji uticaj na ukupan broj živih ćelija dodata u svim procentim (1 %, 3 %, 5 %), dok dodatak ukupnog hidrolizata ima nešto manji uticaj, ali svakako ukupan broj živih ćelija u svim uzorcima sa dodatkom peptida ima statistički značajno ($p < 0,05$) višu vrednost, pri čemu se posebno ističe uzorak 3F4J sa najvećim brojem živih ćelija posle 28 dana čuvanja. Titracijska kiselost i pH vrednost uzoraka sa dodatkom peptida su niže (pH), odnosno više (titracijska kiselost) tokom celog perioda čuvanja, što je posledica razlike u vrednostima nakon fermentacije, odnosno u nultom danu čuvanja. Tokom čuvanja, svi uzorci imaju isti trend opadanja pH, odnosno rasta titracijske kiselosti na šta dodatak peptida nije imao uticaja. Dodatak bioaktivnih peptida surutke imao je očekivano najveći uticaj upravo na taj karakter proizvoda. ACE inhibitorna aktivnost mleka pre fermentacije znatno je povećana dodatkom bioaktivnih peptida, očekivano najviša vrednost bila je kod uzoraka sa dodatkom 5 % proteina i peptida surutke. ACE inhibitorna aktivnost svih uzoraka se smanjila tokom procesa fermentacije što je posledica razgradnje bioaktivnih peptida od strane korišćene kulture, pri čemu se najveća vrednost zadržala u uzorcima 5HJ i 3F4J nakon fermentacije. Antioksidativni kapacitet proizvoda je znatno uvećan kod svih uzoraka sa dodatkom proteina i peptida surutke, uz očekivano najveći porast u uzorcima s dodatkom od 5 %. Fermentacija je dodatno uvećala antioksidativni kapacitet uzoraka. Najvišu inhibiciju ABTS radikala nakon 28 dana čuvanja u frižideru pokazali su uzorci 3HJ i 3F4J. Uzorak 3F4J pokazao je najbolje karakteristike i možemo reći da kada je u pitanju ABY 6 kultura, i mleko sa 0,5 % mlečne masti, najbolje karakteristike proizvoda dobijamo obogaćivanjem medijuma sa 3,0 % frakcije HPK-F4.

4.2.1.2.1.3. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na probiotska svojstva fermentisanog napitak na bazi mleka

Komercijalna mešana kultura ABY 6 korišćena u ovom radu sadrži dva probiotska soja *L. acidophilus* i *B. bifidum* u Odeljku 3.2.11.6.3.7. opisana je metoda određivanja preživljavanja ove probiotske kulture u uslovima koji vladaju u želucu i dvanaestopalačnom crevu (niska pH i prisustvo žučne soli).



Slika 43. Ukupan broj živih ćelija dva probiotska soja *L. acidophilus* i *B. Bifidum* nakon fermentacije mleka ABY 6 kulturom za uzorke bez dodatka peptida KJ, sa dodoatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1% (1HJ), 3% (3HJ) i 5% (5HJ) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa od 1% (1F4J), 3% (3F4J), 5% (5F4J), tokom 4h inkubaciju u MRS bujonu sa dodatkom 0,3% goveđe žuči, podešenom pH na 3,0 odnosno 2,5. Kontrola predstavlja MRS bujon bez dodatka sa pH oko 6,2

Na slici 43 je prikazan broj živih ćelija probiotske kulture tokom vremena od 4,0 h pri različitim uslovima koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu. Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je intenzivno odumiranje ćelija u odnosu na početni broj. Probiotska kultura ima u proseku 62,0 % preživljavanje nakon prvog sata pri pH 2,5 (pH vrednost koja vlada u želucu), a nakon drugog sata taj broj je jednak nuli u svim uzorcima. Dobijeni rezultati ukazuju da tip i količina dodatih bioaktivnih peptida ne utiče na broj živih ćelija pri pH vrednosti 2,5. Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 3,0 tokom 4,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj. Preživljavanje probiotske kulture kod svih uzoraka iznosilo je oko 99,0 % nakon 2,0 h inkubacije, a 97,5 % nakon 4,0 h inkubacije. Navedeni rezultati ukazuju da ni u ovom slučaju nije bilo značajnih odstupanja u broju živih ćelija u zavisnosti od tipa i količine dodatih peptida. Dodatak goveđe žuči od 0,3 % simulira uslove koji vladaju u dvanaestopalačnom crevu. Ukupan broj živih ćelija zabeležen nakon 2,0 h inkubacije u prisustvu 0,3 % goveđe žuči iznosio je oko 99,0 % u odnosu na početni broj, kod svih uzoraka, a nakon 4h taj broj je bio 98,5 %.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da dodatak bioaktivnih peptida kao i tip i koncentracija istih, pre samog procesa fermentacije ne utiče na procenat preživljavanja probiotske kulture u simuliranim uslovima koji vladaju u gastrointestinalnom traktu.

4.2.1.2.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na fermentisani napitak na bazi surutke

Formulacija fermentacionog supstrata opisana je u Odeljku 3.2.11.2.3.

4.2.1.2.2.1. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na tok fermentacije napitka na bazi surutke

Metoda ispitivanja uticaja dodatka peptida surutke na fermentacioni proizvod na bazi surutke opisana je u Odeljku 3.2.11.6. i 3.2.11.6.2.

Tabela 13. Parametri fermentacionog supstrata koji sadrži surutku i mleka (sa 0,5 % mlečne masti) u odnosu 70 : 30 u koji je dodato 1, 3 i 5 % hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću proteinaze k (1HS, 3HS, 5HS) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4S, 3F4S, 5F4S) računato na ukupan sadržaj proteina u mediumu, pre i nakon fermentacije pomoću ABY 6 komercijalne kulture

| | Kontrola | | 1HS | | 3HS | | 5HS | | 1F4S | | 3F4S | | 5F4S | |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. | Pre fer. | Posle fer. |
| Broj živih ćelija, log₁₀ CFU/mL | 6,991 ±0,05 | 8,186 ±0,08 | 6,991 ±0,05 | 8,205 ±0,08 | 6,991 ±0,05 | 8,210 ±0,09 | 6,991 ±0,05 | 8,200 ±0,06 | 6,991 ±0,05 | 8,472 ±0,07 | 6,991 ±0,05 | 8,422 ±0,06 | 6,991 ±0,05 | 8,344 ±0,10 |
| pH | 6,452 ±0,05 | 4,590 ±0,04 | 6,452 ±0,05 | 4,551 ±0,03 | 6,452 ±0,05 | 4,576 ±0,04 | 6,452 ±0,05 | 4,580 ±0,04 | 6,452 ±0,05 | 4,535 ±0,03 | 6,452 ±0,05 | 4,530 ±0,04 | 6,452 ±0,05 | 4,531 ±0,02 |
| Titracijska kiselost, °SH | 5,2 | 18,2 ±0,10 | 5,2 | 18,6 ±0,10 | 5,2 | 19,6 ±0,15 | 5,2 | 19,4 ±0,15 | 5,2 | 18,6 ±0,10 | 5,2 | 19,2 ±0,15 | 5,2 | 19,2 ±0,13 |
| DPPH, % | 22,17 ±1,89 | 28,99 ±1,99 | 25,99 ±1,87 | 30,29 ±2,89 | 27,55 ±2,79 | 15,23 ±1,55 | 28,10 ±3,44 | 7,34 ±1,19 | 25,10 ±1,88 | 24,50 ±2,99 | 25,48 ±3,09 | 29,98 ±3,19 | 25,78 ±2,82 | 27,80 ±2,92 |
| ABTS, % | 60,10 ±2,25 | 67,23 ±2,95 | 62,57 ±1,90 | 66,10 ±2,00 | 62,99 ±1,87 | 64,40 ±1,89 | 63,14 ±2,02 | 67,10 ±2,54 | 62,93 ±2,34 | 65,19 ±2,10 | 69,02 ±2,60 | 69,70 ±2,28 | 70,91 ±2,05 | 72,65 ±2,25 |
| FRAP, aps | 0.622 ±0,03 | 0.715 ±0,06 | 0.615 ±0,05 | 0.748 ±0,04 | 0.632 ±0,02 | 0.716 ±0,05 | 0.687 ±0,04 | 0.709 ±0,05 | 0.615 ±0,05 | 0.632 ±0,03 | 0.614 ±0,04 | 0.648 ±0,02 | 0.617 ±0,03 | 0.645 ±0,05 |
| ACEI, % | 7,36 ±1,90 | 6,63 ±2,10 | 12,93 ±2,68 | 2,10 ±0,92 | 25,46 ±2,98 | 9,46 ±1,64 | 35,40 ±2,84 | 19,64 ±2,68 | 12,12 ±2,16 | 5,10 ±1,68 | 30,01 ±2,72 | 16,17 ±2,60 | 41,14 ±2,68 | 29,42 ±2,79 |

U tabeli 13 prikazani su parametri fermentacije supstrata koji sadrži 30 % mleka i 70 % surutke, u zavisnosti od tipa i procenta dodatka bioaktivnih peptida surutke. Broj živih ćelija nakon fermentacije (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.3.) pokazuje višu vrednost kod uzoraka sa dodatkom bioaktivnih peptida i proteina surutke u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što predstavlja bolje rezultate u odnosu na vrednosti dobijene pri fermentaciji mleka kao i navodima iz literature vezanim za fermentaciju mleka (Lucas i sar., 2004). Rast ukupnog broja živih ćelija kod kontrolnog uzorka bio je $1,195 \log_{10}$ CFU/mL, dok je kod svih uzoraka sa dodatkom ukupnog hidrolizata ovaj rast bio blago uvećan, ali ne i statistički ($p < 0,05$) značajno veći. Kod uzoraka sa dodatkom peptidne frakcije molekulske mase ispod 3 kDa uočava se drugačiji trend. Uzorak 1F4S i 3F4S pokazuju veći rast ćelija tokom fermentacije poredeći sa kontrolnim uzorkom. Uzorak 1F4S pokazuje 1,24 puta veći rast ukupnog broja živih ćelija tokom fermentacije od rasta u kontrolnom uzorku, a uzorak 3F4S 1,20 puta veći rast od kontrolnog uzorka. Uzorak 5F4S pokazuje nešto manji rast od ostalih uzoraka sa dodatkom frakcije hidrolizata (1,13 puta veći nego u kontrolnom uzorku). U tabelama 12 i 13 je prikazan ukupan broj živih ćelija, ali ono što je karakteristično za ovo povećanje broja nakon fermentacije jeste, da se on pokazao na M17 podlozi, što znači da se rast ogleda upravo u povećanju broja živih ćelija soja *S. thermophilus* za čiji rast su neophodni kratki peptidni lanci koje mu obezbeđuje *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, hidrolizom proteina iz mleka i surutke. Ovo povećanje broja nije prisutno u mleku verovatno iz razloga što je u mleku prisutna veća količina proteina koja je dostupna soju *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* i iz koje nastaje dovoljna količina peptida i aminokiselina neophodnih za rast *S. thermophilus*. Surutka s druge strane ima manji sadržaj proteina što utiče na manju količinu oslobođenih kratkih peptidnih lanaca od strane soja *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, pa je rast soja *S. thermophilus* ograničen njihovom količinom. Dodatkom proteina i peptida surutke, a pogotovo peptida molekulske mase ispod 3kDa, obezbeđuje se dovoljna količina istih za rast soja *S. thermophilus*.

pH vrednost kao važan parametar fermentacije (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.1.) pokazuje da je fermentacija najsporije tekla u kontrolnom uzorku (pH uzorka se tokom fermentacije smanjila sa $6,452 \pm 0,05$ na $4,590 \pm 0,04$), a najbrže u uzorku sa dodatkom 3,0 % frakcije hidrolizata, kod koga je pH vrednost nakon fermentacije iznosila $4,530 \pm 0,06$. pH vrednosti ispitivanih uzoraka ukazuju na to da je dodatak peptida u vidu

frakcije hidrolizata više uticao na tok fermentacije i pad pH uzoraka od dodatka ukupnog hidrolizata.

Iz prikazanih rezultata titracijske kiselosti (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.2.) se potvrđuje zaključak dobijen analizom pH vrenosti uzoraka. Naime, najmanju titracijsku kiselost pokazuje kontrola sa $18,2 \pm 0,4$ °SH. Uzorci sa 1,0 % dodatka peptida pokazuju nešto višu vrednost i to $18,6 \pm 0,6$ °SH. Najveći porast titracijske kiselosti pokazuju uzorci sa dodatkom 3,0 % i 5,0 % hidrolizata i to 3HS pokazuje $19,6 \pm 0,4$ °SH, a 5HS nešto nižu vrednost $19,4 \pm 0,6$ °SH. Uzorci sa dodatkom frakcije hidrolizata od 3,0 % i 5,0 % pokazuju manji rast titracijske kiselosti u odnosu na uzorke sa istim procentom ukupnog hidrolizata ($19,2 \pm 0,4$ °SH). Kako su uzorci sa dodatkom frakcija hidrolizata od 1,0 % i 3,0 % pokazali najveći broj živih ćelija posle 3h i 45 minuta fermentacije, a praćenjem pH i titracijske kiselosti nije ustanovljen značajan uticaj na fermentativnu aktivnost, možemo zaključiti da tip odnosno veličina dodatih peptida igra važnu ulogu u ispoljavanju njihovog uticaja na rast i metabolizam korišćene kulture. Dodatak peptida male molekulske mase utiče na rast i povećanje broja živih ćelija, dok nema značajnog uticaja na metabolizam korišćene kulture, dok dodatak ukupnog hidrolizata ima značajan uticaj na metaboličku aktivnost kulture, ali nešto manji uticaj na povećanje broja živih ćelija tokom procesa fermentacije.

Kao što je već navedeno metoda određivanja inhibicija DPPH radikala opisan u Odeljku 3.2.11.6.3.4.1. ograničena je isključivo na detektovanje antioksidanasa rastvornih u metanolu. Ovom metodom utvrđeno je da dodatak peptida utiče na povećanje antioksidativne aktivnosti supstrata na bazi surutke pre same fermentacije, pri čemu je stepen porasta direktno zavisao od koncentracije dodatih peptida. Uticaj fermentacije na inhibiciju DPPH radikala je različit u uzorcima sa različitom koncentracijom i tipom dodatih peptida. U uzorcima 3HS, 5HS i 1F4S zabeležen je pad inhibicije DPPH radikala nakon fermentacije, dok je u uzorcima 1HS, 3F4S, 5F4S kao i u kontrolnom uzorku zabeležen rast inhibicije. Najbolje karakteristike pokazuju uzorci 1HS i 3F4S.

Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta pomoću ABTS reagensa opisan je u Odeljku 3.2.11.6.3.4.2. Ovom metodom je utvrđeno da se dodatkom bioaktivnih peptida značajno povećava antioksidativna aktivnost kod svih uzoraka, što je kao i kod inhibicije DPPH radikala u direktnoj vezi sa količinom dodatih bioaktivnih peptida.

Najvišu vrednost pre ($70,91 \pm 2,05$ %) ali i posle ($72,65 \pm 2,25$ %) fermentacije poseduje uzorak 5F4S, statistički ($p < 0,05$) značajno višu od kontrolnog uzorka, iako znatno manji rast antioksidativnog kapaciteta tokom fermentacije od svega 1,74 %. Kontrolni uzorak je pokazao povećanje antioksidativnog kapaciteta tokom fermentacije sa $60,10 \pm 2,20$ % na $67,32 \pm 2,95$ %, što predstavlja povećanje od 7,13 %. Uzorci sa dodatkom peptida pokazali su viši antioksidativni kapacitet pre fermentacije, ali znatno manji povećanje kapaciteta tokom fermentacije, što dovodi do toga da svi uzorci izuzev 3F4S i 5F4S pokazuju blago nižu sposobnost inhibicije ABTS radikala poredeći sa kontrolnim uzorkom. Uzorak 3F4S pokazuje blago viši antioksidativni kapacitet nakon fermentacije, poredeći sa kontrolnim uzorkom, iako se tokom fermentacije antioksidativni kapacitet povećao za svega 0,7 %. Dok uzorak 5F4S pokazuje statistički značajno viši antioksidativni kapacitet poredeći sa kontrolnim uzorkom. Takođe, uočava se različit trend kod uzoraka sa dodatkom ukupnog hidrolizata i uzoraka sa dodatkom frakcije hidrolizata. Uzorci sa dodatkom frakcije hidrolizata pokazuju znatno manje povećanje antioksidativnog kapaciteta tokom fermentacije, prosečno 1,57 %, dok uzorci sa dodatkom ukupnih hidrolizata pokazuju povećanje antioksidativnog kapaciteta prosečno 3,29 %. Sve ovo ukazuje na prisutno trošenje bioaktivnih peptida tokom fermentacije. Kako ukupni hidrolizat sadrži peptide i proteine većih molekularskih masa, koji nisu direktno dostupni soju *S. thermophilus* za ishranu, njihova redukcija je znatno manja (što se ogleda u antioksidativnom kapacitetu, kao i ukupnom broju živih ćelija), dok je u uzorcima sa dodatkom peptidne frakcije usled prisustva peptida male molekularske mase veća dostupnost ovih peptida za ishranu bakterija, pa je i redukcija ovih peptida značajnija (što se takođe ogleda u antioksidativnom kapacitetu, kao i ukupnom broju živih ćelija). Dakle, u slučaju ABTS radikala, pokazano je da se dodatkom bioaktivnih peptida značajno povećava antioksidativni kapacitet kod svih uzoraka kao i da se fermentacijom dodatno povećava taj kapacitet, ali ne u onolikoj meri koliko je to slučaj kod kontrolnog uzorka što se objašnjava potrošnje bioaktivnih peptida od strane BMK.

Još jedna metoda korišćena za određivanje antioksidativnog kapaciteta je određivanje redukcionog snage, rađeno po FRAP metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.6.3.4.3. Najveće povećanje redukcionog snage uočeno je kod IHS uzorka. Ovaj uzorak, sa dodatkom ukupnog hidrolizata od 1,0 %, iako ne poseduje najvišu vrednost redukcionog snage pre

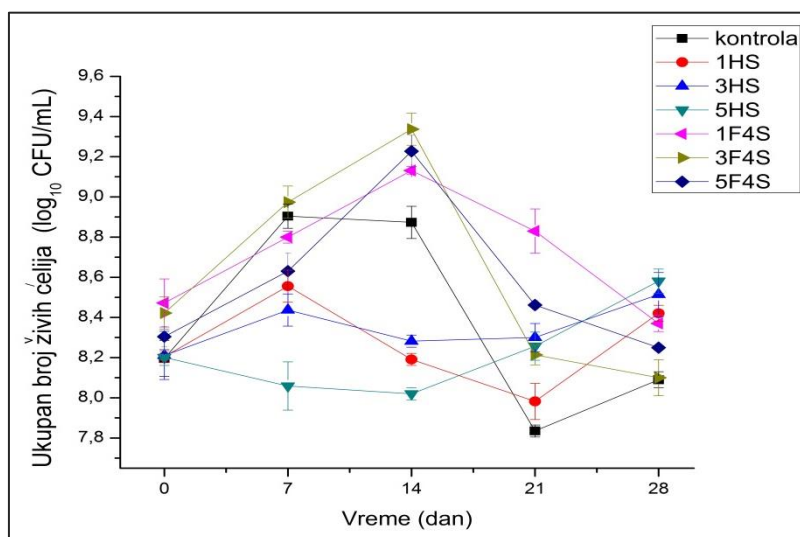
fermentacije, usled najvećeg skoka tokom procesa fermentacije, poseduje značajno višu vrednost od ostalih uzoraka (0,748 aps). Ovo se može objasniti uticajem dodatka proteina i peptida surutke na metabolizam korišćene kulture i stimulisanje produkcije različitih reduktanata tokom fermentacije. Očekivano, svi uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata poseduju višu vrednost redukcione snage od uzoraka sa dodatkom frakcije hidrolizata, kako pre tako i posle fermentacije (ukupan hidrolizat pokazuje veću redukcionu snagu od frakcije HPK-F4, (Odeljak 4.1.2.1.). Uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata pokazali su i znatno veći porast redukcione snage tokom fermentacije, prosečno 0,080 aps, dok je prosečan porast redukcione snage kod uzoraka sa dodatkom peptidne frakcije 0,029 aps. Jedino uzorak 1HS pokazuje veći porast redukcione snage tokom fermentacije (0,133 aps) u odnosu na kontrolu (0,093 aps).

Veoma bitna karakteristika obogaćenog napitka je ACE inhibitorna aktivnost određivana po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.6.3.5. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se fermentacijom ACE inhibitorna aktivnost napitka smanjuje, kao i u slučaju fermentacije mleka. Supstrat na bazi surutke pre fermentacije poseduje višu aktivnost od fermentisanog napitka koji se dobija nakon fermentacije mleka. Uzorci sa dodatkom bioaktivnih peptida surutke očekivano poseduju i višu ACE inhibitornu aktivnost od kontrolnog uzorka, ali je prisutno znatno veće smanjenje te aktivnosti tokom fermentacije. Ovo smanjenje je najverovatnije u vezi sa potrošnjom ovih bioaktivnih peptida za rast, pre svega soja *S. thermophilus*. Kao što je već navedeno produkcija ACE inhibitornih peptida je moguća pomoću BMK, ali je bitan odabir proteolitičke kulture i uslova fermentacije. Najvišu ACE inhibitornu aktivnost nakon fermentacije pokazuje uzorak 5F4S koji pokazuje i najbolju inhibiciju ABTS radikala, ali ne i najveći broj živih ćelija nakon fermentacije.

Analizom rezultata prikazanih u tabeli 13 dolazimo do zaključka da dodatak bioaktivnih peptida surutke utiče na povećanje ukupnog broja živih ćelija nakon fermentacije, kao i na povećanje bioaktivnosti odnosno funkcionalnosti proizvoda, ali i da imamo određen gubitak bioaktivnih peptida usled korišćenja ovih peptida za ishranu od strane BMK.

4.2.1.2.2. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na stabilnost fermentisanog napitka na bazi surutke

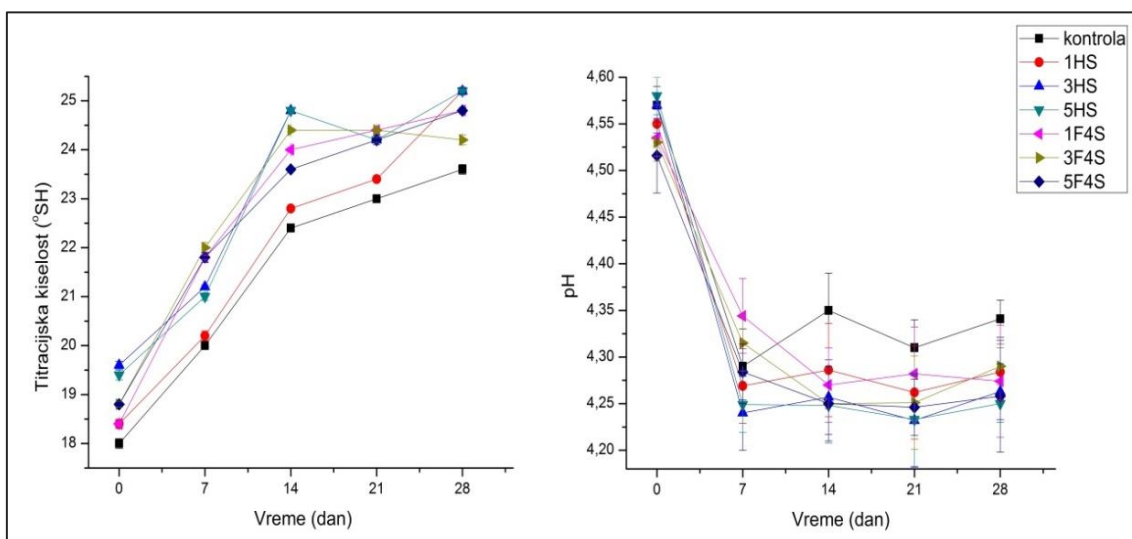
Parametri koji su određivani pre i posle fermentacije napitka na bazi surutke, praćeni su i tokom čuvanja dobijenog fermentisanog proizvoda u frižideru, na temperaturi od 4 ± 1 °C (metoda opisana u Odeljku 3.2.11.6.3.6.).



Slika 44. Broj živih ćelija u fermentisanom napitku na bazi surutke (30 % mleko i 70 % surutka) sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HS, 3HS, 5HS) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4S, 3F4S, 5F4S), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C

Na slici 44 prikazan je uticaj dodatka bioaktivnih peptida na broja živih ćelija mešane kulture u fermentisanom proizvodu na bazi surutke tokom 28 dana čuvanja u frižideru. Ono što se odmah primećuje sa slike 44 je različito ponašanje uzoraka tokom vremena, u zavisnosti od tipa peptida koji su dodati. Svi uzorci u koje je dodata frakcija hidrolizata imaju značajno povećanje ukupnog broja živih ćelija tokom prve dve nedelje čuvanja, tj. do 14. dana čuvanja. Nakon toga (treća i četvrta nedelja čuvanja), dolazi do smanjenja ukupnom broju živih ćelija. Najizraženije povećanje ukupnog broja živih ćelija 14. dana čuvanja zabeleženo je u uzorku 5F4S ($\Delta\log_{10} = 0,924$ CFU/mL), ali ovaj uzorak beleži i najveće smanjenje broja u daljem periodu čuvanja od $\Delta\log_{10} = -0,977$ CFU/mL u trećoj i četvrtoj nedelji. Jedino kontrola i 3F4S uzorak beleže manji ukupan broj živih ćelija na kraju perioda čuvanja u odnosu na 5F4S. Uzorci 1F4S i 3F4S iako su

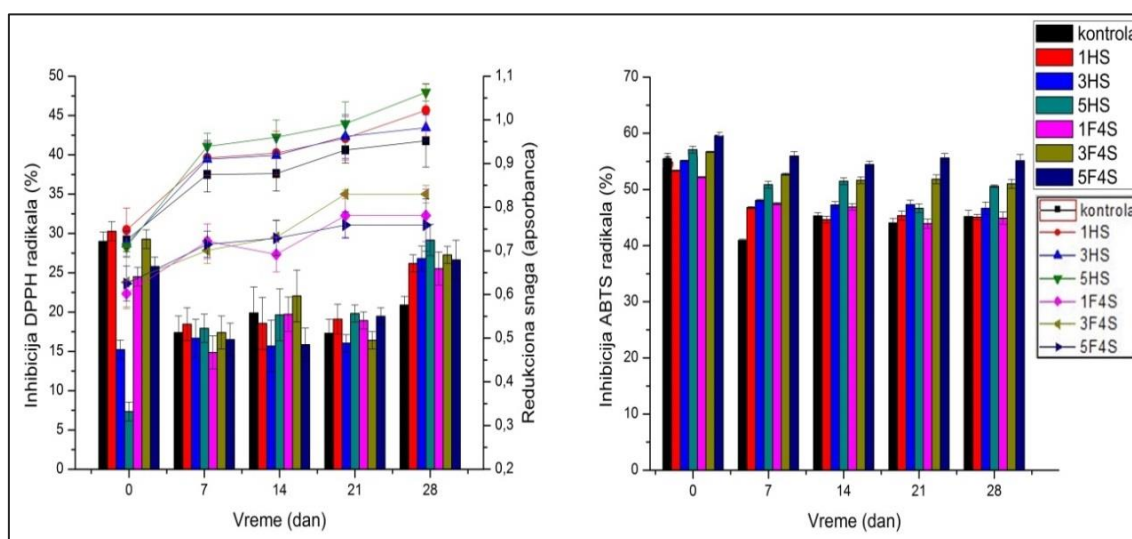
jedini pokazali značajno veći ukupan broj živih ćelija posle fermentacije u odnosu na kontrolu, beleže veći pad tog broja tokom čuvanja, tako da uzorak 3F4S pokazuje identičan broj živih ćelija kao kontrolni uzorak, a 1F4S svega 1,08 puta veći broj u odnosu na kontrolu. Uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata ostveruju drugačiju dinamiku preživljavanja tokom čuvanja, u odnosu na uzorke sa dodatkom frakcije. Svi uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata kao i kontrola beleže rast 7. dana čuvanja. Kontrola i 1HS beleže nagli rast 7. dana, a zatim smanjenje ukupnom broju sve do 21. dana čuvanja, kada ponovo dolazi do povećanja ukupnog broja živih ćelija. Uzorci 3HS i 5HS pokazuju znatno manje varijacije u broju živih ćelija tokom prvih 21 dan (za 3HS), odnosno 14 dana (za 5HS), a zatim beleže povećanje ukupnog broja živih ćelija. Vano je napomenuti da svi uzorci sa dodatkom proteina i peptida surutke izuzev 1F4S i 3F4S beleže povećanje ukupnog broja živih ćelija tokom čuvanja i svi uzorci osim 3F4S pokazuju veći ukupan broj živih ćelija od kontrolnog uzorka.



Slika 45. Titracijska kiselost odnosno pH vrednost fermentisanog napitka na bazi surutke sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HS, 3HS, 5HS) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4S, 3F4S, 5F4S), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C

Promena titracijske kiselosti i pH vrednosti uzoraka tokom čuvanja prikazana je na slici 45. Kao što se može videti sa slike uglavnom se zadržao odnos vrednosti pH i titracijske kiselosti uzoraka 28. dana kao i nultog dana čuvanja. Svi uzorci pokazali su porast

titracijske kiseline u prvih 14 dana čuvanja, a nakon toga blagi porast ili stagnaciju ovog parametra. Kontrola zadržava najnižu titracijsku kiselinu koja nakon 28 dana čuvanja ($23,6 \pm 0,1$ °SH), što predstavlja povećanje od $5,6$ °SH. Sličnu promenu u proseku, imali su i ostali uzorci gde su svi uzorci sa dodatkom ukupnog hidrolizata pokazali titracijsku kiselinu od $25,2 \pm 0,1$ °SH nakon 28 dana čuvanja, a uzorci sa dodatkom frakcije hidrolizata u proseku $24,5 \pm 0,1$ °SH. Isti trend zabeležen je i kod pH vrednosti, koja ima najveći pad u prvih 7 dana čuvanja, nakon čega ima blagi pad ili stagnaciju. Kontrola je zadržala najvišu pH vrednost u odnosu na ostale uzorke i nakon 28 dana čuvanja. U odnosu na nulti dan odnosno vrednost nakon fermentacije pH vrednost kontrole se smanjila za $0,23$ jedinice. Uzorci sa dodatkom bioaktivnih peptida imali su u proseku pad od $0,29$ jedinica, gde je najveći pad od $0,33$ jedinica zabeležen u uzorku 5HS, koji pokazuje i najvišu titracijsku kiselinu i najveći ukupan broj živih ćelija nakon 28 dana čuvanja u frižideru.



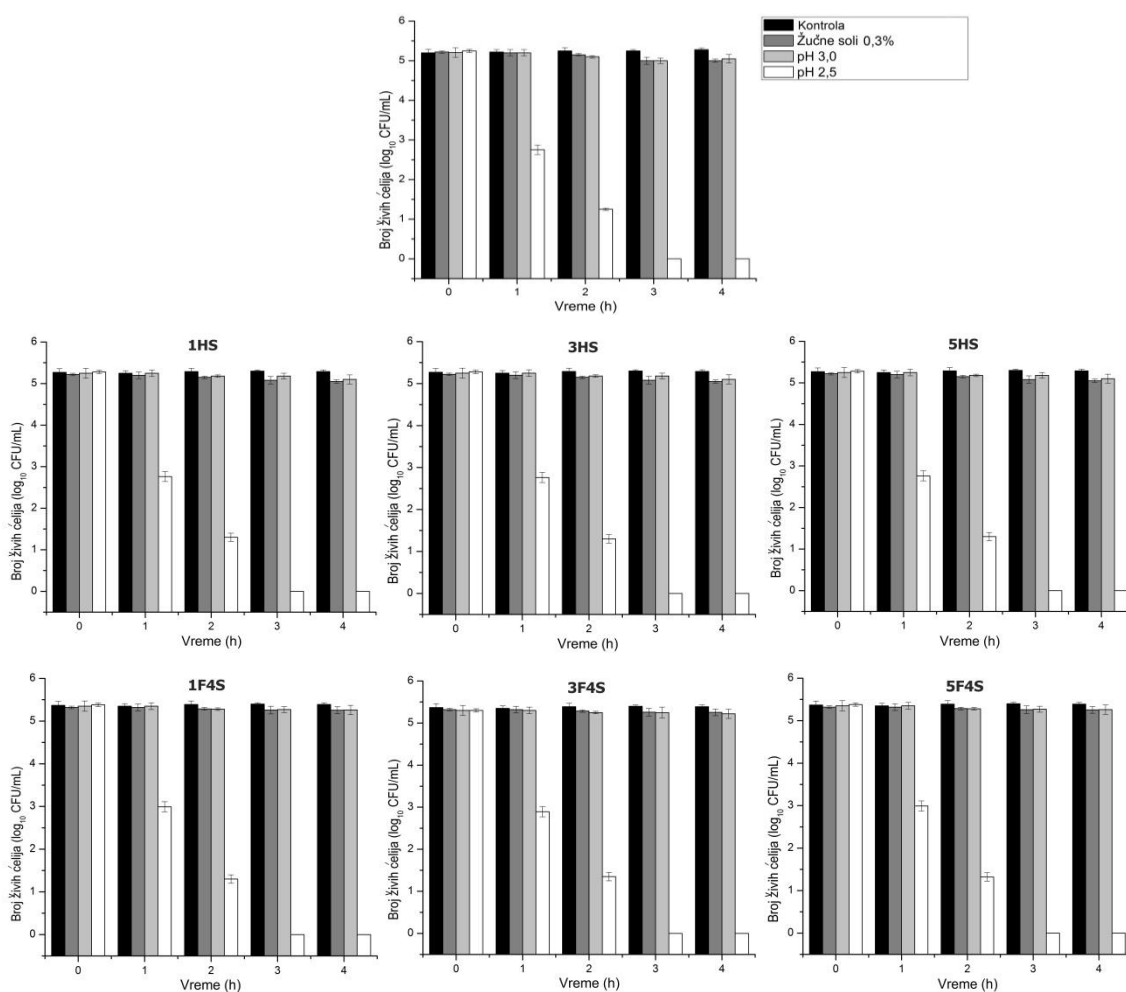
Slika 46. Antioksidativna aktivnost fermentisanog napitka na bazi surutke sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 %, 3 % i 5 % (1HS, 3HS, 5HS) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa (1F4S, 3F4S, 5F4S), kao i kontrole – uzorak bez dodatih peptida, tokom 28 dana čuvanja na 4 °C, računata preko inhibicije DPPH radikala, redukcionog snage i inhibicije ABTS radikala

Na slici 46 prikazana je promena antioksidativne aktivnosti uzoraka tokom čuvanja u frižideru u trajanju od 28 dana i to pomoću metoda: inhibicije DPPH radikala opisana u

Odeljku 3.2.11.6.3.4.1., FRAP opisane u odeljku 3.2.11.6.3.4.3. i inhibicije ABTS radikala opisana u odeljku 3.2.11.6.3.4.2. Inhibicija DPPH radikala pokazuje različite promene vrednosti tokom čuvanja. Najvišu vrednost inhibicije DPPH radikala nakon 28 dana čuvanja pokazuje uzorak 5HS ($29,15 \pm 2,0$ %), koji ujedno pokazuje i najveće povećanje u odnosu na inhibiciju nultog dana čuvanja. Ostali uzorci sa dodatkom peptida i proteina surutke iako pokazuju različito povećanje (3HS, 1F4S, 5F4S) odnosno smanjenje (1HS, 3F4S) inhibicije DPPH radikala, imaju veoma ujednačenu vrednost 28. dana (prosečno $26,2 \pm 1,3$ %). Kontrola koja je imala jednu od većih vrednosti nultog dana $28,99 \pm 1,2$ % nakon 28 dana vrednost pada na $20,9 \pm 1,1$ %, dok uzorci sa dodatkom peptida koji su nultog dana takođe imali više vrednosti inhibicije DPPH radikala imaju znatno manji pad inhibicije od kontrole, što je posledica prisustva bioaktivnih peptida. Inhibicija ABTS radikala kod svih uzoraka pokazuje smanjenje tokom čuvanja. Kontrola, 1HS i 1F4S imaju gotovo identične vrednosti kako nultog tako i 28. dana čuvanja. Uzorak 3HS pokazuje manji pad inhibicije ABTS radikala u odnosu na kontrolni uzorak, što dovodi do više vrednosti inhibicije za 1,5 % (odnosno 1,04 puta) u odnosu na kontrolu, nakon 28 dana čuvanja. Uzorak 5HS pokazuje manji pad inhibicije ABTS radikala kako od kontrolnog uzorka tako i od uzoraka 1HS i 3HS, pa 28. dana čuvanja pokazuje 1,13 puta višu vrednost u odnosu na kontrolni uzorak. Uzorci sa dodatkom 3,0 % i 5,0 % frakcije hidrolizata pokazuju manji pad inhibicije ABTS radikala (oko 5,0 %) od kontrole i uzoraka sa dodatkom ukupnog hidrolizata koji su imali pad u proseku oko 8,5 % (izuzev 5HS). Najvišu vrednost inhibicije ABTS radikala 28. dana čuvanja poseduje uzorak 5F4S, (1,22 puta višu od kontrolnog uzorka), a zatim uzorci 3F4S i 5HS (1,13 puta višu vrednost od kontrolnog uzorka). Redukciona snaga je antioksidativna karakteristika koja kod svih uzoraka raste tokom čuvanja i očekivano je najviša kod uzoraka sa dodatkom ukupnog hidrolizata. Najvišu vrednost pokazuje uzorak 5HS koji pokazuje i najvišu vrednost inhibicije DPPH radikala, drugu najvišu vrednost inhibicije ABTS radikala i najveći ukupan broj živih ćelija 28.dana čuvanja. Dodatak frakcije hidrolizata očigledno je nepovoljno uticao na redukcionu snagu, jer svi uzorci sa dodatkom frakcije hidrolizata kako tokom fermentacije, tako i tokom i nakon čuvanja pokazuju znatno nižu vrednost od kontrolnog uzorka.

4.2.1.2.2.3. Uticaj dodatka bioaktivnih peptida surutke na probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke

Komercijalna jogurtna kultura korišćena u ovom radu sadrži dva probiotska soja *L. acidophilus* i *B. bifidum* u Odeljku 3.2.11.6.3.7. opisana je metoda određivanja preživljavanja ove probiotske kulture u uslovima koji vladaju u želucu i dvanaestopalačnom crevu (niska pH i prisustvo žučne soli).



Slika 47. Ukupan broj živih ćelija dva probiotska soja *L. acidophilus* i *B. Bifidum* nakon fermentacije mleka ABY 6 kulturom za uzorke bez dodatka peptida KS, sa dodatkom hidrolizata proteina surutke (dobijenog hidrolizom pomoću proteinaze k) od 1 % (1HS), 3 % (3HS) i 5 % (5HS) i frakcije hidrolizata koja sadrži peptide molekulske mase ispod 3 kDa od 1 % (1F4S), 3 % (3F4S), 5 % (5F4S), tokom 4h inkubaciju u MRS bujonu sa dodatkom 0,3% goveđe žuči, podešenom pH na 3,0 odnosno 2,5. Kontrola je MRS bujon bez dodatka sa pH vrednosti oko 6,5

Na slici 47 je prikazan broj živih ćelija probiotske kulture tokom vremena od 4,0 h pri različitim uslovima koji simuliraju uslove u gastrointestinalnom traktu. Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 2,5 počevši od nultog sata zabeleženo je intenzivno odumiranje ćelija u odnosu na početni broj. Probiotska kultura ima u proseku 60,0 % preživljavanje nakon prvog sata pri pH 2,5 (pH vrednost koja vlada u želucu), a nakon drugog sata taj broj je jednak nuli u svim uzorcima. Dobijeni rezultati ukazuju da tip i količina dodatih bioaktivnih peptida ne utiče na broj živih ćelija pri pH vrednosti 2,5. Tokom ispitivanja sposobnosti preživljavanja mešane kulture sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* pri uslovima pH 3,0 tokom 4,0 h zabeleženo je veoma blago odumiranje ćelija u odnosu na početni broj. Preživljavanje probiotskih sojeva kod svih uzoraka iznosilo je oko 98,2 %, nakon 2,0 h inkubacije, odnosno 97,1 % nakon 4,0 h inkubacije. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da ni u ovom slučaju nije bilo značajnih odstupanja u broju živih ćelija u zavisnosti od tipa i količine dodatih peptida. Dodatak goveđe žuči od 0,3 % simulira uslove koji vladaju u dvanaestopalačnom crevu. Ukupan broj živih ćelija zabeležen nakon 2,0 h inkubacije u prisustvu 0,3 % goveđe žuči iznosio je oko 97,8 % u odnosu na početni broj, kod svih uzoraka, a nakon 4,0 h broj živih ćelija bio je identičan broju zabeleženom u drugom satu.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da dodatak bioaktivnih peptida kao ni tip ili koncentracija istih, pre samog procesa fermentacije ne utiče na procenat preživljavanja probiotske kulture u simuliranim uslovima koji vladaju u gastrointestinalnom traktu.

4.2.1.2.3. Zaključak

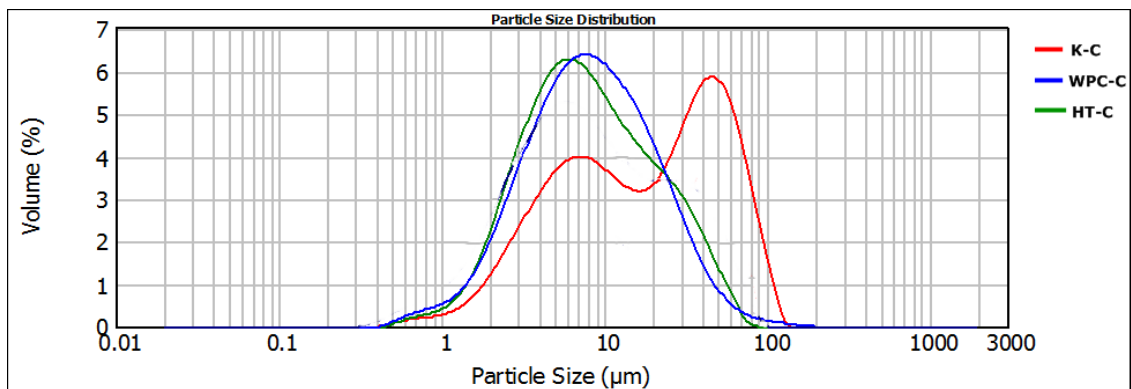
Analizirajući rezultate dobijene praćenjem fermentacije, čuvanja i preživljavanja (probiotskog svojstva) uzoraka mleka i surutke sa dodatkom frakcije hidrolizata i ukupnog hidrolizata surutke zaključujemo da dodatak bioaktivnih peptida u mleko ne doprinosi povećanju broja živih ćelija nakon 3h i 45 min fermentacije, već dovodi do blagog pada broja živih ćelija kod svih uzoraka osim 1HJ i 1F4J što je u skladu sa literaturom (Lucas i sar., 2004). Međutim, dodatak istih tih peptida u fermentacioni

supstrat koji sarži 30,0 % mleka i 70,0 % surutke pre fermentacije, pod identičnim uslovima, dovodi do povećanja broja živih ćelija nakon fermentacije pogotovo kod uzoraka sa dodatkom peptida manjih od 3kDa, a u odnosu na kontrolni uzorak. Ovo povećanje se ogleda upravo u povećanju broja živih ćelija soja *S. thermophilus* i objašnjava se povećanom potrebom BMK za peptidima i aminokiselinama kada je fermentacioni supstrat siromašniji proteinima u odnosu na mleko. Takođe, dodatak bioaktivnih peptida utiče na povećanje metaboličke aktivnosti kulture u oba supstrata (mleko i mleko + surutka) što se ogleda u izraženijem padu pH i povećanju titracijske kiselosti. Dodatak bioaktivnih peptida surutke utiče na povećanje antioksidativnog kapaciteta proizvoda kao i ACE inhibitorne aktivnosti proizvoda u slučaju oba fermentaciona supstrata (mleko kao i kombinacija mleko + surutka). Stabilnost proizvoda je takođe unapređenja dodatkom bioaktivnih peptida surutke, jer dodatak bioaktivnih peptida utiče povoljno na stabilnost proizvoda odnosno na broj živih ćelija tokom čuvanja fermentisanog proizvoda (na bazi mleka kao i na bazi surutke), ali i na stabilnost antioksidativnog kapaciteta tokom 28 dana u frižideru. Što se tiče preživljavanja probiotskih sojeva u uslovima niske pH i prisustva žučnih soli ono je ostalo nepromenjeno kod svih uzoraka.

Iz dobijenih rezultata možemo zaključiti da je obogaćivanje fermentisanih proizvoda bioaktivnim peptidima dobar način poboljšanja funkcionalnosti, ali i stabilnosti proizvoda. Analizom dobijenih rezultata moguće je izvesti sledeća preporuka. Ukoliko želimo poboljšati funkcionalna svojstva proizvoda u vidu antioksidativnog kapaciteta kao i ACE inhibitorne aktivnosti, dodatak bioaktivnih peptida bolje je sprovesti nakon završene fermentacije, s obzirom da je tokom fermentacije prisutna potrošnja bioaktivnih peptida od strane BMK, što dovodi do smanjenja bioaktivnosti krajnjeg proizvoda.

4.2.1.3. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na kvalitet mlečne čokolade

Dodatak proteina i peptida od 6,0 % (m/m) računato na ukupnu čokoladnu masu utiče na funkcionalne i tehnološke karakteristike čokolade. Raspodela veličina čestica je ključna osobina reoloških svojstva čokolade sa direktnim uticajem na senzorna svojstva.

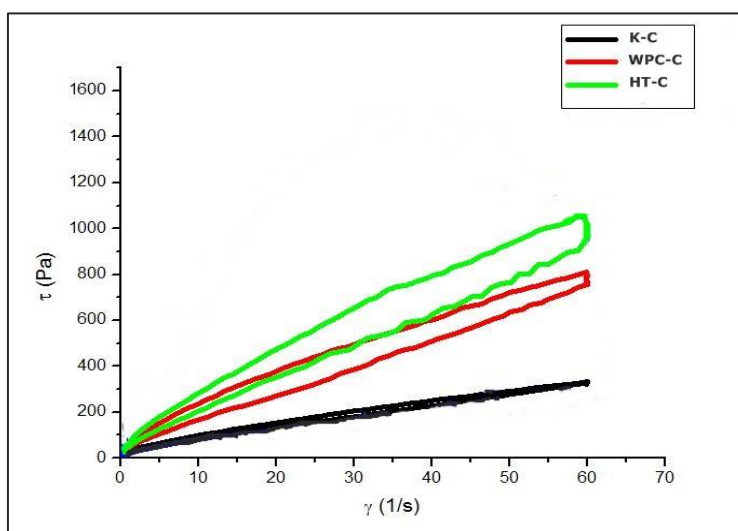


Slika 48. Raspodela čestica čokolade bez dodatka (K-C), čokolade sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolade sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C)

Kontrolni uzorak ima pravilnu zapreminsku raspodelu veličine čestica karakterističnu za mlečne čokolade dobijene standardnim postupkom (sitnjenje na petovaljku i končiranje 24 h). Uzorak K-C ima bimodalnu raspodelu, takvu da je prisutno 40,0 % sitnih i 60,0 % krupnih čestica. Oblik krivih je u skladu sa literaturnim podacima (Bolenz i sar., 2014). Dodatak hidrolizata (WPC i HT) doveo je do stvaranja još jedne faze u složenoj reološkoj strukturi mlečne čokoladne mase. Sa slike 48 se uočava značajna promena u raspodeli čestica u uzorcima sa dodatkom proteina i peptida surutke. Zbog prisustva hidrolizata koji usložnjavaju strukturu, kriva raspodele kod WPC-C i HT-C prelazi u širu monomodalnu raspodelu. Uzorci HT-C i WPC-C pokazuju prisustvo čestica vrlo bliskih dimenzija. Srednja vrednost prečnika čestica uzoraka sa dodatkom proteina surutke (HT-C i WPC-C) je 2,25 puta manja od srednje vrednosti prečnika čestica kontrolnog uzorka. Čak 50,0 % ispitivanog uzorka čokolade bez dodatka ima čestice prečnika do 18,763 µm, za razliku od uzorka sa dodatkom proteina i peptida surutke kod kojih 50,0 % ispitivanih uzorka ima čestice manje od 8,152 µm za WPC-C odnosno 7,704 µm za HT-C. Ta razlika ponavlja se i kod parametra d(0,1) gde 10,0 % zapremine uzorka poseduje čestice manje od 3,332 µm kod kontrolnog uzorka, dok je kod uzorka WPC-C i HT-C dimenzija tih čestica 2,502 µm.

Tabela 15. Parametri veličine čestica mlečne čokolade sa dodatkom proteina, kontrolni uzorak bez dodatka (K-C), uzorak sa dodatkom nehidrolizovanih proteina surutke (WPC-C), uzorak sa dodatkom proteina surutke hidrolizovanih pomoću tripsina (HT-C)

| Uzorci | Parametri veličine čestica | | | | | |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------|--|
| | d(0.1) (μm) | d(0.5) (μm) | d(0.9) (μm) | d _{sr} (μm) | Span | Specific surface area (m^2/g) |
| K-C | 3,332 | 18,763 | 66,288 | 27,957 | 3,355 | 0,742 |
| WPC-C | 2,502 | 8,152 | 26,587 | 12,336 | 2,954 | 1,14 |
| HT-C | 2,502 | 7,704 | 29,767 | 12,381 | 3,539 | 1,13 |



Slika 49. Krive proticanja čokoladnih masa: čokolada bez dodatka (K-C), čokolada sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolada sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C)

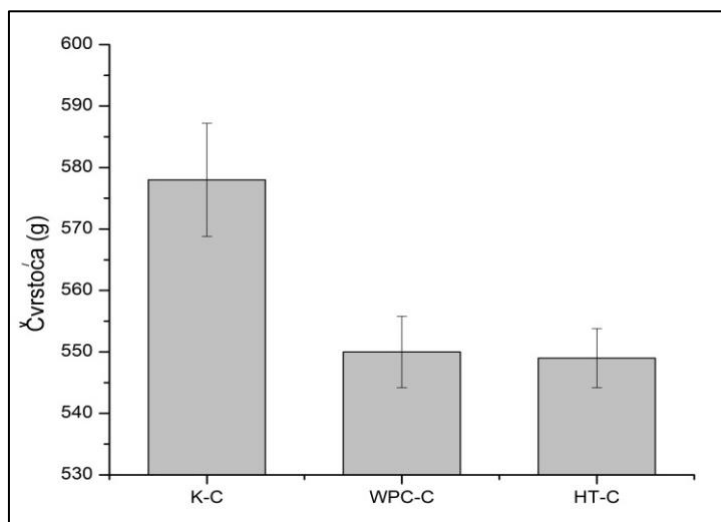
Tabela 16. Reološka svojstva mlečne čokolade u zavisnosti od vrste dodatih proteina: čokolada bez dodatka (K-C), čokolada sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolada sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C)

| | Prinosni napon po Casson-u, Pa | Viskozitet po Casson-u, Pas | Povrsina tiksotropne petlje, Pa/s |
|--------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| K-C | 12,81 | 3,53 | 1073 |
| WPC-C | 20,08 | 9,171 | 5499 |
| HT-C | 23,40 | 11,89 | 8608 |

Čokoladna masa proizvodi se sastavljanjem, mlevenjem i končiranjem osnovnih sirovina: kakao mase, šećera u prahu, kakaomaslaca, mleka u prahu i lecitina. Ona predstavlja grubu suspenziju čestica šećera u prahu, mleka u prahu i nemasnih kakao čestica u kakao maslacu kaodisperznom sredstvu (Pajin, 2014). Čokoladna masa je nenjutnovski fluid koji pokazuje plastično proticanje i ima karakteristični prinosni napon koji predstavlja silu koju je neophodno primeniti kako bi čokoladna masa počela da protiče. Kontrola viskoznosti čokoladne mase je neophodna budući da direktno utiče na kvalitet i cenu finalnog proizvoda, a zavisi od sirovinskog sastava i raspodele veličina čvrstih čestica u suspenziji čvrstih čestica u masnoj fazi (Afoakwa i sar., 2008). Površina tiksotropne petlje je merilo gubitka energije veza koje su razrušene tokom smicanja, a takođe je i merilo tiksotropnih promena unutar datog sistema.

Rezultati pokazuju značajnu razliku u reologiji čokoladne mase u zavisnosti od vrste dodatih proteina. Najhomogeniju strukturu, sa najnižim vrednostima prinosnog napona, viskoziteta po Casson-u i površine tiksotropne petlje ima čokolada bez dodataka. Uzorak sa dodatkom hidrolizata ima veća odstupanja u odnosu da uzorak sa nehidrolizovanim proteinima surutke. Razlika u veličinama površina tiksotropnih petlji tri uzorka je jasno uočljiva na slici 49. Veličina tiksotropne petlje zavisi od sastojaka čokoladne mase, udela masti, temperature prerade kao i jačine upotrebljene sile pri mešanju (Afoakwa i sar., 2008). Sve čokoladne mase ispitivane u ovom radu imaju isti početni sastav i prošle su identičan tretman obrade. Razlika u reološkim svojstvima posledica je isključivo prisustva različitih proteinskih dodataka u uzorcima. Dodaci peptida i proteina surutke uticali su na pakovanje čestica. Čvrste čestice nisu zauzele pravilno mesto u kristalnoj rešetci, što je dovelo do različitih međumolekulskih povezivanja i rasta prinosnog napona i viskoznosti. Dodatak hidrolizata ima značajan uticaj na reologiju čokoladne mase i povećava tiksotropnu petlju 8,02 puta u odnosu na kontrolni uzorak, a 1,57 puta u odnosu na WPC-C. Uzorak sa dodatkom WPC-a povećava tiksotropnu petlju 5,12 puta u odnosu na kontrolu. Dodatkom hidrolizata proteina surutke u čokoladnu masu viskozitet se povećao 3,37 puta, dok se dodatkom WPC-a povećao 2,60 puta u odnosu na kontrolu. Važno je napomenuti da dodatak peptida i proteina surutke utiče više na viskoznost, nego na prinosni napon, a povećanje viskoznosti može biti umanjeno boljim izborom emulgatora. Na slici 50 prikazani su rezultati ispitivanja čvrstoće čokoladne mase (Odeljak 3.2.11.8.2.). Čvrstoće ispitivanih

uzoraka su približne i može se konstatovati da dodatak hidrolizata ne utiče bitno na tekstuometriju.



Slika 50. Čvrstoća mlečne čokolade u zavisnosti od vrste dodatka: kontrolni uzorak bez dodatka (K-C), čokolada sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolada sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C).

4.2.1.3.1. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na antioksidativni kapacitet mlečne čokolade

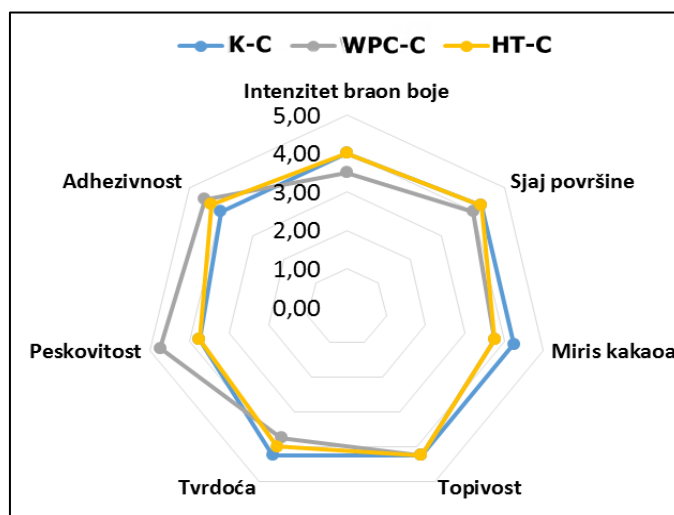
Tabela 17. Antioksidativni kapacitet mlečne čokolade u zavisnosti od vrste dodatka: kontrolni uzorak bez dodatka (K-C), čokolada sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolada sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C), neposredno nakon vađenja uzoraka iz kalupa i nakon 2 meseca čuvanja uzoraka na 20 °C.

| Uzorak | Vreme, mesec | Ukupni polifenoli, g _{GAE} /g _{čokolada} | ABTS test, % | DPPH test, % |
|--------------|--------------|--|--------------|--------------|
| K-C | 0 | 8,771 ± 0,560 | 48,46 ± 2,11 | 48,07 ± 2,80 |
| | 2 | 9,320 ± 0,440 | 50,11 ± 2,52 | 49,21 ± 2,52 |
| WPC-C | 0 | 10,121 ± 0,673 | 51,01 ± 2,24 | 46,43 ± 4,17 |
| | 2 | 9,815 ± 0,350 | 53,30 ± 1,99 | 48,25 ± 3,50 |
| HT-C | 0 | 10,078 ± 0,968 | 66,30 ± 1,99 | 56,34 ± 3,20 |
| | 2 | 10,882 ± 0,480 | 69,90 ± 1,52 | 72,04 ± 4,10 |

U tabeli 17 su prikazana antioksidativna svojstva mlečne čokolade u zavisnosti od vrste dodatka. Dodatak proteina i peptida surutke (WPC-a i HT-a) povećava sadržaj ukupnih polifenola 1,15 puta. Inhibicija ABTS radikala se povećala 1,37 puta dodatkom hidrolizata, dok dodatak WPC-a nije značajno uticao na ovo svojstva uzorka. DPPH test je pokazao povećanje inhibicije DPPH radikala dodatkom HT-a (1,17 puta), dok dodatak WPC-a nije pokazao značajnu promenu ovog parametra. Nakon 2 meseca čuvanja mlečne čokolade na 20 °C u uzorcima sa dodatkom proteina i peptida surutke došlo je do povećanja antioksidativnih svojstava. Ukupan sadržaj polifenola kao i inhibicija ABTS radikala nisu pokazali statistički ($p < 0,05$) značajne promene, dok je inhibicija DPPH radikala u uzorku HT-C pokazala povećanje od 1,28 puta u odnosu na početnu vrednost, a oko 1,46 u odnosu na K-C i WPC-C uzorke.

4.2.1.3.2. Uticaj dodatka proteina i peptida surutke na senzorna svojstva mlečne čokolade

Za prikaz senzorne ocene uzoraka korišćen je grafik „paukova mreža“ koji se u kombinaciji sa QDA metodom pokazao kao najoptimalniji prikaz senzornih ocena.



Slika 51. Senzorna analiza mlečne čokolade sa različitim dodacima: kontrolni uzorak bez dodatka (K-C), čokolada sa dodatkom proteina surutke (WPC-C) i čokolada sa dodatkom hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (HT-C)

Sa slike 51 se uočava da ne postoje značajana odstupanja u senzornim svojstvima uzoraka. Dodatak HT utiče na senzorna svojstava mlečne čokolade tako da ne postoji

odstupanje veće od 0,25 boda (na skali od 1 do 7), dok čokolada sa dodatkom WPC-a pokazuje odstupanja od 0,5 u najvećem broju slučajeva, a ocena adhezivnosti je pogoršana za 1,0 bodova. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su uzorci sa dodatkom proteina i peptida surutke kao i kontrolni uzorak ocenjeni zadovoljavajućim ocenama, bez značajnih razlika.

4.2.1.3.3. Zaključak

Mlečna čokolada sa dodatkom proteina i peptida surutke pokazuje značajna odstupanja u reološkim svojstvima u odnosu na kontrolni uzorak (mlečna čokolada bez dodatka). Dodatak hidrolizata uzrokuje veća odstupanja u reološkim svojstvima čokoladne mase, u odnosu na WPC, što je i očekivano usled znatno većeg prisustva peptida male molekulske mase. Ipak, ispitivanje čvrstoće uzoraka nije pokazalo značajne promene u vrednostima kod uzoraka sa različitim dodacima. Senzorna analiza pokazuje da dodatak peptida i promena reoloških svojstava i raspodele veličina čestica čokoladne mase nije uticala na značajnu promenu senzorne ocene kod konzumenata. Antioksidativni kapacitet mlečne čokolade je znatno uvećan dodatkom proteina i peptida surutke, pri čemu je uzorak HT-C pokazao 1,37 puta veću inhibiciju ABTS radikala i 1,17 puta veću inhibiciju DPPH radikala u odnosu na kontrolni uzorak,. Takođe, ovaj uzorak pokazao je i rast inhibicije DPPH radikala (1,28 puta) tokom čuvanja u vremenu od 2 meseca na 20 °C.

Iz svega navedenog može se zaključiti da dodatak hidrolizata proteina surutke dobijen pomoću tripsina, predstavlja dobar izbor za obogaćivanje mlečne čokolade, s obzirom da značajno doprinosi funkcionalnosti proizvoda, a minimalno utiče na senzorna svojstva proizvoda.

4.2.2. Primena proteina surutke kao nosača za inkapsulaciju mešane probiotske kulture pri proizvodnji fermentisanog proizvoda na bazi surutke

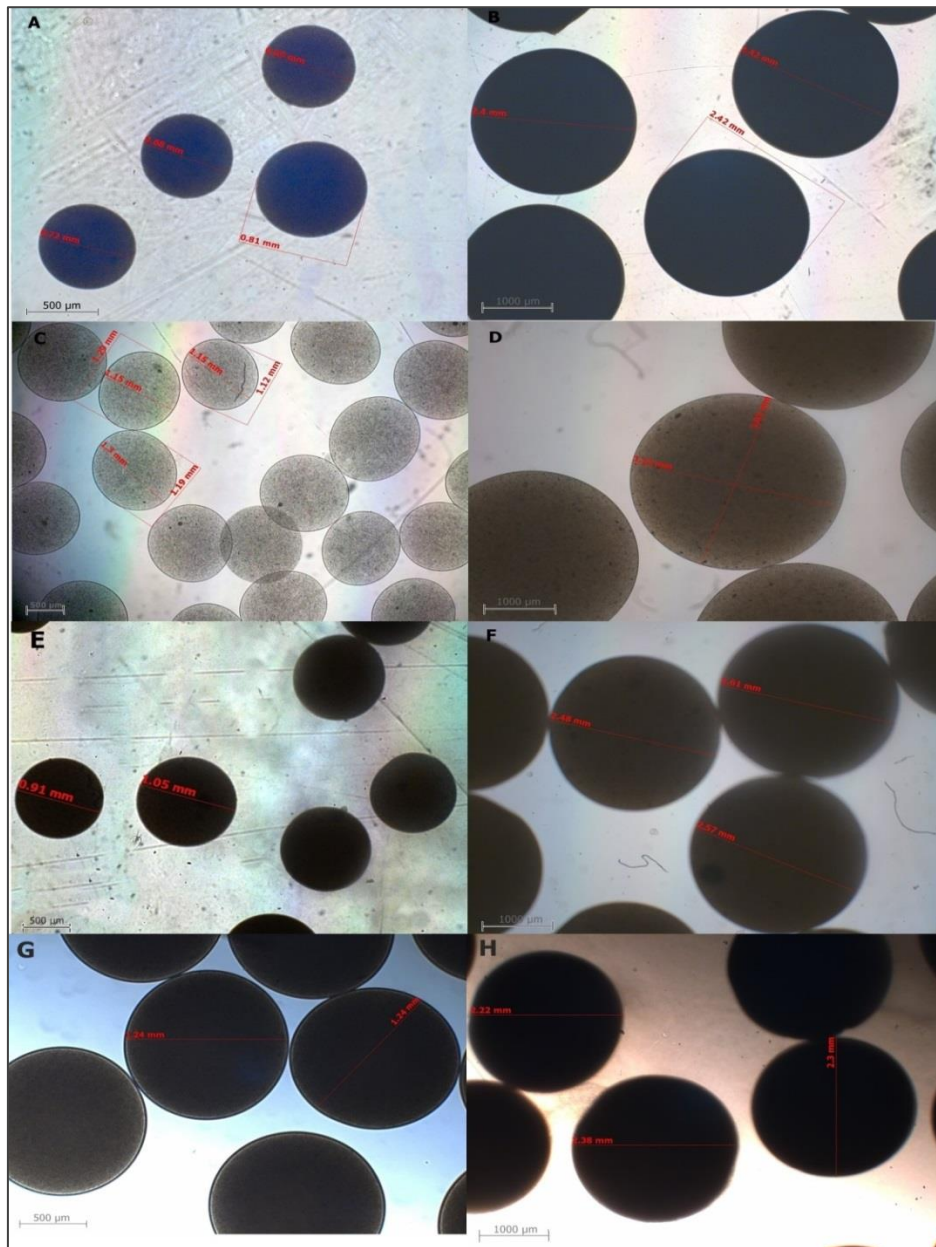
Inkapsulacija probiotskih kultura u ovom radu, korišćena je u cilju poboljšanja stabilnosti i probiotskog svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke.

4.2.2.1. Uticaj dodatka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za imobilizaciju mešane probiotske kulture na karakterisitke čestica i fermentativnu aktivnost kulture

Inkapsulacija ABY 6 kulture, vršena je pomoću 4 tipa nosača. Pomoću ekstruzione metode i električnog napona dobijene su čestice različitih dimenzija i sastava: alginatne čestice (male ALG i veće ALGV) metoda opisana u Odeljku 3.2.11.4.2. odnosno Odeljku 3.2.11.4.2.1., alginatne čestice obložene hitozanom (male AH i veće AHV) metoda opisana u Odeljku 3.2.11.4.2.3., čestice dobijene kombinacijom alginata i WPC-a (male AW i veće AWV) metoda opisana u Odeljku 3.2.11.4.2.2., čestice dobijene kombinacijom alginata i hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoć tripsina (male AHT i veće AHTV) metoda opisana u Odeljku 3.2.11.4.2.2. Dimenzije čestica određivane su po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.5.4. i prikazane na slici 52.

Čestice su globularnog oblika, različitih dimenzija u zavisnosti od metode. Na sve čestice primenjen je identičan elektrostatički napon (kod malih čestica), igla identičnih dimenzija i pumpa identične jačine pritiska. Alginatne čestice su najmanjih dimenzija u proseku $0,82 \pm 0,09$ mm, što je značajno manje (1,50 puta) od čestica obloženih hitozanom $1,23 \pm 0,10$ mm, pri čemu razlika u prečniku odgovara debljini sloja hitozana koji oblaže česticu. Čestice AW su zbog nešto većeg viskoziteta nosača, dimenzija $0,98 \pm 0,07$ mm, što je 1,16 puta veći prečnik od alginatnih čestica, dok je srednji prečnik čestica AHT 1,49 puta veći od alginatnih čestica i iznosi $1,22 \pm 0,02$ mm. Velike alginatne čestice nisu najmanje od svih velikih čestica kao što je slučaj kod čestica malih dimenzija. Njihov sredni prečnik iznosi $2,42 \pm 0,07$ mm, dok je prečnika AHV $3,01 \pm 0,11$ mm. Ovde uočavamo da je kod velikih čestica prisutan deblji sloj hitozana ($0,59$ mm), za razliku od sloja hitozana na malim česticama koji ima debljinu $0,39$ mm. Čestice AWV imaju srednji prečnik $2,55 \pm 0,08$ mm što je 1,05 puta veće od srednjeg prečnika alginatnih čestica, dok je srednji prečnik AHTV $2,30 \pm 0,08$ mm, što je najmanji prečnik velikih čestica, od kojeg je prečnik alginatnih čestica 1,05 puta veći. Iz navedenih rezultata koji ukazuju na različit međusobni odnos dimenzija čestica na koje je delovao elektrostatički napon i onih na koje nije delovao i čije dimenzije zavise isključivo od viskoznosti matriksa možemo zaključiti da elektrostatički napon deluje različito na različite matrikse i da prisustvo velike količine peptida kod AHT čestica

dovodi do promena u svojstvima matriksa usled delovanja elektrostatičkog napona i do stvaranja većih čestica u odnosu na alginatne, dok je u slučaju velikih čestica alginatni matriks kao viskozni stvorio 1,05 puta veće čestice u odnosu na AHTV.



Slika 52. Male alginatne čestice (A), velike alginatne čestice (B), male alginatne čestice obložene hitozanom (C), velike alginatne čestice obložene hitozanom (D), male čestice dobijene kombinacijom alginata i WPC-a (E), velike čestice dobijene kombinacijom alginata i WPC-a (F), male čestice dobijene kombinacijom alginata i hidrolizata proteina surutke pomoću tripsina (G), velike čestice dobijene kombinacijom alginata i hidrolizata proteina surutke pomoću tripsina (H)

Fermentacija supstrata na bazi surutke vršena je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.5.1. i pri tome je korišćena sveža suruka dobijene iz pogona Imlek d.o.o. i mleko proizvođača Imlek d.o.o. sa 0,5 % mlečne masti (Odeljak 3.2.11.2.2. i Odeljak 3.2.11.2.3.). Fermentacija je vršena sa ciljem određivanja fermentacione aktivnosti inkapsulirane kulture. U tabeli 18 su prikazani parametri (broj živih ćelija, pH i titracijska kiselost) pre i posle fermentacije.

Tabela 18. Parametri fermentacije (broj živih ćelija, pH i titracijska kiselost) pre i posle fermentacije inkapsuliranim kulturama (male alginatne čestice – A, velike alginatne čestice – AV, male alginatne čestice obložene hitozanom – AH, velike alginatne čestice obložene hitozanom – AHV, male čestice dobijene kombinacijom alginata i WPC-a –AW, velike čestice dobijene kombinacijom alginata i WPC-a – AWW, male čestice dobijene kombinacijom alginata i hidrolizata proteina surutke pomoću tripsina –AHT, velike čestice dobijene kombinacijom alginata i hidrolizata proteina surutke pomoću tripsina – AHTV, kao i slobodnom kulturom – SK

| | Broj pre fermentacije log₁₀ CFU/g | Broj posle fermentacije log₁₀ CFU/g | Broj posle fermentacije izvan čestica, log₁₀ CFU/ml | pH* | Titracijska kiselost*, °SH |
|-------------|---|---|---|------------|-----------------------------------|
| SK** | 7,429±0,10 | 9,052±0,10 | / | 4,554±0,08 | 20,6±0,18 |
| A | 7,844±0,10 | 8,969±0,10 | 6,588±0,11 | 4,90±0,10 | 14,0±0,20 |
| AV | 8,001±0,12 | 8,366±0,15 | 6,034±0,12 | 4,99±0,08 | 12,0±0,20 |
| AH | 7,698±0,15 | 9,005±0,14 | 5,874±0,11 | 5,15±0,12 | 13,0±0,20 |
| AHV | 7,591±0,12 | 8,471±0,17 | 6,256±0,10 | 5,30±0,11 | 11,6±0,20 |
| AW | 7,449±0,11 | 8,970±0,16 | 7,055±0,12 | 4,85±0,10 | 15,4±0,20 |
| AWV | 7,665±0,15 | 8,961±0,19 | 7,187±0,16 | 5,20±0,10 | 11,2±0,20 |
| AHT | 7,654±0,14 | 9,203±0,16 | 7,102±0,14 | 5,02±0,11 | 13,6±0,20 |
| AHTV | 7,504±0,16 | 8,873±0,18 | 6,620±0,15 | 5,15±0,10 | 11,2±0,20 |

*pH vrednost supstrata za fermentaciju pre fermentacije iznosila je 6,31±0,08, a titracijska kiselost 4,20±0,20°SH

**Fermentacija slobodne kulture vršena je 4h, a broj živih ćelija je izražen kao log₁₀ CFU/mL

Fermentacija slobodnom kulturom odvija se znatno brže, a pH vrednost od 4,60 dostiže se već posle 4.0 h. Sve fermentacije sa inkapsuliranom kulturom tekle su znatno sporije i trajale su 5,5 h. Produženo vreme trajanja fermentacije je očekivano usled prisustva

barijere u vidu nosača koja usporava protok hranljivih materija iz fermentacionog supstrata do ćelija unutar čestica. Takođe, nosač utiče i na sporije oslobađanje produkata metabolizma iz čestica u fermentacioni supstrat. Povećanje broja živih ćelija po gramu čestice je znatno manje u velikim česticama nego u manjim. Ta razlika je najizraženija kod alginatnih čestica i čestica obloženih hitozanom. Kod alginatnih čestica $\Delta \log$ (razlika logaritma broja živih ćelija posle i pre fermentacije po gramu čestica) za male čestice iznosi $1,125 \log_{10}$ CFU/g, a za velike svega $0,365 \log_{10}$ CFU/g, što je čak 3,08 puta manji rast. U uzorku sa obloženim česticama te vrednosti su $1,307 \log_{10}$ CFU/g za male i $0,88 \log_{10}$ CFU/g za velike čestice. Kod obloženih čestica imamo statistički ($p < 0,05$) značajno veći rast u oba uzorka u poređenju sa alginatnim česticama, što može da se pripiše boljoj zaštiti ćelija unutar čvrstih i dodatno obloženih čestica. Kod čestica obloženih hitozanom rast kod malih čestica je 1,49 puta veći nego kod istih čestica većih dimenzija. Čestice koje pored 1,60 % alginata, sadrže u svom matriksu i 2,40 % proteina surutke ostvaruju statistički značajno bolji rast u oba uzorka, poredeći sa alginatnim i obloženim česticama. Rast u uzorku sa AW česticama tokom 5,5 h fermentacije je $1,521 \log_{10}$ CFU/g, a za čestice AWV je $1,296 \log_{10}$ CFU/g što je 1,17 puta veći rast u uzorku sa manjim česticama. Uzorak sa česticama koje umesto proteina surutke sadrže hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina, pokazuju bolje karakteristike od svih ostalih čestica. AHT ostvaruju rast od $1,549 \log_{10}$ CFU/g, a AHTV od $1,369 \log_{10}$ CFU/g, odnosno 1,13 puta veći rast u uzorku sa manjim česticama. Razlog boljeg rasta korišćene mešane kulture treba tražiti u izgledu i izgradnji korišćenog matriksa odnosno nosača. Čestice sa dodatkom proteina surutke imaju znatno veći broj slobodnih ćelija u fermentisanom proizvodu, što ukazuje na veći procenat curenja ćelija iz matriksa, odnosno postojanje većih pora matriksa. Curenje za AW je $19,70 \pm 0,78$ %, a za AWV je $23,50 \pm 0,89$ % (tabela 19). Međutim, u uzorcima sa česticama u čijem matriksu su proteini surutke zamenjeni hidrolizatom proteina surutke usled manjih peptidnih lanaca, stvaraju se i manje pore, pa je i curenje ćelija iz čestica značajno manje i za AHT iznosi $6,98 \pm 0,23$ %, a za AHTV $8,33 \pm 0,35$ % (tabela 19). Analizom pH vrednosti i titracijske kiselosti i poređenjem sa brojem živih ćelija može se stvoriti jasna slika o razmeni materija i nosača kao barijeri za istu. Najvišu vrednost pH i najnižu vrednost titracijske kiselosti imaju uzorci sa obloženim česticama koji imaju bolji rast ćelija od uzoraka sa A i AV česticama, ali slabiju

fermentativnu aktivnost (pH i titracijska kiselost) iz razloga snažnije barijere za protok materija usled dodatnog sloja u vidu hitozana. Bolju fermentativnu aktivnost od alginatnih i obloženih čestica pokazuju čestice sa proteinima surutke (pH je $4,85 \pm 0,10$, a titracijska kiselost $15,4 \pm 0,20$ °SH za AW i $5,20 \pm 0,10$, odnosno $11,2 \pm 0,20$ °SH za AWV) i hidrolizatom proteina surutke (pH je $5,02 \pm 0,11$, a titracijska kiselost $13,6 \pm 0,20$ °SH za AHT, odnosno $5,15 \pm 0,10$ i $11,2 \pm 0,20$ °SH za AHTV) što je u skladu sa prisutnim većim rastom odnosno ukupnim brojem živih ćelija koje vrše fermentaciju. Poređenjem rezultata za čestice sa proteinima surutke i hidrolizatom proteina surutke, može se primetiti da i pored većeg rasta i većeg broja živih ćelija kod AHT i AHTV čestica, parametri fermentacije (pH i Titracijska kiselost) su izraženiji kod AW i AWV čestica. Čestice AW i AWV imaju više vrenosti ova dva parametra usled velikog broja slobodnih ćelija u fermentacionom supstratu. Curenje živih ćelija iz čestica kod nosača sa proteinima surutke je u proseku oko 20 % što je znatno više od 6,98 % odnosno 8,33 % kod AHT tj. AHTV , dok je kod alginatnih i obloženih čestica ispod 5,3 %. Ovo ukazuje na veliki uticaj slobodne kulture na pH i titracijsku kiselost uzorka sa AW i AWV česticama koja čini 20 % ukupne kulture, dok je kod ostalih čestica taj procenat, a samim tim i uticaj znatno manji. Curenje ćelija iz čestica u našem slučaju ne predstavlja problem ukoliko je broj ćelija unutar samih čestica visok, što jeste slučaj. Alginatne, kao i obložene čestice imaju veoma mali procenta curenja od čestica sa proteinima surutke i hidrolizatom proteina surutke, ali i pored toga čestice AW, AWV, AHT i AHTV pokazuju znatno bolji rast tokom fermentacije i izraženiju fermentativnu aktivnost. Takođe, uzorci sa česticama manjih dimenzija u proseku oko 1,0 mm pokazuju bolje sve parametre fermentacije u odnosu na uzorke sa česticama veličine oko 2,6 mm. Dalje analize su iz navedenog razloga vršene samo na uzorcima sa česticama manjih dimenzija.

U tabeli 19 prikazana je čvrstina čestica pre i posle fermentacije. Iz prikazanih rezultata se može uočiti da čvrstina čestice izražena kroz silu koju je potrebno primeniti da bi se čestica deformisala 30 %, raste kod svih uzoraka nakon fermentacije. Alginatne čestice pokazuju najmanju čvrstoću kako pre tako i posle fermentacije, dok obložene čestice usled čvrstoće primenjenog hitozana pokazuju najviši stepen čvrstoće, ali i najmanji porast čvrstoće tokom fermentacije, što je posledica jake barijere i zaštite čestica od spoljne sredine u vidu omotača od hitozana. Čestice čiji nosač je građen od alginata i

proteina surutke, pokazuju veću čvrstoću od alginatnih čestica kao i veći porast čvrstoće tokom fermentacije. Čestice koje umesto proteina surutke sadrže hidrolizat proteina surutke pokazuju blago nižu čvrstoću pre fermentacije nego čestice sa nehidrolizovanim proteinima surutke, ali svakako veću čvrstoću od alginatnih čestica. Takođe, ove čestice pokazuju i veći porast čvrstoće tokom fermentacije, od alginatnih čestica, ali niži porast čvrstoće od čestica sa nehidrolizovanim proteinima surutke.

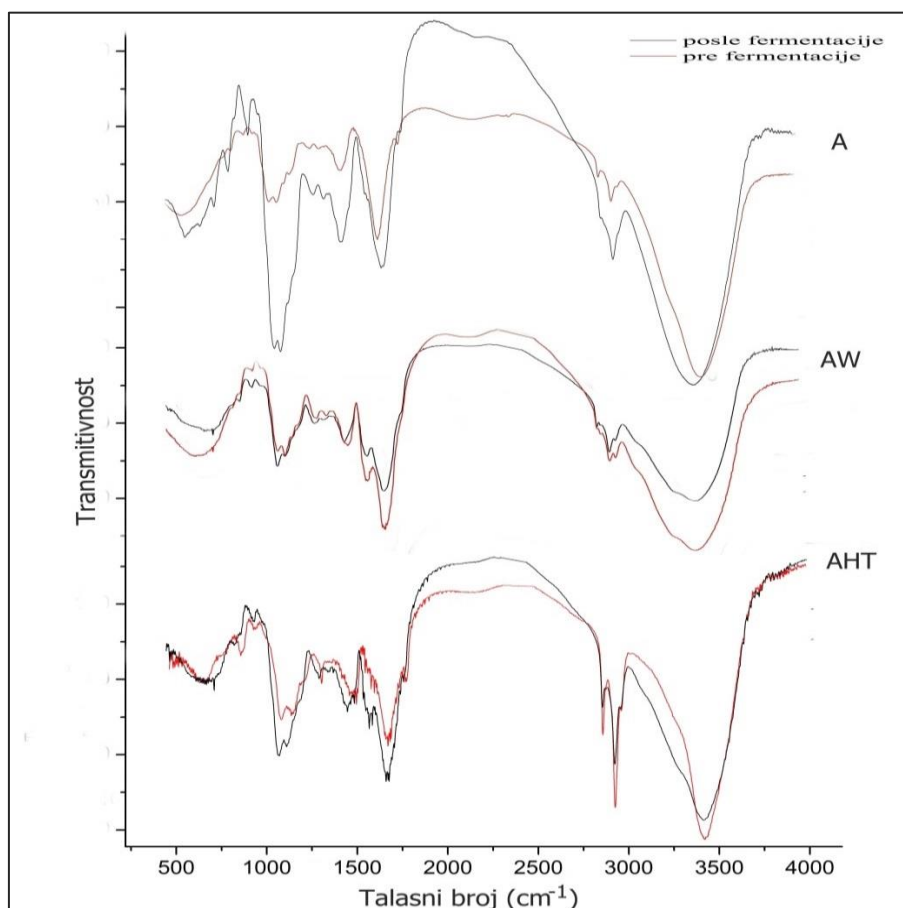
Tabela 19. Srednja vrednost čvrstine čestica odnosno maksimalne upotrebene sile do postizanja 30 % deformacije, pre i posle fermentacije surutke sa dodatkom mleka i curenje ćelija kulture iz čestica tokom procesa fermentacije

| | Maksimalna sila (30% deformacija) pre fermentacije, N | Maksimalna sila (30% deformacija) posle fermentacije, N | Curenje, % |
|-------------|---|--|--------------|
| A | 2,1741 ± 0,015 | 2,3841 ± 0,024 | 3,44 ± 0,19 |
| AV | | | 5,31 ± 0,28 |
| AH | 2,8731 ± 0,028 | 2,9632 ± 0,027 | 2,49 ± 0,18 |
| AHV | | | 5,12 ± 0,29 |
| AW | 2,3861 ± 0,041 | 2,9541 ± 0,057 | 19,70 ± 0,78 |
| AWV | | | 23,50 ± 0,89 |
| AHT | 2,3591 ± 0,021 | 2,781 ± 0,030 | 6,98 ± 0,23 |
| AHTV | | | 8,33 ± 0,35 |

Očvršćavanje čestice tokom fermentacije je posledica kako dodatnog očvršćavanja alginata usled prisustva jona Ca^{2+} u fermentativnom supstratu, tako i promena koje čestice trpe usled stvaranja različitih produkata metabolizma BMK, kao i promena samog matriksa usled promena okruženja u vidu pada pH, prisustva različitih minerala, kiselina, aldehida, aminokiselina i sl. Promene koje se dešavaju u samom matriksu tokom procesa fermentacije prikazane su na slici 53, a određene pomoću FT-IR analize.

Na spektru alginatnih čestica pre fermentacije je uočena široka traka sa pikom na 3256 cm^{-1} koja potiče od O–H istezanja hidrosilnih grupa. Ovaj pik se nakon fermentacije smanjuje i dodatno širi. Traka između 3000 i 2900 cm^{-1} koja potiče od C–H istezanja, oštra i malog intenziteta, se nakon fermentacije širi i pojačava intenzitet. Traka sa pikom na 1595 cm^{-1} koja potiče od asimetričnog COO– istezanja je srednje oštra i nakon fermentacije intenzitet joj se smanjuje. Traka sa pikom na 1408 cm^{-1} koja potiče od

simetričnog COO– istezanja blago pojačava intenzitet nakon fermentacije. Oštra traka sa pikom na 1081 cm^{-1} odgovara istezanju C–O–C mosta u cikličnoj strukturi natrijumalginata je znatno izraženija nakon fermentacije nego pre nje. (Sartori i sar., 2007; Lawrie i sar., 2007). Nakon fermentacije dolazi do pojave dva nova pika na 880 i 760 koja su verovatno posledica aktivnosti BMK.



Slika 53. FT-IR spektri alginatnih čestica (A), čestica čiji matriks čine alginat i proteini surutke (AW) i čestica čiji matriks čine alginat i hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina (AHT), pre i posle fermentacije

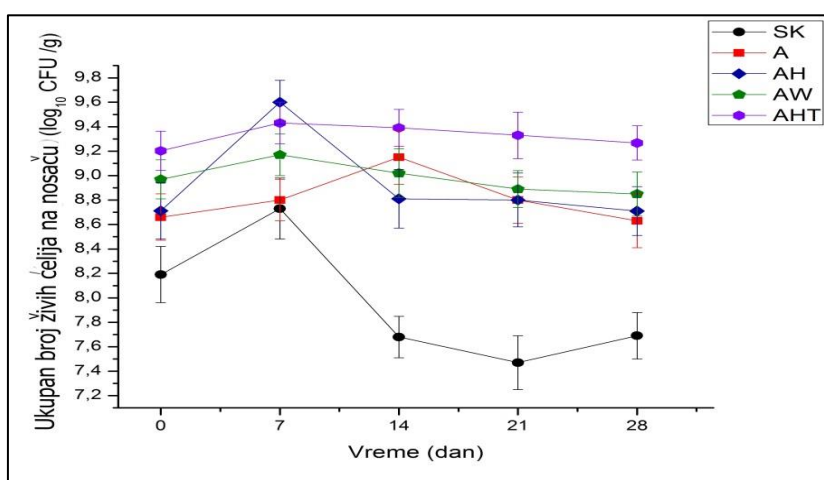
Kod FT-IR spektra AW i AHT prisutni su dodatni pikovi karakteristični za prisustvo proteina u uzorku. Pikovi između 1649 and 1658 cm^{-1} pripadaju trakama karakterisitim za α -heliks, i one su veoma blago uočljive kod AW i AHT uzorka. Trake između 1620 and 1635 cm^{-1} karakteristične su za β -ploče i uočljive su kod oba nosača sa proteinima. Kod AW čestica umesto trake na 1595 cm^{-1} prisutne kod alginatnih čestica, pojavljuje se najistaknutija traka proteina na 1640 cm^{-1} , posledica – C=O valencionih i –NH deformacionih vibracija amidne veze. Pik na 1553 cm^{-1} koji je

posledica istezanja amidne veze karakteristične za sve proteine, se drastično smanjuje nakon fermentacije. Ova pojava može se objasniti redukcijom prisutnih amidnih veza usled proteolitičkog karaktera BMK. U ovom spektru prisutne su i druge trake karakteristične za proteine (od 1220 do 1330 cm^{-1} koje su posledica istezanja C-N veze i savijanja N-H veze) na kojima nema značajnih promena pre i posle fermentacije (Rodriguez, 2015; Van der Ven i sat., 2002).

Čestica u kojima je pored alginata prisutan i hidrolizat proteina surutke poseduju veći broj izraženih traka. Trake na 2927 i 2848 cm^{-1} se pripisuju $-\text{CH}$ valencionim vibracijama iz $-\text{CH}_2$ i $-\text{CH}_3$ grupa koje su prisutne i kod A i AW čestica, ali su u njihovom slučaju veoma malog inteziteta. U AHT uzorku ove trake su jedne od dominantnijih što ukazuje na to da čine važan deo strukture matriksa, a tokom fermentacije njihov intezitet se dodatno povećava. Takođe, traka 1534 cm^{-1} koja potiče od C-N vibracionog istezanja javlja se izraženije tek nakon fermentacije, dok traka 1259 cm^{-1} koja se javlja pre fermentacije, gotovo da nestaje nakon fermentacije, a predstavlja N-H vibracionu deformaciju. Traka 1450 cm^{-1} pre fermentacije prelazi na 1405 cm^{-1} posle fermentacije, a predstavlja $-\text{COO}$ simetrično istezanje. Pored trake na 1082 cm^{-1} kod AHT čestica javlja se traka 1023 cm^{-1} koja se spaja sa 1082 cm^{-1} i zajedno predstavljaju C–O–C asimetrično istezanje. Nakon fermentacije, obe trake su izraženije. Traka na 1744 cm^{-1} upućuje na istezanje aldehidne karbonilne grupe koja nakon fermentacije gotovo da nestaje. Promena prisutva i inteziteta traka u oblasti od 1640 cm^{-1} do 1200 cm^{-1} koja je upravo karakteristična za proteine (Rodriguez, 2015), ukazuje na značajne promene u matriksu poredeći sa alginatnim česticama. Poredeći spektre uzoraka AW i AHT pre i posle fermentacije očigledno je da dodatak proteina surutke, a pogotovo hidrolizata proteina surutke značajno doprinosi izmenama nosača tokom fermentacije. Na prethodno navedenu tvrdnju ukazuje i velika promena u čvrstini čestica tokm fermentacije (tabela 19). Hidrolizat proteina surutke ispoljava mnoge nove trake u odnosu na nehidrolizovane proteine, jer sa smanjenjem dužine peptidnih lanaca, mnoge grupe koje su bile zarobljene u unutrašnjosti molekula dosevaju na površinu i dobijaju mogućnost da reaguju sa okruženjem. Manji molekuli podložniji su kako hidrolizi od starne BMK, tako i dejstvu spoljašnjih faktora.

4.2.2.2. Uticaj dodataka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za inkapsulaciju mešane jogurtne kulture na stabilnost fermentisanog napitka na bazi surutke

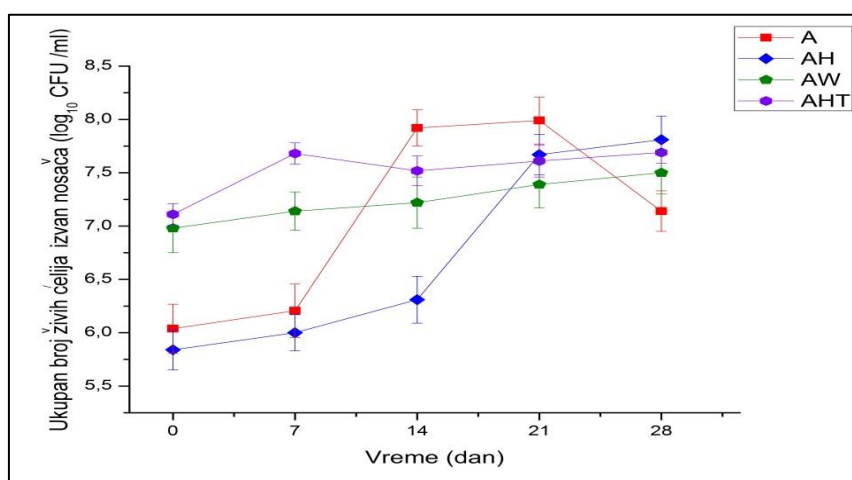
Na slici 54 prikazana je promena broja živih ćelija u uzorcima sa inkapsuliranom kulturom u različitim nosačima kao i uzorka s slobodnom kulturom određivana po metodi opisanoj u Odeljku 3.2. 11.5.6.4.1., odnosno Odeljku 3.2.11.5.6.3. za slobodnu kulturu. Uzorci su čuvani na temperaturi 4 ± 1 °C što je preporučeno kao temperatura za čuvanje fermentisanih mlečnih proizvoda (Mortazavian i sar., 2007).



Slika 54. Ukupan broj živih ćelija inkapsuliranih u: alginatni nosač (A), alginatni nosač obložen hitozanom (AH), nosač izgrađen od alginata i proteina surutke (AW), nosač izgrađen od alginata i hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (AHT), nakon fermentacije, a tokom perioda čuvanja od 28 dana na 4 ± 1 °C računat na \log_{10} CFU/g, kao i ukupnog broja živih ćelija uzorka sa slobodnom kulturom (SK) računato na \log_{10} CFU/mL.

Sa slike 54 možemo uočiti da slobodna kultura SK beleži znatno veće fluktuacije tokom čuvanja od 28 dana. U prvih 7 dana slobodna kultura beleži naglo povećanje broja živih ćelija od $0,54 \log_{10}$ CFU/mL, zatim u 14. danu nagli pad broja od $1,05 \log_{10}$ CFU/mL, da bi uz manje fluktuacije do 28. dana ukupan broj živih ćelija iznosio $0,5 \log_{10}$ CFU/mL manje nego nultog dana čuvanja. Ukupan broj živih ćelija inkapsuliran u alginatne čestice beleži umereni rast do 14. dana od $0,49 \log_{10}$ CFU/g, a zatim umereni pad do 28. dana kada je ukupan broj živih ćelija unutar nosača odgovarao početnoj vrednosti. Ukupan broj živih ćelija obloženih čestica pokazuje ponašanje slično

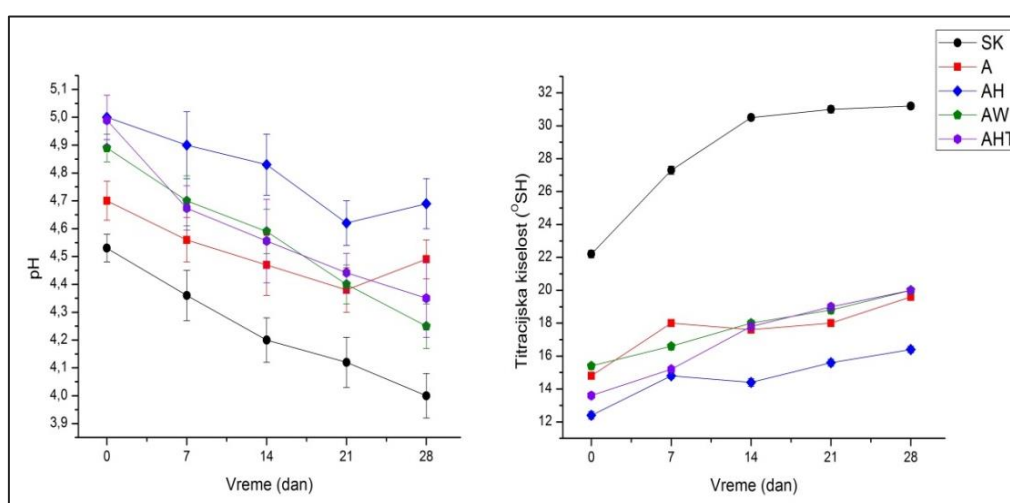
slobodnoj kulturi, sa naglim porastom 7. dana od 0,889 log₁₀ CFU/g, zatim naglim smanjenjem ukupnog broja 14. dana i približno identičan broj do 28. dana koji odgovara ukupnom broju živih ćelija nultog dana čuvanja. Broj živih ćelija inkapsuliranih u nosač koji sarži kombinaciju alginata i proteina surutke kao i hidrolizata surutke ima mnogo manju flutuaciju tokom perioda čuvanja. Ovi uzorci imaju veoma mali rast 7. dana i zatim blago smanjenje ukupnog broja živih ćelija, tako da 28. dana AHT ima 1,05 puta veći broj živih ćelija od AW uzorka, 1,06 puta veći broj od AH uzorka i 1,07 puta veći broj od A uzorka. Takođe, važno je pomenuti da pored živih ćelija zaštićenih nosačima, ovi uzorci sadrže i slobodne ćelije koje su curenjem iz matriksa dospele u fermentacioni supstrat i tu ispoljavaju svoju aktivnost (slika 55)



Slika 55. Ukupan broj živih ćelija izvan nosača u uzorcima sa: alginatnim česticama (A), alginatnim česticama obloženim hitozanom (AH), česticama izgrađenim od alginata i proteina surutke (AW), česticama izgrađenim od alginata i hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (AHT), nakon fermentacije, a tokom perioda čuvanja od 28 dana na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ računat na log₁₀ CFU/mL.

Kao što se može videti sa slike 55 kod svih uzoraka dolazi do značajnog rasta broja živih ćelija koje su curenjem iz nosača dospele u fermentacioni supstrat. Na slobodnu kulturu znatno veći uticaj imaju spoljašnji faktori, kao što su pH i titracijska kiselost. Mali broj živih ćelija koji je prisutan na početku u uzorcima A i AH, nema značajan uticaj na ukupan broj živih ćelija u napitku, jer je broj unutar nosača znatno veći. U ovim uzorcima taj broj postaje bitan 14. dana čuvanja za uzorak sa alginatnim česticama, odnosno 21. dan čuvanja za obložene čestice, kada se kod ovih uzoraka

dešava naglo povećanje ukupnog broja živih ćelija koje se nalaze slobodne u fermentacionom supstratu (iznose $8,002 \log_{10}$ CFU/mL za uzorak A i $7,589 \log_{10}$ CFU/mL za AH). Kod uzoraka AW i AHT ovaj broj je znatno veći već nultog dana čuvanja poredeći sa uzorcima A i AH, Za uzorak AHT usled velikog porasta ukupnog broja živih ćelija unutar samih čestica, slobodna kultura nema značajnu ulogu u broju sve do 7. dana čuvanja, dok kod uzorka AW, kao što je već navedeno, čak 20 % ukupnog broja živih ćelija nalazi se izvan nosača već nultog dana čuvanja. Svi uzorci 28. dana pokazuju broj živih ćelija između 7,0 i 7,6 \log_{10} CFU/mL što predstavlja značajan doprinos ukupnom broju.



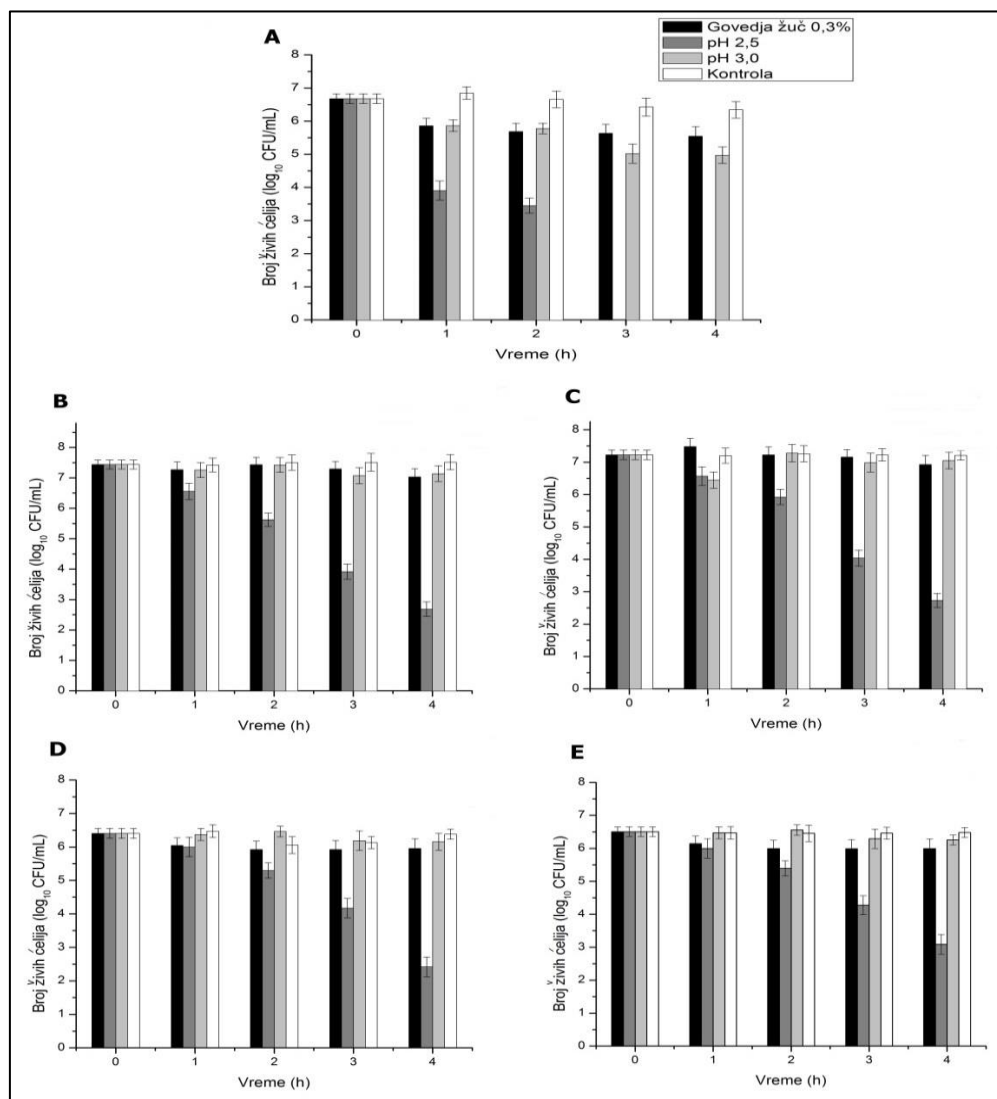
Slika 56. pH i titracijska kiselost u uzorcima sa: alginatnim česticama (A), alginatnim česticama obloženim hitozanom (AH), česticama izgrađenim od alginata i proteina surutke (AW), česticama izgrađenim od alginata i hidrolizata proteina surutke dobijenog pomoću tripsina (AHT), kao i uzorku sa slobodnom kulturom (SK), nakon fermentacije, a tokom perioda čuvanja od 28 dana na $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Na slici 56 je predstavljena promena pH i titracijske kiselosti uzoraka tokom perioda čuvanja u frižideru na $4 \pm 1^\circ\text{C}$ u trajanju od 28 dana. Za fermentisane mlečne proizvode smatra se da imaju dobar kvalitet ukoliko je titracijska kiselost oko 44°SH , ali ne sme da prelazi 53°SH , jer je pri toj vrednosti titracijske kiselosti proizvod okarakterisan kao neprijatno kiseo (Kehagias i Dalles, 1984; Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001). U slučaju kada je fermentacioni supstrat surutka (a ne mleko) titracijska kiselost je usled nedostatka hranljivih materija za BMK znatno niža. Titracijska kiselost uzorka sa slobodnom kulturom je znatno viša od ostalih uzoraka već nultog dana, a tomom 28

dana čuvanja povećaće se za 9,0 °SH uz najviši skok 7. dana. Uzorci sa inkapsuliranom kulturom pokazuju znatno nižu titracijsku kiselost nultog dana (između 12,0 i 15,0 °SH), a ta razlika se tokom čuvanja dodatno povećava. Usled znatno slabijeg rasta titracijske kiselosti u uzorcima sa inkapsuliranom kulturom na kraju 28. dana titracijska kiselost uzorka SK je čak 1,56 puta veća nego kod uzoraka A, AW i AT, a 1,90 puta veća nego u slučaju AH uzorka. Niska vrednost titracijske kiselosti je posledica slabe difuzije nastale mlečne kiseline iz primenjenih matriksa za inkapsulaciju, što je u saglasnosti sa literaturom (Djukic-Vukovic, 2013). pH ima ujednačen pad kod svih uzoraka tokom čuvanja, za razliku od titracijske kiselosti. Razlika u vrednosti pH koja je prisutna u uzorcima nultog dana u velikoj meri se zadržala do 28. dana. Pad pH kod uzorka SK tokom čuvanja je $0,63 \pm 0,07$ i 28. dan iznosi 3,90, dok je kod imobilisanih uzoraka AW i AHT $0,64 \pm 0,05$ i iznosi 4,25 odnosno 4,35. Kod uzorka sa alginatnim i obloženim česticama prisutan je netipičan rast pH između 21. i 28. dana, verovatno kao posledicu lize određenog broja ćelija (naglo smanjenje broja živih ćelija kod uzorka sa alginatnim česticama uočeno je upravo u ovom periodu kod slobodnih ćelija u fermentacionom supstratu). Usled ovog rasta pH vrednosti 28. dana pad pH vrednosti tokom čuvanja kod ovih uzoraka je nešto niži i iznosi 0,21 za A i 0,31 za AH. Kao i kod broja živih ćelija, vrednosti pH i titracijske kiselosti pokazale su veoma ujednačenu promenu tokom čuvanja, bez naglih promena koje su prisutne u uzorcima A i AH. Ovaj ujednačen rast i ujednačena promena parametara sistema ukazuje na to da primenjeni nosač sa proteinima surutke i hidrolizatom proteina surutke obezbeđuje ne samo adekvatnu zaštitu ćelijama, već i ujednačen protok materija između čestica i okolnog supstrata. Identično sniženje pH kod uzoraka AW i AHT kao kod uzorka sa slobodnom kulturom, a znatno niže povećanje titracijske kiselosti u odnosu na uzorak sa slobodnom kulturom ukazuje na to da iako mlečna kiselina ima poteškoća da napusti oblast čestica odnosno nosača (što je slučaj kod svih ispitivanih nosača u ovom radu), manji molekuli koji takođe mogu nastati fermentacijom u malim količinama kao što su vodonik peroksid, aminokiseline i sl. napuštaju čestice i bivaju oslobođene u fermentacioni supstrat dovodeći do sniženja pH uzorka, dok BMK ostaju zaštićene unutar nosača. Na ovu pojavu nam ukazuje i znatno manji rast ćelija izvan nosača kod uzoraka AW i AT tokom čuvanja, dok kod uzoraka A i AH imamo značajan porast ovih ćelija i veliki skok u 14. odnosno 21. danu.

4.2.2.3. Uticaj dodatka proteina surutke u alginatni matriks korišćen za inkapsulaciju mešane jogurtne kulture na probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke

Probiotski karakter proizvoda određivan je po metodi opisanoj u Odeljku 3.2.11.5.6.6.



Slika 57. Preživljavanje probiotskih sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* u uslovima niske pH od 2,5 i 3,0 koja vlada u želucu i prisustva žučnih soli od 0,3% u trajanju od 4h pod anaerobnim uslovima i to za: slobodnu kulturu (A), inkapsuliranu kulturu u alginatni nosač (B), inkapsuliranu kulturu u alginatni nosač obložen hitozanom (C), inkapsuliranu kulturu u nosač koji čine alginat i proteini surutke (D), inkapsuliranu kulturu u nosač koji čine alginat i hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina (E)

Na slici 57 prikazani su rezultati ispitivanja ukupnog broja živih ćelija dva probiotska soja *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* prisutna u korišćenoj mešanoj kulturi. Sa slike 50 uočava se znatan pad broja živih ćelija pri pH vrednosti 2,5 u slučaju SK uzorka, odnosno slobodne kulture. Nakon 1,0 h inkubacije broj živih ćelija iznosio je $3,9331 \pm 0,29 \log_{10}$ CFU/mL što predstavlja 58,9 % u odnosu na početni broj živih ćelija, dok je u drugom satu taj broj iznosio $3,4502 \pm 0,22 \log_{10}$ CFU/mL, odnosno 51,6 %. U trećem satu nije bilo prisutnih živih ćelija u uzorku SK. Inkapsulacija probiotika uticala je na povećanje procenta preživljavanja probiotskih sojeva mešane kulture, tako je inkapsulacija alginatnim česticama povećala broj živih ćelija posle 2,0 h pod anaerobnim uslovima u bujonu sa pH 2,5 sa 51,6 % na 75,6 %, a nakon 4,0 h pri ovoj pH broj živih ćelija probiotskih sojeva iznosio je čak 35,7 % što je znatno bolje od uzorka SK. Oblaganje alginatnih čestica slojem hitozana dodatno poboljšava preživljavanje probiotskih sojeva pri niskim vrednostima pH. Preživljavanje za AH uzorak pri pH 2,5 nakon 2,0 h iznosi 81,8 %, a nakon 4,0 h 37,6 %, što je statistički znatno bolje od uzoraka A i SK, što je bilo očekivano usled prethodno pokazanih karakteristika obloženih čestica sa znatno manjim curenjem ćelija, veće čvrstine čestica i pokazane snažnije barijere za difuziju materija između matriksa i spoljašne okoline. Čestice koje su sadržale alginat i proteine surutke pokazale su znatno veće curenje ćelija, kao i bolju razmenu materija sa okolinom. Međutim, pri pH 2,5 ove čestice su pokazale veoma dobru zaštitu za same ćelija. Nakon 2,0 h broj živih ćelija bio je 82,7 % u odnosu na početni broj, a nakon 4,0 h 37,7 % što je statistički znatno bolje od uzoraka SK i A, ali ne i od uzorka AH. Uzorak AHT čiji matriks za inkapsulaciju sadrži alginat i hidrolizat proteina surutke pokazao je veoma dobru zaštitu probiotskih sojeva u uslovima niske pH vrednosti pa je tako nakon 2,0 h pri pH 2,5 broj živih ćelija iznosio 82,9 % u odnosu na početni broj, a nakon 4,0 h čak 46,1 %, što je statistička znatno bolje od svih prethodno ispitanih uzoraka u ovom radu. Preživljavanje probiotske kulture pri pH 3,0 je znatno bolje u svim uzorcima. Za uzorak SK iznosi 74,4% računato na početni broj živih ćelija, a nakon 4,0 h inkubacije. Ovaj procenat iako znatno bolji nego pri pH 2,5 i dalje predstavlja veoma veliko smanjenje broja živih ćelija od čak četvrtine prvobitnog broja. Inkapsulacija značajno poboljšava preživljavanje sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* pa je pad nakon 4,0 h pri pH 3,0

ispod 5 % i za uzorak A. Procenat preživelih ćelija u odnosu na početni broj iznosi 95,9 % za A, 97,5 % za AH i 96,1 % za AW i AHT.

Bitan parametar u određivanju sposobnosti kulture da preživi uslove gastrointestinalnog trakta je vijabilnost pri koncentraciji žučnih soli od 0,3 %. Uzorak sa slobodnom kulturom pokazao je veliki procenat preživljavanja probiotskih sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* nakon 4,0 h od 83,0 %, dok su uzorci sa inkapsuliranom kulturom pokazali preživljavanje od preko 92,0 %.

Iz navedenog možemo zaključiti da inkapsulacija alginatnim matriksom znatno doprinosi preživljavanju sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* pri uslovima izuzetno niske pH koja vlada u želucu, oblaganje hitozanom ovih alginatnih čestica dodatno povećava preživljavanje probiotskih sojeva, kao i dodatak proteina surutke u alginatni matriks (za oko 10% računato na početni broj). Dodatak hidrolizata proteina surutke u alginatni matriks značajno doprinosi kvalitetu matriksa za inkapsulaciju probiotske kulture, a preživljavanje sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* pri pH 2,5 povećava za čak 20,7 % računato na početni broj živih ćelija, a u odnosu na alginatne čestice bez dodatka hidrolizata i za 9,0 % u odnosu na alginatne čestice koje sadrže nehidrolizovane proteine surutke. Pri vrednosti pH 3,0 nema značajnih promena u zavisnosti od korišćenog matriksa za inkapsulaciju i svi uzorci sa inkapsuliranom kulturom pokazali su preživljavanje preko 95,9 % nakon 4,0 h, što je znatno više od 74,4 % kojiko je preživelih ćelija u uzorku sa slobodnom kulturom pri ovoj pH. Slično je ponašanje uzoraka i pri izlaganju žučnim solima u koncentraciji od 0,3 %, gde je preživljavanje kod inkapsulirane kulture bilo za oko 10 % veće računato na početni broj živih ćelija a poredeći sa preživljavanjem slobodne probiotskih sojeva iz uzorka sa slobodnom kulturom.

Dakle, možemo zaključiti da inkapsulacija poboljšava probiotska svojstva fermentisanog napitka na bazi surutke utičući na znatno povećanje broja ćelija koje prežive nepovoljne uslove koji vladaju u želucu i dvanaestopalačnom crevu, kao i da dodatak hidrolizata proteina surutke u alginatni matriks utiče povoljno na preživljavanje sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* pri pH 2,5 i da ovaj matriks daje značajno bolje rezultate u odnosu na druge ispitivane matrikse.

4.2.2.4. Zaključak

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da inkapsulacijom probiotske kulture znatno produžavamo vreme fermentacije odnosno smanjujemo fermentativnu aktivnost kulture, ali doprinosimo stabilnosti i kvalitetu tako dobijenog fermentisanog napitka. Najznačajniji doprinos inkapsulacije je u probiotskom karakteru napitka. Sve inkapsulirane kulture ispitivane u ovom radu pokazale su drastično povećanje preživljavanja u uslovima koji simuliraju uslove u želucu i dvanaestopalačnom crevu. Manje čestice predstavljaju bolji izbor u slučaju fermentacije supstrata na bazi surutke, usled boljeg rasta BMK tokom fermentacije, kao i usled boljih parametara poput pH i titracijske kiselosti nakon fermentacije. Alginatne čestice obložene hitozanom usled veoma malog procenta curenja živih ćelija u spoljašnji medijum predstavljaju dobar izbor za korišćenje u procesima gde je potrebno ponovno korišćenje kulture ili izdvajanje kulture iz fermentacionog supstrata i odvojeno korišćenje u vidu dodatka u drugi proizvod i sl. BMK inkapsulirana u nosače na bazi proteina surutke predstavlja odličan starter za fermentaciju supstrata radi dobijanja probiotskog napitka poput jogurta i to iz više razloga:

- Curenje iz ovih čestica iako veće nego u slučaju alginatnih ili obloženih čestica ne predstavlja smetnju ili gubitak, jer se napitak konzumira u celosti, a slobodna kultura može nadomestiti određene nedostatke koje pokazuje inkapsulirana kultura u vidu bržeg snižavanja pH i povećanja titracijske kiselosti
- Proizvod sa ove dve vrste čestica (AW i AHT) je znatno stabilniji od proizvoda sa slobodnom kulturom, a pokazuje i bolje karakteristike od proizvoda sa inkapsuliranom kulturom u druge nosače (veći ukupan broj živih ćelija kao i titracijska kiselost i niža pH kako nakon fermentacije i tokom 28 dana čuvanja)
- Preživljavanje probiotskih sojeva *Bifidobacterium bifidum* i *Lactococcus acidophilus* je znatno bolje nego u slučaju drugih nosača (A i AH), pri čemu AHT pokazuje najbolje karakteristike

5. ZAKLJUČAK

U radu je ispitivana mogućnost dobijanja hidrolizata i peptidnih frakcija pomoću postupka kontrolisane hidrolize korišćenjem tri različita enzima, kao i mogućnost primene bioaktivnih peptida u različite prehrambene proizvode. Bitan parametar za primenu proteina i peptida u prehrambene su tehnološka svojstva. Tehnološka svojstva su određivana za nehidrolizovan koncentrat proteina surutke kao i za njegove hidrolizate, a zaključci su sledeći:

- Proteini surutke pokazuju veoma dobra tehnološka svojstva, a kontrolisanom enzimskom hidrolizom došlo je do unapređenja tih svojstava.
- Hidrolizat dobijen pomoću tripsina pokazuje veoma dobro svojstvo stvaranja pene i stabilnosti pene usled čega predstavlja odličnu zamenu za proteine jaja u pecivima poput biskvita, mafina, „vazdušastih“ kora za torte i sličnih pekarskih proizvoda.
- Hidrolizat dobijen pomoću tripsina je pokazao i najbolja emulgujuća svojstva, a imajući u vidu da svi uzorci pokazuju odličnu rastvorljivost i kapacitet vezivanja vode i ulja, može se zaključiti da bi uzorak sa najboljim svojstvima za primenu dresinga i drugih prehrambenih proizvoda sa visokim sadržajem masti i ulja, bio hidrolizat dobijen pomoću tripsina.

Pored tehnoloških svojstava, bioaktivnost peptida igra važnu ulogu u njihovoj primeni u prehrambenim proizvodima. Ispitivanje uticaja kontrolisane enzimske hidrolize na molekulsku masu peptida kao i bioaktivnosti istih došlo se do sledećih zaključaka:

- Kontrolisana enzimska hidroliza značajno doprinosi povećanju bioaktivnosti proteina surutke.
- Prosečna dužina peptidnih lanaca i prosečna molekulska masa peptida nakon hidrolize je smanjena, pri čemu je najbolje rezultate pokazao enzim proteinaza k (sadržaj peptida molekulske mase ispod 3kDa se sa $0,20 \pm 0,12$ % povećao na $62,96 \pm 2,82$).
- Najbolja antioksidativna svojstva pokazao je hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k. Hidrolizat dobijen pomoću proteinaze k je pokazao da

poseduje frakcije koje imaju antioksidativni kapacitet blizak vrednosti kapaciteta ukupnog hidrolizata.

- Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću termolizina koji je po vrednostima antioksidativnog kapaciteta najbliži HPK uzorku takođe poseduje frakcije koje su po antioksidativnom kapacitetu bliske vrednostima HTH, a lošije od vrednosti koje pokazuje hidrolizat i frakcije dobijene pomoću proteinaze k.
- Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću tripsina, iako pokazuje najlošiji antioksidativni kapacitet u poređenju sa ostalim hidrolizatima, poseduje frakciju F3 (peptidi molekulske mase između 10 i 3 kDa) koja pokazuje antioksidativna svojstva bolja od HPK, ali i od njegove najbolje frakcije F4. Ova frakcija hidrolizata dobijenog pomoću tripsina obuhvata svega $22,44 \pm 1,88$ % peptida u hidrolizatu, pa njeno izdvajanje ultrafiltracijom ne predstavlja dobro rešenje, ako znamo da peptidi u ovoj oblasti molekulske mase trpe dodatne promene tokom digestije u gastrointestinalnom traktu i postoji mogućnost da dođe do smanjenja bioaktivnosti.
- Procesom kontrolisane enzimske hidrolize se povećava ACE inhibitorna aktivnost proteina surutke.
- Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k pokazuje znatno višu ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na sve frakcije ostalih hidrolizata, dok frakcije F3 i F4 ovog hidrolizata pokazuju bolje ACE inhibitorne aktivnosti od ukupnog hidrolizata (HPK). Frakcija F4 hidrolizata dobijenog pomoću proteinaze k poseduje 1,59 puta višu ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na aktivnost ukupnog hidrolizata, ali isto toliko puta manji sadržaj peptida. Opravdanost ultrafiltracije u ovom slučaju ogleda se u tome što pored bolje bioaktivnosti peptidi male molekulske mase uglavnom nepromenjeni prolaze gastrointestinalni sistem čoveka i sa nepromenjenom bioaktivnošću dospevaju do mesta u organizmu gde ispoljavaju svoju aktivnost.
- Hidrolizat proteina surutke dobijen pomoću proteinaze k kao i njegova frakcija HPK-F4 se zbog pokazanih značajno boljih bioaktivnosti u odnosu na ostale ispitivane uzorke, preporučuju za obogaćivanje prehrambenih proizvoda u cilju postizanja ili poboljšanja njihove funkcionalnosti.

Primena bioaktivnih peptida surutke dobijenih kontrolisanom enzimskom hidrolizom pomoću proteinaze k u masni krem dala je sledeće rezultate:

- masni krem u koji je dodat HPK i njegova frakcija HPH-F4 pokazao je poboljšanje antioksidativnih svojstava kao i ACE inhibitornu aktivnost u oba slučaja, a bioaktivni peptidi dodati u masni krem pokazali su i izuzetno dobru stabilnost tokom dva meseca čuvanja, što znači da se na ovaj način dobija obogaćen proizvod nepromenjenih funkcionalnih svojstava tokom dužeg čuvanja.
- Masni krem sa dodatkom bioaktivnih peptida se usled pokazane stabilnosti antioksidativnih i ACE inhibitornih svojstava preporučuje za punjenje onih proizvoda koji pokazuju nemogućnost obogaćivanja bioaktivnim peptidima surutke ili imaju pad bioaktivnosti tokom čuvanja iz bilo kog razloga.

Primena bioaktivnih peptida surutke dobijenih kontrolisanom enzimskom hidrolizom pomoću proteinaze k (HPK i HPK-F4) dodatkom u mleko koje je zatim fermentisano ABY 6 komercijalnom kulturom dala je sledeće rezultate:

- Dodatak bioaktivnih peptida u mleko ne doprinosi povećanju broja živih ćelija nakon fermentacije, već dovodi do blagog pada broja živih ćelija kod svih uzoraka osim 1HJ i 1F4J, ali utiče na metabolizam korišćenih bakterija i dovodi do statistički značajno ($p < 0,05$) bržeg pada pH odnosno povećanja titracijske kiselosti u svim uzorcima.
- Dodatak peptida pozitivno utiče na ukupan broj živih ćelija tokom procesa čuvanja u frižideru u trajanju od 28 dana, a sama efikasnost zavisi od tipa korišćenih peptida. Ukupan broj živih ćelija u svim uzorcima sa dodatkom proteina i peptida surutke pokazuje statistički značajno ($p < 0,05$) višu vrednost, a posebno se ističe uzorak 3F4J sa najvećim brojem živih ćelija posle 28 dana čuvanja.
- Tokom čuvanja u frižideru pad pH, odnosno povećanje titracijske kiselosti ima isti trend kod svih uzoraka.
- ACE inhibitorna aktivnost mleka pre fermentacije znatno je povećana dodatkom bioaktivnih peptida. ACE inhibitorna aktivnost svih uzoraka se smanjila tokom procesa fermentacije što je posledica razgradnje bioaktivnih peptida od strane

BMK, pri čemu se najveća vrednost zadržala u uzorcima 5HJ i 3F4J nakon fermentacije.

- Antioksidativni kapacitet proizvoda je znatno poboljšán kod svih uzoraka sa dodatkom proteina i peptida surutke. Fermentacija je dodatno poboljšán antioksidativni kapacitet uzoraka, a najvišu inhibiciju ABTS radikala nakon 28 dana čuvanja u frižideru pokazali su uzorci 3HJ i 3F4J.
- Uzorak 3F4J pokazao je najbolje karakteristike i može se reći da kada je u pitanju ABY 6 kultura i mleko sa 0,5 % mlečne masti, najbolja svojstva proizvoda dobijamo obogaćivanjem supstrata sa 3 % frakcije HPK-F4.
- Dodatak bioaktivnih peptida u mleko pre fermentacije nije pokazao pozitivan uticaj na preživljavanje probiotske kulture *L. acidophilus* i *B. bifidum* u uslovima niske pH i prisustva žučnih soli (simulirani uslovi koji vladaju u želucu i dvanaestopalačnom crevu)

Ispitivanje uticaja dodatka bioaktivnih peptida surutke dobijenih kontrolisanom enzimskom hidrolizom pomoću proteinaze k (HPK i HPK-F4) u fermentacioni supstrat koji čine 30,0 % mleko i 70,0 % surutka, a koji je zatim fermentisan ABY 6 komercijalnom kulturom dalo je sledeće rezultate:

- Dodatak bioaktivnih peptida u supstrat na bazi surutke dovodi do porasta broja živih ćelija nakon fermentacije, kod uzoraka sa dodatkom peptida manjih od 3kDa (1,24 puta veći broj za uzorak 1F4S, 1,20 puta za uzorak 3F4S i 1,13 puta za uzorak 5F4S) u odnosu na uzorak bez dodatka peptida.
- Dodatak bioaktivnih peptida utiče na povećanje metaboličke aktivnosti kulture kao i u slučaju dodatka u mleko, a što se ogleda u izraženijem padu pH i povećanju titracijske kiselosti.
- Dodatak bioaktivnih peptida utiče na poboljšanje antioksidativnog kapaciteta i ACE inhibitorne aktivnosti proizvoda kao i u slučaju kada je fermentacioni supstrat mleko. Nakon naglog poboljšanja ovih vrednosti usled dodatka bioaktivnih peptida, sledi poboljšanje antioksidativnog kapaciteta tokom fermentacije, ali smanjenje ACE inhibitorne aktivnosti.

- Dodatak bioaktivnih peptida utiče povoljno na stabilnost proizvoda odnosno na broj živih ćelija tokom čuvanja fermentisanog proizvoda tokom 28 dana na 4 °C pri čemu je najbolje karakteristike pokazao uzorak 5HS.
- Antioksidativni kapacitet proizvoda je takođe stabilan tokom 28 dana na 4 °C, a najbolje karakteristike pokazuje upravo uzorak 5F4S, ali i 5HS
- Dodatak bioaktivnih peptida ne utiče na preživljavanje probiotskih sojeva *L. acidophilus* i *B. bifidum* u uslovima koji vladaju u želucu i dvanaestopalačnom crevu.

Iz dobijenih rezultata možemo zaključiti da je obogaćivanje fermentisanih proizvoda bioaktivnim peptidima dobar način poboljšanja funkcionalnosti, ali i stabilnosti proizvoda. Ukoliko želimo poboljšati funkcionalna svojstva proizvoda u vidu antioksidativnog kapaciteta kao i ACE inhibitorne aktivnosti, dodatak bioaktivnih peptida je bolje sprovesti nakon završene fermentacije, s obzirom da je tokom fermentacije prisutna potrošnja bioaktivnih peptida od strane BMK, što dovodi do smanjenja bioaktivnosti krajnjeg proizvoda.

Ispitivanje uticaja dodatka proteina i peptida surutke u mlečnu čokoladu

- Dodatak 6,0 % HT i WPC u mlečnu čokoladu uzrokuje promenu u raspodeli veličine čestica kao i reološkim svojstvima čokoladna, koja su u opsegu preporučenih vrednosti za čokoladne mase.
- Dodatak proteina i peptida surutke nije uticao značajno na čvrstoću mlečne čokolade.
- Dodatak 6,0 % HT i WPC značajno doprinose povećanju antioksidativnog kapaciteta mlečne čokolade, pri čemu se izdvaja uzorak HT-C koji je pokazao 1,37 puta veću inhibiciju ABTS radikala u odnosu na kontrolni uzorak i 1,46 puta veću inhibiciju DPPH radikala u odnosu na K-C i WPC-C nakon 2 meseca čuvanja na 20 °C.
- Senzorna analiza pokazuje da dodatak proteina i peptida surutke nije značajno uticao na promenu senzorne ocene kod konzumenata.

Iz svega navedenog može se zaključiti da dodatak hidrolizata proteina surutke u mlečnu čokoladu, predstavlja dobar izbor, jer značajno doprinosi funkcionalnosti proizvoda, a minimalno menja senzorna svojstva proizvoda na koja su potrošači navikli.

Primenom proteina surutke kao nosača za inkapsulaciju mešane ABY 6 jogurtne kulture pri proizvodnji fermentisanog proizvoda na bazi surutke došlo se do sledećih zaključaka:

- Inkapsulacija mešane jogurtne kulture ABY 6 u čestice dimenzija oko 1mm koje sadrže WPC ili hidrolizat HT kao osnovni materijal u nosaču pokazuje najpovoljniji vid inkapsulacije za proizvodnju fermentisanog napitka na bazi surutke (najveći broj živih ćelija posle fermentacije, najveću fermentativna aktivnost)
- Ovi nosači pokazuju veći procenat curenja ćelija u spoljašnju sredini (pogotovo čestice sa WPC-om) pa ne predstavljaju dobar nosač za inkapsulaciju kulture koju je potrebno tako inkapsuliranu izdvojiti iz proizvoda i ponovno koristiti ili ugraditi u drugi proizvod. Za tu namenu najbolje je koristiti alginatne čestice obložene hitozanom.
- Čestice sa proteinima surutke, a naročito sa hidrolizatom proteina surutke, pokazuju veoma dobre karakteristike (najveći ukupan broj živih ćelija, umeren pad pH i rast titracijske kiselosti) tokom čuvanja proizvoda u frižideru
- Čestice sa proteinima surutke a posebno sa hidrolizatom proteina surutke predstavljaju izuzetno dobru zaštitu probiotskim sojevima *L. acidophilus* i *B. bifidum* u uslovima niske pH i prisustva žučnih soli (uslovi koji simuliraju uslove u želucu i dvanaestopalačnom crevu), što omogućava prolazak probiotske kulture do creva gde se nastanjuju i gde imaju mogućnost da ispolje svoj pozitivan uticaj na ljudski organizam

Iz svih navedenih rezultata pokazano je da kontrolisanom enzimskom hidrolizom imamo mogućnost promene tehnoloških svojstava proteina surutke u smeru koji nam je potreban radi njihove primene u različitim proizvodima. Takođe kontrolisanom enzimskom hidrolizom drastično povećavamo biološka svojstva (antioksidativna, antihipertenzivna) proteina surutke, a ultrafiltracijom na veoma jednostavan i jeftin način moguće je izdvojiti frakcije sa najpoželjnijim karakteristikama. Primenom ovih

bioaktivnih frakcija i hidrolizata proteina surutke u vidu dodatka u postojeće proizvode moguće je drastično poboljšati karakteristike tih proizvoda i prevesti ih u funkcionalne proizvode bez osetih izmena u njihovim senzornim svojstvima. Inkapsulacija probiotskih sojeva predstavlja dobar vid njihove zaštite od spoljašnjih faktora i omogućava ovim „dobrim“ bakterijama da dodju do tankog creva, gde se nastanjuju i ispoljavaju svoj pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje.

6. LITERATURA

1. Adebisi, A.O., Ogawa, T., Muramoto, K., 2008. Purification and characterization of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. *Int. Food Sci. Technol.* 43:35–43.
2. Adler-Nissen, J., 1986. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. New York, NY, USA: Elsevier Applied Science Publishers.
3. Adriana, D.K., Anne, P., Pertti, M., Ladislav, C., Hannu, J.T.K., 2010. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 865–874.
4. Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J., 2008. Relationship between rheological, textural and melting properties of dark chocolate as influenced by particle size distribution and composition, *European Food Research and Technology*. 227 (4), 1215–1223.
5. Agyei, D., Potumarthi, R., Danquah, M.K., 2012. Optimisation of batch culture conditions for cell-envelope-associated proteinase production from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC® 7830™. *Appl. Biochem. Biotech.* 168, 1035–1050.
6. Aimutis, W.R., 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.* 134 (4), 989–995.
7. Akalin AS1, Gönç S, Unal G, Fenderya S., 2007. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. *J Food Sci.* 72 (7), 222–227.
8. Antal, J., Pal, G., Azboth, B., Buzas, Z., Patthy, A., Graf, L., 2001. Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Anal. Biochem.* 288, 156–167.
9. Arnao, M.B., 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology* 11 (11), 419–421.
10. Assadpour, E., Maghsoudlou, Y., Jafari, S.M., Ghorbani, M., Aalami, M., 2016. Optimization of folic acid nano-emulsification and encapsulation by maltodextrin-whey protein double emulsions. *Int. J. Bio. Macromol.* 86,197–207.
11. Ashwell, M., 2002. *Concept of functional foods*, ILSI - International Life Sciences Institute Europe, B - 1200 Brussels, Belgium.

12. Athira, S., Mann, B., Saini, P., Sharma, R., Kumar, R., Singh, A.K., 2015. Production and characterisation of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *J. Sci. Food Agric.* 95, 2908–2915.
13. Azeredo, H.M.C., Waldron, K.W., 2016. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for foodcontact - A review. *Trends in Food Science & Technology* 52, 109–122.
14. Balenović, J., Bačić, M., 2002. Pregled zakonodavstva za područje dodataka prehrani u EU i nekim europskim zemljama, *Farmaceutski glasnik*, 58, 59–69.
15. Beermann, C., Hartunga, J., 2013. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct.* 4, 185–199.
16. Benkerroum, N., 2010. Antimicrobial Peptides Generated from Milk Proteins a Survey and Prospects for Application in the Food Industry. *Int. J. Dairy. Technol.* 63, 320–338.
17. Berry, T., Yang, X., Foegeding, E. 2009. Foams prepared from whey protein isolate and egg white protein: 2. Changes associated with angel food cake functionality. *Journal of Food Science* 74, 269–277.
18. Barth R., 2001. From the original idea of a product to the introduction into the market and finally to the creation of a real brand name, In: *The importance of whey and whey components in food and nutrition, Proceedings of the 3rd International Whey Conference*, 147–156.
19. Beermann, C., Hartung, J., 2013. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food Funct* 4 (2), 185–199.
20. Bengmark, S., 2000. Bacteria for Optimal Health, *Nutrition*, 16, 611–615.
21. Bertucci, J.I., Liggieri, C.S., Colombo, M.L., Cavalli, S.E.V., Bruno, M.A., 2015. Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT-Food Sci.Technol.* 64, 157–163.
22. Boza JJ, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Ballèvre O., 2000. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat, *Eur J Nutr.* 39 (6), 237–243.
23. Brody, E.P., 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide *Br. J. Nutr.* 84, 39–46.

24. Brubaker, P.L., Anini, Y., 2003. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 81, 1005–1012.
25. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J., 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104 (4), 467–483.
26. Bylund, G., 1995. *Dairy Processing Handbook*, Tetra Pak Processing Systems A/B, Lund, Sweden.
27. Camfield, D.A., Owen, L., Scholey, A.B., Pipingas, A., Stough, C., 2011. Dairy constituents and neurocognitive health in ageing. *Br. J. Nutr.* 22, 1–17.
28. Campagna, S., Cosette, P., Molle, G., Gaillard, J.L., 2001. Evidence for membrane affinity of the C-terminal domain of bovine milk PP3 component. *Biochim. Biophys. Acta.* 1513, 217–222.
29. Campagna, S., Mathot, A.G., Fleury, Y., Girardet, J.M., Gaillard, J.L., 2004. Antibacterial activity of Lactophoricin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of protease peptone. *J. Dairy Sci.* 87, 1621–1626.
30. Cassiani D.M., Yamul, D.K., Conforti, P.A., Pérez, V.A., Lupano, C.E., 2013. Structure and Functionality of Whey Protein Concentrate-Based Products with Different Water Contents, *Food Bioprocess Tech.* 6, 217–227.
31. Castro, W.F., Cruz, A.G., Bisinotto, M.S., Guerreiro, L.M.R., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., Cunha, R.L., Deliza, R., 2013. Development of probiotic dairy beverages: rheological properties and application of mathematical models in sensory evaluation. *J Dairy Sci.* 96, 16–25.
32. Català-Clariana, S., Benavente, F., Giménez, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 2010. Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by capillary electrophoresis–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 683, 119–125.
33. Champagne, C.P., Kailasapathy, K., 2008. Encapsulation of probiotics. In: Garti, N. (Ed.), *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*. Woodhead publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 344–369.
34. Chang, B.W., Chen, R.L.C., Huang, I.J., Chang, H.C., 2001. Assays for angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Analytical Biochemistry* 291, 84–88.

35. Chapeau, A.L., Tavares, G.M., Hamon, P., Croguennec, T., Poncelet, D., Bouhallab, S., 2016. Spontaneous co-assembly of lactoferrin and b-lactoglobulin as a promising biocarrier for vitamin B9. *Food Hydrocolloid* 57, 280–290.
36. Chatterjee, A., Kanawjia, S.K., Khetra, Y., 2016. Properties of sweetened Indian yogurt (mishti dohi) as affected by added tryptic whey protein hydrolysate. *J. Food Sci. Technol.* 53, 824–831.
37. Chatterton, D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., Brodkorb, A., 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin β -Technological implications for processing. *Int. Dairy J.* 16, 1229–1240.
38. Chavan, J.K., Kadam, S.S., 1993. Nutritional enrichment of bakery products by supplementation with non-wheat flours. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(3), 189–226.
39. Chavarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F.C., Marzo, F., Villarán, M.D.C., 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate–chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology* 142 (1–2), 185–189.
40. Chelh I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V., 2006. Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci.* 74, 681–683.
41. Chen, M.J., Chen, K.N., 2007. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA, 83–107.
42. Chen, L.Y., Subirade, M., 2007. Effect of preparation conditions on the nutrient release properties of alginate-whey protein granular microspheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65(3), 354–362.
43. Christopher, M.D., Padmanabha Reddy, V., Venkateswarlu, K., 2009. Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred flavoured yoghurts containing whey protein concentrate. *Natural Product Radiance* 8 (1), 25–31.
44. Cornish, J., 2004. Lactoferrin promotes bone growth *Bio. Metals.* 17, 331–335.
45. Correa, A.P.F., Daroitb, D.J., Fontouraa, R., Meiraa, S.M.M., Segalina, J., Brandellia, A., 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48–55.

46. Creamer, L.K., Sawyer, L., 2003. β -Lactoglobulin, in: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Ed.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, New York
47. DeVilbiss E.D., Holsinger V.H., Posati L.P., Pallansch M.J., 1974. Properties of whey protein concentrate foams. *Food Technol* 28, 40–8.
48. De Vos, P., Faas, M.M., Spasojevic, M., Sikkema, J., 2010. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal* 20 (4), 292–302.
49. Diniz, F.M., and A.M. Martin. 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Leben. Wiss. Technol.* 30, 266–272.
50. Diploc A.T., Aggett P.J., Ashwell M., Bornet F., Fern F.B., Roberfroid M.B., 1999. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document, *British Journal of Nutrition* 81, 1–28.
51. Djukic-Vukovic, P.A., 2013. Proizvodnja mlečne kiseline i probiotske biomase na destilerijskoj džibri, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu,.
52. Doherty, S.B., Auty, M.A., Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Brodkorb, A., 2012. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. *J. Microencapsul.* 29, 713–728.
53. Donkor, O.N., Anders, H., Todor, V., Shah, N.P., 2005. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yoghurt, *J. Food Sci.* 70, 375–381.
54. Dryakova, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Curda, L., & Korhonen, H., 2010. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods, *Eur. Food Res. Technol.* 230, 865–874.
55. Eek-Poei, T., Lay-Harn, G., 2011. Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk, *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 19, 45–53.
56. Elfahri, K., 2012. Release of bioactive peptides from milk proteins by lactobacillus species. Degree: School of Biomedical and Health Sciences, Victoria University URL: <http://vuir.vu.edu.au/21473/>

57. Elkhailil, E.A.I., El Tinay, A.H., Mohamed, B.E., Elsheikh, E.A.E., 2001. Effect of malt pretreatment on phytic acid and in vitro protein digestibility of sorghum flour. *Food Chemistry* 72, 29–32.
58. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136 (5), 359–386.
59. Foegeding, E.A., Davis, J.P., 2011. Food protein functionality: a comprehensive approach. *Food Hydrocoll.* 25, 1853–64.
60. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 1998. Milk Proteins, in: *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie Academic and Professional, London.
61. Gobbetti M, Ferranti P, Smacchi E, Goffredi F, Addeo F., 2000. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl Environ Microbiol.* 66 (9), 3898–3904.
62. Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C.G., 2007. Bioactive peptides in dairy products, in: Hui, Y.H., Chandan, R., Clark, S., Cross N.A. (Eds.), *Handbook of Food Products Manufacturing: Health, Meat, Milk, Poultry, Seafood, and Vegetables*. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 489–517.
63. Gouin, S., 2004. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology* 15 (7–8), 330–347.
64. Graszkievicz, A., Żelazko, M., Trziszka, T., 2010. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 60 (1), 57–61.
65. Groboillot, A.F., Champagne, C.P., Darling, G.F., Poncelet, D., 1993. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and bioengineering* 42 (10), 1157–1163.
66. Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B., 2013. ACE-Inhibitory Activity of Cheddar Cheeses Made with Adjunct Cultures at Different Stages of Ripening, *Advances in Dairy Research* 1:1 URL: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-888X.1000102>
67. Gustaw, W., Kozioł, J., Radzki, W., Skrzypczak, K., Michalak-Majewska, M., Sołowiej, B., Sławińska, A., Jabłońska-Ryś, E., 2016. The effect of addition of selected milk protein preparations on the growth of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical properties of fermented milk. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 15(1), 29–36.

68. Haque, E., Chand, R., 2006. Milk protein derived bioactive peptides. URL: <http://www.dairyscience.info/bio-peptides.htm>.
69. Haque, E., Chand, R., Kapila, S., 2009. Biofunctional properties of bioactive peptides of milk origin. *Food. Rev. Int.* 25, 28–43.
70. Hardy G., 2000. Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning, *Nutrition*, 16, 688–697.
71. He, R., Girgih, A.T., Malomo, S.A., Ju, X., Aluko, R.E., 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions, *Journal of Functional Foods* 5, 219–227.
72. Hebrard, G., Hoffart, V., Beyssac, E., Cardot, J. M., Alric, M., Subirade, M., 2010. Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. *Journal of Microencapsulation* 27 (4), 292–302.
73. Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., Recio, I., 2004. Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides by simulated gastrointestinal digestion of infant formulas. *Int. Dairy J.* 14, 889–898.
74. Hernandez-Ledesma, B., Contreras, M., Recio, I., 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165, 23–35.
75. Hernandez-Ledesma, B., Recio I., Ramos, M., Amigo, L., 2002. Preparation of ovine and caprine b-lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine b-lactoglobulin hydrolysed with thermolysin, *International Dairy Journal* 12, 805–812.
76. Hernández-Rodríguez, L., Lobato-Calleros, C., Pimentel-González, D.J., Vernon-Carter, J., 2014. *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate: k-carrageenan complex coacervates. *Food Hydrocolloid.* 36, 181–188.
77. Herregods, G., Camp, J.V., Morel, N., Ghesquert, B., Gevaert, K., Vercruyssen, L., Dierck, S., Quanten, E., Smagghe, G., 2015. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity of Gelatin Hydrolysates and Identification of Bioactive Peptides. *J. Agri. Food Chem.* 59(2), 552–558.
78. Bolenz, S., Holm, M. Langkrär, C., 2014. Improving particle size distribution and flow properties of milk chocolate produced by ball mill and blending. *Eur. Food Res. Technol.* 238, 139–147.

79. Horáčková, Š., Sedláčková, P., Sluková, M., Plocková, M., 2014. Influence of whey, whey component and malt on the growth and acids production of lactobacilli in milk. *Czech J. Food Sci.* 32 (6), 526–531.
80. Hrnjez, D., 2015. Biološka aktivnost fermentisanih mlečnih napitaka dobijenih primenom kombuhe i konvencionalnih starter kultura, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
81. Ijäs H., Collin M., Finckenberg P., Pihlanto-Leppälä A., Korhonen H., Korpela R., 2004. Antihypertensive opioid-like milk peptide α -lactorphin: lack of effect on behavioral tests in mice. *International Dairy Journal* 14, 201–205.
82. Ilha, E.C., da Silva, T., Lorenz, J.G., Rocha, G., Sant'Anna, E.S., 2015. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. *Eur. Res. Tech.* 240(5), 977–984.
83. Ismail, B., Gu, Y., 2010. Whey protein hydrolysates: Current knowledge and challenges, *Midwest Dairy Foods Research Center*, 55–77.
84. Jäkälä, P., Vapaatalo, H., 2010. Antihypertensive Peptides from Milk Proteins. *Pharmaceuticals* 3(1), 251–272.
85. Jisha, S., Padmaja, G., 2011. Whey Protein Concentrate Fortified Baked Goods from Cassava-Based Composite Flours: Nutritional and Functional Properties. *Food Bioprocess Tech.* 4, 92–101.
86. Juvan, S., Bartol, T., Boh, B., 2005. Data structuring and classification in newly – emerging scientific fields, *Online Information Review*, 29 (5), 483–498. URL: <https://doi.org/10.1108/14684520510628882>
87. Khani, S., Hosseini, H.M., Taheri, M., Nourani, M.R., Imani Fooladi, A.A., 2012. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflammation and Allergy Drugs Targets.* 11, 79–89.
88. Kehagias, C.H., Dalles, T.N., 1984. Bacteriological and biochemical characteristics of various types of yogurt made from sheep's and cow's milk. *Journal of Food Protection* 47, 760–761.
89. Kim, S.B., Ku, M.J., Cho, W.M., Ki, K.S., Kim, H.S., Nam, M.S., 2010. Production of ironbinding peptides from colostrum whey by enzymatic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. An.* 30, 923–929.

90. Kong, B., Peng, X., Xiong, Y.L., Zhao, X., 2012. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate. *Food Chem.* 135(2), 540–547.
91. Korbekandi H., Mortazavian A.M., Irvani S., 2011. Technology and stability of probiotic in fermented milks. In: *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to the Human Health*, New York: Nova Science Publishers Ltd. 131–169.
92. Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Review. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960.
93. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal* 13 (1), 3–13.
94. Krunić, T., Bulatović, M., Obradović, N., Vukašinović-Sekulić, M., Mojovic L. Rakin, M., 2014. Fermentative activity and viability of immobilized probiotic starter culture ABY-6 in whey based substrates. II International Congress , Food Technology, Quality and Safety, 297–302.
95. Krunić, T., Arsic, S., Bulatović, M., Vukašinović-Sekulić, M., Rakin, M., 2015. Recent trends in whey utilization – Production of bioactive peptides, 7th International Scientific and Expert Conference of the International TEAM Society, 382–385.
96. Krunić, T., Bulatović, M., Borić, M., Rakin, M., 2016a. Improvement of bioactivity and technological properties of whey protein. III International Congress, Food Technology, Quality and Safety, 254–260.
97. Krunić, T.Z., Bulatović, M.L., Obradović, N.S., Vukašinović-Sekulić, M.S., Rakin, M.B., 2016b. Effect of immobilisation materials on viability and fermentation activity of dairy starter culture in whey-based substrate. *J. Sci. Food Agric.* 96, 1723–1729.
98. Krunić, T.Ž., Obradović, N.S., Bulatović, M.Lj., Vukašinović-Sekulić, M.S., Trifković, K., Rakin, M.B., 2017. Impact of carrier material on fermentative activity of encapsulated yoghurt culture in whey based substrate, *Hem. Ind.* 71 (1), 41–48.
99. Kumari, A., Mann, B., Prerna, S., Singh, R.R.B., Kumar, R., Sharma, R., 2013. Assesment of antioxidant and physico-chemical characteristics of ice cream added with whey protein hydrolysates. *Indian J. Dairy Sci.* 66(5), 382–387.
100. Kwak, N.S., Jukes, D.J., 2001. Functional foods Part 1: The development of a regulatory concept, *Food Control*, 12, 99–107.

101. Lourens-Hattingh, A, Viljoen, B.C., 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal* 11, 1–17.
102. Lam, R.S.H., Nickerson, M.T., 2015. The effect of pH and temperature pre-treatments on the physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate, *LWT- Food Science and Technology* 60 (1), 427–434.
103. Lassissi, T.A., Hettiarachchy, N.S., Rayaprolu, S.J., Kannan, A., Davis, M., 2014. Functional properties and Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of soy–whey proteins and fractions, *Food Research International* 64, 598–602.
104. Lawrie, G., Keen, I., Drew, B., Chandler-Temple, A., Rintoul, L., Fredericks, P., 2007. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* 8, 2533–2541.
105. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., Liu, J., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.* 106, 444–450.
106. Li, J.M, Nie, S.P., 2016. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods, *Food Hydrocolloids* 53, 46–61.
107. Li, H.M., Hu, X., Guo, P., Fu, P., Xu, L., Zhang, X.Z., 2010. Antioxidant properties and possible mode of action of corn protein peptides and zein peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 44–60.
108. Lim, S.M., Lee, N.K., Park, K.K., Yoon, Y.C., Paik, H.D., 2011. ACE-inhibitory effect and physicochemical characteristics of yogurt beverage fortified with whey protein hydrolysates. *Korean J. Food Sci. An.* 31, 886–892.
109. Lin, M.Y., Yen, C.L., 1999. Antioxidative ability of lactic acid bacteria, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1460–1466.
110. Lowry O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
111. Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P., Corrieu G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milkprotein hydrolysates *International Dairy Journal* 14 (2004) 47–53

112. Ma, Y., Xiong, Y.L., 2009. Antioxidant and bile acid binding activity of buckwheat protein in vitro digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4372–4380.
113. Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties, *Food Research International* 40, 1197–1211.
114. Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., Athira, S., 2015. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *J Food Sci Technol*, 52(6), 3235–3241.
115. Manso, M.A., López-Fandino, R., 2004. K-Casein macropeptides from cheese whey: Physicochemical, biological, nutritional, and technological features for possible uses. *Food Rev. Int.* 20, 329–355.
116. Markus, C.R., Jonkman, L.M., Lammers, J.H.C.M., Deutz, N.E.P., Messer, M., Rigtering, N., 2005. Evening intake of alpha-lactalbumin raises brain tryptophan availability and improves morning alertness and brain measures of attention. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 1026–1033.
117. Marnila, P., Korhonen, H.J.T., 2009. Lactoferrin for human health, in: Corredig, M.(Ed.), *Dairy Ingredients Food and Nutraceutical Uses*, Woodhead Publishing Limited, Oxford, 290–307.
118. Marshall, K., 2004. Therapeutic Applications of Whey Protein, *Alternative medicine review*, *Journal of Clinical Therapeutic* 9 (2), 136-56.
119. Martin, M., Wellner, A., Ossowski, I., Henle, T., 2008. Identification and quantification of inhibitors for angiotensin-converting enzyme in hypoallergenic infant milk formulas. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6333–6338.
120. Martinez, M.J., Carrera Sánchez, C., Rodríguez Patino, J.M., Pilosof, A.M.R., 2009. Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). *Colloid. Surface. B.* 71(2), 230–237.
121. Matumoto-Pintro, P.T., Rabiey, L., Robitaille, G., Britten, M. Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *Int. Dairy J.* 2011;21:21–26.
122. McComas, K.A., Jr., Gilliland, S.E., 2003. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *Journal of Food Science*, 68, 2090–2095.

123. Meisel, H., Walsh, D., Murray, B., FitzGerald, R.J., 2009. ACE inhibitory peptides, in: Mine, Y., Shahidi, T. (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida pp 269–315.
124. Menrad K., 2003. Market and marketing of functional food in Europe, *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188.
125. Metchnikoff, I.I., 2004. *The prolongation of life: Optimistic studies* (reprinted edition 1907). Springer, New York.
126. Mezzaroba, L.F.H., Carvalho, J.E., Ponezi, A.N., Antonio, M.A., Monteiro, K.M., Possenti, A., Sgarbieri, V.C., 2006. Antiulcerative properties of bovine α -lactalbumin. *Int. Dairy J.* 16, 1005–1012.
127. Miclo, L., Roux, E., Genay, M., Brusseau, E., Poirson, C., Jameh, N., Perrin, C., Dary, A., 2012. Variability of hydrolysis of β -, α s1-, and α s2-caseins by 10 strains of *Streptococcus thermophilus* and resulting bioactive peptides. *J. Agri. Food Chem.* 60, 554–565.
128. Morris, P.E., Fitzgerald, R.J., 2008. *Whey Proteins and Peptides in Human Health - Whey Processing, Functionality and Health Benefits*, Wiley-Blackwell, IFT Press, 285–343.
129. Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J., 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt, *International Journal of Dairy Technology* 59, 123–127.
130. Mortazavian A.M., Ehsani M.R., Azizi A., Razavi S.H., Mousavi S.M., Sohrabvandi S., 2008. Viability of calcium alginate - microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during the refrigerated storage period and under the simulated gastrointestinal conditions, *Australian Journal of Dairy Technology*, 63, 24–29.
131. Mullally, M.M., Meisel, H., FitzGerald, R.J., 1997. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int. Dairy J.* 7, 299–303.
132. Nagaoka, S., 2006. Cholesterol lowering proteins and peptides, in: Mine, Y., Shahidi, T. (Eds.), *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease*. Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, 41–68.

133. Nakai, S., Modler, H.W., 1996. Food proteins, properties and characterization, Wiley – VCH Publishers, New York.
134. Nedović, V., Manojlović, V., Pruesse, U., Bugarski, B., Djonlajić, J., Vorlop, K.D., 2006. Optimization of the electrostatic droplet generation process for controlled microbead production – single nozzle system. *Chemi. Ind. Chem. Eng. Q.* 12, 53-57.
135. Nilsson, M., Holst, J.J., Bjorck, I.M., 2007. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 996–1004.
136. Obradović, N.S., Krunić, T.Ž., Damnjanović, I.D., Vukašinović, M.S., Rakin, M.B., Rakin, M.P., Bugarski, B.M. 2015a. Influence of Whey Proteins Addition on Mechanical Stability of Biopolymer Beads with Immobilized Probiotics. *Tehnika – Novi Materijali* 24 (3), 397–400.
137. Obradović, N.S., Krunić, T.Ž., Trifković, K.T., Bulatović, M.Lj, Rakin, M.P., Rakin, M.B., Bugarski, B.M. 2015b. Influence of Chitosan Coating on Mechanical Stability of Biopolymer Carriers with Probiotic Starter Culture in Fermented Whey Beverages. *International Journal of Polymer Science* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/732858>
138. O’Keeffe, M.B., FitzGerald, R.J., 2014. Antioxidant effects of enzymatic hydrolysates of whey protein concentrate on cultured human endothelial cells, *International Dairy Journal* 36, 128–135.
139. O’Loughlin, I.B., Murray, B.A., Brodkorb, A., FitzGerald, R.J., Kelly, P.M., 2014. Production of whey protein isolate hydrolysate fractions with enriched ACE-inhibitory activity, *International Dairy Journal* 38, 101–103.
140. Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F., Tissier, J.P., Corrieu, G., 2002. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *J. Food Sci.* 67, 2336–2340.
141. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44, 307–315
142. Ozer, B.H., Kirmaci, H.A., 2010. Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 1–15

143. Pajin B., 2009. Praktikum iz tehnologije konditorskih proizvoda, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija.
144. Pajin B., 2014. Tehnologija čokolade i kakaoproizvoda, Tehnološki fakultet Novi Sad, Srbija.
145. Palatnik, D.R., Porcel, M.V.O., González, U., Zaritzky, N., Mercedes, E., 2015. Recovery of caprine whey protein and its application in a food protein formulation LWT-Food Sci.Technol. 63, 331–338.
146. Pan, D., Guo, Y., 2010. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. Int. Dairy J. 20, 472–479.
147. Phelan, M., Kerins, D., 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. Food Funct. 2, 153–167.
148. Pearce, K.N., Kinsella, J.E., 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem., 26 (3), 716–723.
149. Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P., 2001. Isolation and characterisation of four bactericidal domains in the bovine α -lactoglobulin. Biochim. Biophys. Acta. 1526, 131–140.
150. Pellagrani, N., Serafini, M., Colombi, B., Delrio, D., Brighenti, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assayed by three different methods. J. Nutr. 133, 2812–2819.
151. Perez-Masia, R., Lopez-Nicolas, R., Periago, M.J., Ros, G., Lagaron, J.M., Lopez-Rubio, A., 2015. Encapsulation of folic acid in food hydrocolloids through nanospray drying and electrospraying for nutraceutical applications. Food Chem. 168, 124–133.
152. Pernell, C.W., Luck P.J., Foegeding, E.A., Daubert, C.R., 2002. Heat-induced changes in angel food cakes containing egg-white protein or whey protein isolate. J. Food. Sci. 67, 2945–2951
153. Pescuma, M., Hebert, E.M., Mozzi, F., de Valdez, G.F., 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. Food Microbiol. 25, 442–451.
154. Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, F., 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion

- of milk proteins: biological and toxicological implications. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878, 295–308.
155. Picot, A., Lacroix, C., 2004. Encapsulation of Bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in stimulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal* 14 (6), 505–515.
156. Pihlanto-Leppala, A., Rokka, T., Korhonen, H., 1998. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Bovine Milk Proteins. *Int. Dairy. J.* 8, 325–331.
157. Pihlanto-Leppala, A., Koskinen, P., Phlola, K., Tupasela, T., Korhonen, H., 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides *J. Dairy Res.* 67, 53–64.
158. Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, L., Szołtysik, M., Dązbrowska, A., Chrzanowska, J., Polanowski, A., Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzymemodified egg protein by-products, *Food Science & Nutrition* 1(2): 184–195.
159. Poltronieri, P., Cappello, M.S., D’Urso, O.F., 2012. Bioactive Peptides with Health Benefit and their Differential Content in Whey of Different Origin, in Benitez, R.M., Ortero, G.M. (Eds.), *Whey: Types, Composition and Health Implications.* , Nova Publisher , Hauppauge, New York
160. Pouliot Y., Gauthier S.F. (2006). Milk growth factors as health products: Some technological aspects, *International Dairy Journal*, 16, 1415–1420.
161. Power, O., Fernández, A., Norris, R., Riera, F.A., FitzGerald, R.J., 2014. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *J. Funct. Foods.* 9, 38–47.
162. Prasanna, P.H.P., Grandison, A.S., & Charalampopoulos, D. (2012). Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of Bifidobacterium strains in skim milk. *Food Research International*, 47, 6–12.
163. Quintieri, L., Caputo, L., Monaci, L., Deserio, D., Morea, M., Baruzzi, F., 2012. Antimicrobial efficacy of pepsin-digested bovine lactoferrin on spoilage bacteria contaminating traditional Mozzarella cheese. *Food Microbiol.* 31(1), 64–71.

164. Rafter, J., 2002. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective, *British Journal of Nutrition*, 88 89–94.
165. Rammer, P., Groth-Pedersen, L., Kirkegaard, T., Daugaard, M., Rytter, A., Szyniarowski P., Hoyer-Hansen, M., Povlsen, L.K., Nylandsted, J., Larsen, J.E., Jäättelä, M., 2010. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 9, 24–32.
166. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice–Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231–1237
167. Reitelseder, S., Agergaard, J., Doessing, S., Helmark, I.C., Lund, P., 2011. Whey and casein labeled with L-[1-13C]leucine and muscle protein synthesis: effect of resistance exercise and protein ingestion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, 231–242.
168. Requena, P., Daddaoua, A., Guadix, E., Zarzuelo, A., Suárez, M.D., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O., 2009. Bovine glycomacropeptide induces cytokine production in human monocytes through the stimulation of the MAPK and the NF-kappaB signal transduction pathways. *Brit. J. Pharmacol.* 157(7), 1232–1240.
169. Ribeiro, M. C., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L., 2014. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66, 424–431.
170. Roberfroid M.B., 2000. Defining functional foods. In: *Functional foods concept to product*, Woodhead Publishing, Cambridge, U.K, 9–28,
171. Rodriguez-Figueroa, J.C., Reyes-Díaz, R., González-Córdova, A.F., Troncoso-Rojas, R., Vargas-Arispuro, I., Vallejo-Cordoba, B., 2010. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains. *J. Dairy Sci.* 93, 5032–5038.
172. Rodriguez, D.V., 2015. FTIR Investigations of Whey Protein Interactions in Relation to Model Food Systems, Ph.D. thesis, McGill University, Montreal.
173. Rosaneli, C.F., Bighetti, A.E., Antonio, M.A., Carvalho, J.E., Sgarbieri, V.C., 2004. Protective effect of bovine milk whey protein concentrate on the ulcerative

- lesions caused by subcutaneous administration of indomethacin, *J. Med. Food.* 7, 309–314.
174. Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Ehsani, M.R., Yousefi, R., Haertlé, T., Chobert, J.M., Razavi, S.H., Henrich, R., Balalaie, S., Ebadi, S.A., Pourtakdoost, S., Niasari-Naslaji, A., 2010. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis, *J Agric Food Chem.* 58 (6), 3297–3302.
175. Samra, R.A., Wolever, T.M., Anderson, G.H., 2007. Enhanced food intake regulatory responses after a glucose drink in hyperinsulinemic men. *Int. J. Obes. (Lond).* 31, 1222–1231.
176. Sanmartín, B., Díaz, O., Rodríguez-Turienzo, L., & Cobos, A., 2013. Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. *Small Ruminant Research*, 110, 52–56.
177. Sartori, C., Finch, D.S., Ralph, B., Gilding, K., 2007. Determination of the cation content of alginate thin films by FT-IR. spectroscopy. *Polymer.* 38, 43-51.
178. Shah, M.P., 2004. Probiotics and prebiotics, *Agro-Food Industry Hi-tech*, 15, 13–16.
179. Sharma, R., Shah, N., 2010. Approximate composition of biologically active components of whey. *Nutrafoods.* 9(4), 39–45.
180. Shi, J., Ahlroos-Lehmus, A., Pilvi, T.K., Korpela, R., Tossavainen, O., Mervaala, E.M., 2012a. Metabolic effects of a novel microfiltered native whey protein in diet-induced obese mice. *J. Funct. Foods.* 4(2), 440–449.
181. Shi, J., Finckenberg, P., Martonen, E., Ahlroos-Lehmus, A., Pilvi, T.K., Korpela, R., Mervaala, E.M. 2012b. Metabolic effects of lactoferrin during energy restriction and weight regain in diet-induced obese mice *J. Funct. Foods.* 4(1), 66–78.
182. Seppo, L., Kerojoki, O., Suomalainen, T., Korpela, R., 2002. The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension - a pilot study on humans. *Milchwissenschaft* 57, 124–127.
183. Silveira, S.T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Hernández-Ledesma, B., 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chem.* 141, 1072–1077.

184. Sipola, M., Finckenberg, P., Vapaatalo, H. Pihlanto-Leppala, A., Korhonen, H., Korpela, R., Nurminen, M.L., 2002. Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 71, 1245–1253.
185. Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H.H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., Fisk, I., 2014. Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: the case of pan bread. *Food Hydrocolloid.* 39, 231–242.
186. Souissi, N., Bougatef, A., Ellouz YT.,and Nasri M., 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates, *Food Technol. Biotechnol.* 45, 187–194.
187. Spellman, D., McEvoz, E., O’Cuinn, G., FitzGerald, R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis, *International Dairy Journal*, 13, 6, 447–453.
188. Spence J.T., 2006. Challenges related to the composition of functional foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 4–6.
189. Svanborg, C., Argestam, H., Aronson, A., Bjerkgvig, R., Durringer, C., 2003. HAMLET kills tumor cells by an apoptosis-like mechanism – cellular, molecular, and therapeutic aspects. *Adv. Cancer Res.* 88, 1–29.
190. Tamime, A.Y., Saarela, M.A.K.S., Sondergaard, A.K., Mistry, V.V., Shah N.P., 2005. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. *Probiotic dairy products*, 39–72.
191. Tang, X., Wu, Q. P., Le, G. W., Wang, J., Yin, K. J., & Shi, Y. H., 2012. Structural and antioxidant modification of wheat peptides modified by the heat and lipid peroxidation product malondialdehyde. *Journal Food Science* 77, 16–22.
192. Tavares, T.G., Contreras, M.M., Amorim, M., Martín-Álvarez, P.J., Pintado, M.E., Recio, I., Malcata, F.X., 2011. Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis, antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolyzates obtained with cardoon extract. *Int. Dairy J.* 21, 926–933.
193. Tavares, T.G, Malcata, F.X. (2013). Whey Proteins as Source of Bioactive Peptides Against Hypertension, Dr. Blanca Hernández-Ledesma (Ed.), *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*, InTech,

URL:<https://www.intechopen.com/books/bioactive-food-peptides-in-health-and-disease/whey-proteins-as-source-of-bioactive-peptides-against-hypertension>

194. Theolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., Jean, J., 2013. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J. Funct. Foods*. 5, 706–714.
195. Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Topisirovic, Lj., Kojic, M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiol.* 39, 27–38.
196. Tidona, F., Criscione, A., Guastella, M., Zuccaro, A., Bordonaro, S., Marletta, D., 2009. Bioactive peptides in dairy products. *Italian J. Animal Sci.* 3, 1003–1009.
197. Tipton, K.D., Elliott, T.A., Cree, M.G., Wolf, S.E., Sanford, A.P., 2004. Ingestion of casein and whey proteins result in muscle anabolism after resistance exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 36, 2073–2081.
198. Tripathy, M.K., Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *J. Funct. Foods*. 9, 225–241.
199. Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., Paquin, P., 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptides fraction obtained with a two step ultrafiltration process. *J. Agric. Food Chem.* 39, 637–676.
200. Uchida, M., Ohshiba, Y., Mogami, O., 2011. Novel dipeptidyl peptidase-4 inhibiting peptide derived from betalactoglobulin. *J. Pharmacol. Sci.* 117, 63–66.
201. Udenigwe, C.C., Mohan, A., 2014. Mechanisms of food proteinderived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *J. Funct. Foods*. 8, 45–52.
202. Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Li, H., Cui, W., Xue, H., Zhao, L., Sun, W., Lu, J., Lv, J., 2014. Pilot-scale membrane fractionation of ACE inhibitory and antioxidative peptides from ultrasound pretreated milk protein concentrate hydrolysates. *J. Funct. Foods* 7, 350–361.
203. Yang, J.H., Mau, J.L., Ko, P.T., Huang, L.C., 2000. Antioxidant properties of fermented soybean broth, *Food Chem.* 71, 249–254.
204. Ying, D., Schwander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., Augustin, M. A., 2013. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG

- in whey protein and resistant starch matrices: probiotic survival in fruit juice. *J. Funct. Foods*. 5, 98–105.
205. Yun-hui, C., Zhang, W., Shi-ying, X., 2006. Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro. *J. Cent. South. Univ. Technol.* 13, 160–165.
 206. Van der Ven, C., Muresan, S., Gruppen, H., De Bon,t D.B,A., Merck, K.B., Voragen, A.G.P., 2002. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *J. Agric. Food Chem.* V. 50, 6943–6950.
 207. Varga L, 2006. Effect of acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 108: 272–275.
 208. Vasiljević, T., Shah, N.P., 2008. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives, *International Dairy Journal*, 18, 714–728.
 209. Vinderola, C.G., Costa, G.A., Regenhardt, S., Reinheimer, J.A., 2002. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria, *International Dairy Journal* 12, 579–589.
 210. Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895–904.
 211. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S., Korhonen, H., 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol.* 102 (1), 106–115.
 212. Vrbaški, Lj., Markov, S., 1993. *Practicum of microbiology* (1st ed.). Prometej. Serbia.
 213. Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M., 2006. Lactoferrin research, technology and application. *Int. Dairy. J.* 16, 1241–1251.
 214. Walstra, P., 2003. Proteins. In: Walstra P, editor. *Physical chemistry of foods*. New York, N.Y. qel Dekker, Inc. 203–249.
 215. Wang, J.S., Zhao, M.M., Zhao, Q.Z., Jiang, Y.M., 2007. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chem* 101, 1658–1663.

216. Wang, Q., Hu, X., Du, Y., Kennedy, J.F., 2010. Alginate/starch blend fibers and their properties for drug controlled release. *Carbohydr. Polym.* 82, 842–847.
217. Walstra, P., 2003. *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker, Inc.
218. Welderufael, F., Jauregi, P., 2010. Development of an integrative process for the production of bioactive peptides from whey by proteolytic commercial mixtures. *Separ. Sci. Technol.* 45, 2226–2234.
219. Wojcik, M., Burzynska–Pedziwiatr, I., Wozniak, L.A., 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr. Med. Chem.*, 17, 3262–3288.
220. Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., Delcou J.A., 2016. Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 15(4), 786–800.
221. Wronkowska, M., Jadacka, M., Soral-Smietana, M., Zander, L., Dejnowiec, F., Banaszczyk, P., Jelinski, T., Sztatowicz, B., 2015. ACID whey concentrated by ultrafiltration a tool for modeling bread properties. *LWT-Food Sci. Technol.* 61, 172–176.
222. Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C.P., Neufeld, R.J., 1998. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology* 84 (3), 342–348.
223. Zimecki, M., Kruzel, M.L., 2007. Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *J. Exp. Ther. Oncol.* 6, 89–106.
224. Zuidam, N.J., Shimoni, E., 2009. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer-Verlag, New York Inc., 3–29.
225. Zydny, A.L., 1998. Protein separations using membrane filtration: new opportunities for whey fractionation. *Int. Dairy J.* 8, 243–250.

Biografija kandidata

Tanja Ž. Krunić je rođena 06.04.1985. godine u Dubrovniku, Hrvatska. Osnovnu i srednju školu završila je u Herceg Novom. Studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu upisala je školske 2004/2005. godine, na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, gde je i diplomirala 24.09.2010. godine sa prosečnom ocenom tokom studija 9,11 i odbranom diplomskog rada pod nazivom „Ocena i kontrola kvaliteta polutrajnih proizvoda od mesa“ sa ocenom 10,0 (deset). Dobitnik je Specijalnog priznanja koje dodeljuje Srpsko hemijsko društvo najboljim diplomiranim studentima hemije i hemijske tehnologije na Univerzitetima u Srbiji.

Školske 2011/2012. god. upisala je doktorske studije na Katedri za biohemijsko inženjerstvo i biotehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu. Tokom studija položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija, uključujući i završni ispit, sa prosečnom ocenom 9,75.

Od 01.12.2011. godine Tanja Ž Krunić je zaposlena u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, kao istraživač na projektu Tehnološkog razvoja TR 31017 pod nazivom „*Proizvodnja mlečne kiseline i probiotika na otpadnim proizvodima prehrambene i agro-industrije*“, finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. U periodu 2012-2013. učestvovala je u realizaciji Inovacionog projekta pod nazivom „*Fermentisani napici na bazi surutke kao novi funkcionalni mlečni proizvodi*“, ev. broj 451-03-2372-IP Tip 1/85 finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz koga je realizovano Tehničko rešenje pod nazivom „*Proizvodnja funkcionalnog fermentisanog napitka od surutke i mleka*“ potvrđeno od strane AD Imlek Beograd kao krajnjeg korisnika. U periodu 2014-2015. učestvovala je u realizaciji Inovacionog projekta pod nazivom „*Proizvodnja i primena bioaktivnih proteina i peptida surutke i mleka*“, ev. broj 451/03/2802/2013-16/176 finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije iz koga je realizovano Tehničko rešenje „*Unapređenje funkcionalnih karakteristika fermentisanog napitka od surutke i mleka dodatkom bioaktivnih peptida*“ i prihvaćeno od strane AD Bimlek, Makedonija kao krajnjeg korisnika.

Tanja Ž. Krunic je dobitnik nagrade za kreiranje novog ekoinovativnog fermentisanog napitka pod nazivom „Active drink“ na prvom takmičenju studentskih timova u kreiranju ekoinovativnih prehrambenih proizvoda-ECOTROPHELIA SRBIJA, organizovanog od strane Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije, održanog 19 jula 2013. godine.

Angažovana je na izvođenju vežbi iz predmeta Biotehnološki praktikum 2 (školska 2013/2014; 2014/2015; 2015/2016; 2016/2017) na osnovnim studijama.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тања Крунић

број индекса 4053/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Производња и примена биоспецифичних протеина и пептида
сирачке

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 06.07.2017

Тања Крунић

Prilog 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Тања Крунић
Број индекса 4059/2011
Студијски програм БИОХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЈА
Наслов рада ПРОИЗВОЂАЊА И ПРИМЕНА БИОАКТИВНИК ПРОТЕИНА И ПЕПТИДА СУРЖИ
Ментор Проф. др Марица Ракић, редовни проф. Технолошко-металуршког
факултета, Универзитет у Београду
Потписани/а Тања Крунић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 06.07.2017

Тања Крунић

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ПРОИЗВОДЊА И ПРИМЕНА БИОАКТИВНИХ ПРОТЕИНА И ПЕПТИДА СУРУТКЕ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 06.07.2017.

ТАЈБА Крст

Prilog 4.

ČOKOLADA

DATUM _____

ŠIFRA UZORKA _____ ŠIFRA OCENJIVAČA _____

| Intenzitet braon boje | | | | | | |
|-----------------------|---|---|-----------|---|---|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| ekstremno svetla, | | | optimalna | | | ekstremno tamna, |

| Sjaj površine | | | | | | |
|---------------|---|---|-----------|---|---|------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| mat | | | optimalno | | | ekstremno sjajno |

| Miris kakaoa (u odnosu na kakao masu korišćenu u proizvodnji uzorka) | | | | | | |
|--|---|---|-----------|---|---|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| slabo | | | optimalno | | | jako |

| Topivost (vreme potrebno da se čvrsta čokolada prevede u tečno stanje pomeranjem jezika) | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| sporo | | | | | | brzo |

| TVRDOĆA (sila potrebna za prelom uzorka prednjim zubima) | | | | | | |
|--|---|---|-----------|---|---|-----------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| ekstremno meko | | | optimalno | | | ekstremno tvrdo |

| Peskovitost (količina sitnih čestica u ustima prilikom žvakanja) | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| glatko | | | | | | zrnavo |

| Adhezivnost (stepen do kog se uzorak lepi za kutnjake) | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| slabo | | | | | | jako |