



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET  
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO



***IN VITRO* DIGESTIJA I NJEN  
UTICAJ NA AKTIVNOST,  
STABILNOST I DOSTUPNOST  
BIOLOŠKI AKTIVNIH JEDINJENJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

dr Ljiljana Popović, vanredni profesor

Kandidat:

Jelena Čakarević, mast. inž.

Novi Sad, 2021. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

OBRAZAC– 5a

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA<sup>1</sup>

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Jelena Čakarević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija):	dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad
Naslov rada:	<i>In vitro</i> digestija i njen uticaj na aktivnost, stabilnost i dostupnost biološki aktivnih jedinjenja
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica (167) Poglavlja (7) Referenci (249) Tabela (20) Slika (44)
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Enzimsko inženjerstvo
Ključne reči / predmetna odrednica:	<i>In vitro</i> digestija, biljni proteini, uljana pogača, proteinski izolat, funkcionalne osobine proteina, enzimi, inkapsulacija, biološki aktivna jedinjenja
Rezime na jeziku rada:	<p>Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije bio je uticaj <i>in vitro</i> digestije kao modela koji se koristi u ispitivanju svarljivosti i dostupnosti hrane i njenih sastojaka. Kao glavna komponenta hrane ispitani su proteini koji su izolovani iz nusproizvoda industrije ulja. Proteini su ispitani kroz nekoliko aspekata njihove primene, kao što su izvori i nosači bioaktivnih jedinjenja, kao i njihova implementacija u razne formulacije sa ciljem unapređenja ili kreiranja novih produkata. Osim toga, svi ovi aspekti proteina ispitani su i kroz njihovu svarljivost radi primene u ishrani ljudi.</p> <p>Primena <i>in vitro</i> digestije kao modela ima za cilj da omogući ponašanje bioaktivnih jedinjenja iz hrane nakon prolaska kroz digestivni trakt čoveka. To je enzimski proces hidrolize primenom dve proteaze prisutne u digestivnom traktu čoveka, pepsin i pancreatin. Hidroliza je strogo kontrolisan proces pod određenim uslovima, kao što su temperature, vrednost pH, vreme, odnos enzim/supstrat.</p> <p>Rezultati prikazani u ovoj disertaciji čine naučno saznanje o primeni <i>in vitro</i> digestije kao modela u cilju predviđanja svarljivosti hrane i „sudbine“ bioaktivnih jedinjenja nakon izloženosti uslovima gastrointestinalnog trakta. Takođe, sve je veća primena i valorizacija nusproizvoda industrije kao izvora proteina i dobijanja proizvoda koji osim ishrane životinja mogu naći i primenu u ishrani ljudi. Dobijenim proteinskim izolatima dokazana je primena kao</p>

<sup>1</sup> Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće:

5b – Izjava o autorstvu;

5v – Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije i o ličnim podacima;

5g – Izjava o korišćenju.

Ove Izjave se čuvaju na fakultetu u štampanom i elektronskom obliku i ne koriče se sa tezom.

	izvora bioaktivnih jedinjenja, nosača u inkapsulaciji i dodatka u prehrambeni matriks sa ciljem obogaćenja postojećih proizvoda ili kreiranja novih.
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	25.04.2019.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	Predsednik: dr Vesna Tumbas Šaponjac, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad Član (mentor): dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad Član: dr Jadranka Fraj, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad Član: dr Tamara Dapčević Hadnađev, viši naučni saradnik, Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institut za prehrambene tehnologije Novi Sad
Napomena:	

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OR CENTER

KEY WORD DOCUMENTATION<sup>2</sup>

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Jelena Čakarević
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad
Thesis title:	<i>In vitro</i> digestion and its effect on activity, stability and availability of bioactive compounds.
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages (167) Chapters (7) References (249) Tables (20) Illustrations (44)
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Enzymatic engineering
Subject, Key words:	<i>In vitro</i> digestion, vegetable proteins, oil cake, protein isolate, functional properties of proteins, enzymes, encapsulation, bioactive compounds
Abstract in English language:	<p>The research of this doctoral dissertation was the influence of <i>in vitro</i> digestion as a model that could be used in the examination of digestibility and availability of food and its ingredients. Proteins isolated from oil industry by-products were tested as the main food component. Proteins have been investigated through several aspects of their application, such as sources and carriers of bioactive compounds, as well as their implementation in various formulations with the aim of improving or creating new products. In addition, all these aspects of proteins have been examined through their digestibility for use in human nutrition.</p> <p>The use of <i>in vitro</i> digestion as a model aims to enable the behavior of bioactive compounds from food after passing through the human digestive tract.</p>

<sup>2</sup> The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

56 – Statement on the authority,

5B – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5r – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<i>In vitro</i> digestion is an enzymatic process of hydrolysis using two proteases present in the human digestive tract, pepsin and pancreatin. Hydrolysis is a strictly controlled process under certain conditions, such as temperature, pH, time, enzyme / substrate ratio. The results presented in this dissertation constitute scientific knowledge on the application of <i>in vitro</i> digestion as a model in order to predict the digestibility of food and the "fate" of bioactive compounds after exposure to gastrointestinal tract conditions. Also, there is a growing use and valorization of by-products of industry as a source of protein and obtaining products that, in addition to animal nutrition, can also be used in human nutrition. The obtained protein isolates have been proven to be used as a source of bioactive compounds, carriers in encapsulation and addition to the food matrix with the aim of enriching existing products or creating new ones.
Accepted on Scientific Board on:	25.04.2019.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr Vesna Tumbas Šaponjac, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member (supervisor): dr Ljiljana Popović, associate professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Jadranka Fraj, assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Tamara Dapčević Hadnađev, senior research associate, University of Novi Sad, Institute of Food Technology Novi Sad</p>
Note:	

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
2. Cilj istraživanja.....	4
3. Pregled literature .....	7
3.1. <i>In vitro</i> digestija kao model sistem za ispitivanje svarljivosti .....	8
3.1.1. Faze <i>in vitro</i> digestije .....	11
3.1.2. Digestivni enzimi .....	12
3.1.3. Biodostupnost i bioraspoloživost jedinjenja nakon <i>in vitro</i> digestije.....	14
3.1.4. Primena metode <i>in vitro</i> digestije.....	16
3.2. Proteini.....	18
3.2.1. Biljni proteini .....	19
3.2.2. Nusproizvod prerade ulja kao potencijalni izvor proteina .....	21
3.2.3. Funkcionalne osobine proteina.....	24
3.2.4. Unapređenje funkcionalnih osobina proteina.....	27
3.3. Proteini kao izvori bioaktivnih jedinjenja .....	33
3.3.1. Enzimaska hidroliza.....	33
3.3.2. Gastrointestinalna digestija.....	34
3.3.3. Fermentacijom usled proteolitičke aktivnosti mikroorganizama.....	34
3.3.4. Bioaktivne osobine peptida.....	34
3.4. Proteini kao nosači bioaktivnih jedinjenja.....	39
3.5. Ugradnja proteina u prehrambeni matriks .....	42
4. Materijal i metode .....	44
4.1. Materijali.....	45
4.1.1. Sirovine .....	45
4.1.2. Hemikalije i reagensi.....	45
4.2. Metode .....	46
4.2.1. Hemijski sastav uljanih pogača .....	46
4.2.2. Postupci dobijanja proteinskog izolata, konjugata, inkapsulata i ugradnje inkapsulata u matriks 46	
4.2.3. Hemijske analize u karakterizaciji proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa.....	50
4.2.4. Karakterizacija proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa .....	52
4.2.5. Određivanje funkcionalnih osobina proteinskih izolata i konjugata .....	56
4.2.6. Ispitivanje svarljivosti i bioaktivnosti dobijenih hidrolizata proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa.....	58
4.2.7. Matematička analiza rezultata .....	61
5. Rezultati i diskusija.....	63
5.1. Proteini kao funkcionalni agens i izvor biološki aktivnih jedinjenja .....	64
5.1.1. Izolovanje i karakterizacija proteinskih izolata .....	64
5.1.2. Karakterizacija proteinskih izolata- Funkcionalne osobine.....	69

5.1.3.	Unapređenje funkcionalnih osobina proteinskog izolata .....	74
5.1.4.	Svarljivost proteinskih izolata i konjugata- <i>In vitro</i> digestija.....	83
5.1.5.	Biološke osobine proteinskih izolata nakon <i>in vitro</i> digestije .....	89
5.1.6.	Biološke osobine konjugata nakon <i>in vitro</i> digestije .....	94
5.2.	Proteini kao nosači bioaktivnih jedinjenja.....	96
5.2.1.	Efikasnost inkapsulacije .....	96
5.2.2.	Boja inkapsulata.....	97
5.2.3.	Karakterizacija inkapsulata.....	99
5.2.4.	Fizičke karakteristike inkapsulata .....	104
5.2.5.	<i>In vitro</i> digestija inkapsulata.....	106
5.2.6.	Biološke osobine inkapsulata nakon <i>in vitro</i> digestije.....	107
5.3.	Ugradnja proteinskih formulacija u matriks .....	114
5.3.1.	Fizičke karakteristike.....	115
5.3.2.	Senzorska ocena.....	117
5.3.3.	Promene tokom skladištenje .....	118
5.3.4.	Glikemijski indeks.....	123
5.3.5.	<i>In vitro</i> digestija .....	125
5.3.6.	Dostupnost bioaktivnih jedinjenja nakon <i>in vitro</i> digestije.....	127
5.3.7.	Bioaktivnost nakon <i>in vitro</i> digestije.....	128
6.	Zaključak.....	132
7.	Literatura.....	138

# ***1. Uvod***



*In vitro* digestija kao model sistem, u poslednjih nekoliko godina, predstavlja glavni alat za ispitivanje svarljivosti i tzv. „sudbine“ hrane i njenih aktivnih komponenti nakon direktnog konzumiranja. Nutritivna i biološka aktivnost hrane može biti narušena prolaskom kroz digestivni trakt, stoga je ispitivanje dostupnosti i raspoloživosti aktivnih jedinjenja nakon izloženosti uslovima probave od velikog značaja. Naučnim istraživanjima stvoren je veliki broj modela *in vitro* digestije u cilju što bolje simulacije realnog gastrointestinalnog trakta čoveka i objašnjenja aspekata koji se odnose na aktivnost, stabilnost i dostupnost biološki aktivnih komponenata hrane kao i same hrane.

Jedni od glavnih konstituenata hrane jesu proteini. Oni imaju dve osnovne funkcije: biološke i tehno-funkcionalne. Biološke funkcije proteina odnose se na njihova nutritivna, fiziološka i neka bioaktivna svojstva, kao što su antioksidativna, antihipertenzivna, antiglikemijska, i dr. Dok je tehno-funkcionalnost proteina povezana sa njihovim fizičko-hemijskim osobinama koja utiču na izgled, teksturu i stabilnost prehrambenih proizvoda (npr. rastvorljivost, viskoznost, penušanje, sposobnost emulgovanja i želiranja, kapacitet vezivanja vode i ulja). S obzirom na veliku zastupljenost proteina u ishrani ljudi, potražnja za proteinima mesa, mleka i ribe konstantno raste i očekuje se da će udvostručiti do 2050. godine (FAO, 2013). Zbog toga je sve veća potreba za alternativnim izvorima proteina. Biljni proteini, poslednjih godina, imaju veliki značaj i primenu u ishrani ljudi. Svetska populacija svoje potrebe za proteinima zadovoljava sa 70% proteinima iz biljnih izvora. Takođe, lične preference potrošača, poput religije i veganske/vegetarijanske ishrane utiču na sve veću zainteresovanost za ovim proteinima.

Osim toga, biljni proteini mogu biti izolovani iz alternativnih izvora, kao što su nusproizvodi prehrambene industrije koji nemaju veliku upotrebnu vrednost, i koriste se najčešće kao stočna hrana. Preusmeravanje ovakvih izvora proteina iz proizvoda namenjenih životinjskoj ishrani u sirovine za ishranu ljudi zahtevalo je ozbiljan angažman obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja, kako bi se uklonili svi uzroci koji mogu ograničiti njihovu primenu u navedene svrhe

Jedan od najznačajnijih aspekata primene proteina je njihov potencijal kao izvora biološke aktivnosti koji se ogleda kroz produkciju hidrolizata (peptida). Proteinski hidrolizati, odnosno peptidne frakcije se oslobađaju iz native strukture proteina delovanjem enzima, nekim mehaničkim ili hemijskim tretmanom. Peptidi u svom sastavu nose određenu aminokiselinsku sekvencu koja može da ima određene biološke aktivnosti. Najčešće aktivnosti koje nose peptidne frakcije jesu antioksidativna, antimikrobna, antihipertenzivna, antiglikemijska i dr. .

Drugi značajan aspekt primene proteina zbog njihovih izuzetno dobrih funkcionalnih karakteristika jeste upotreba proteina kao nosača u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja. U odnosu na sintetske nosače, proteini se odlikuju visokom nutritivnom vrednošću, povoljnim funkcionalnim osobinama, dobrom svarljivošću, ali i predstavljaju relativno jeftine i lako dostupne sirovine. Osim toga, proteini mogu da se kombinuju sa različitim prirodnim jedinjenjima poput polisaharida ili polifenola i na taj način mogu da stvaraju komplekse koji imaju poboljšane funkcionalne i biološke osobine i time da poboljšaju kvalitet finalnog proizvoda.

Sve ove osobine ukazuju na veliki potencijal proteinskih formulacija za ugradnju u različite vrste prehrambenih matriksa sa ciljem kreiranja proizvoda poboljšanih nutritivnih i senzornih osobina. Ovakav tip proizvoda predstavlja novu generaciju funkcionalnih proizvoda koji zadovoljavaju potrebe potrošača modernog doba, sportista, nutricionista, dijabetičara, itd. U svetlu današnjih trendova na svetskom i domaćem tržištu prehrambenih proizvoda, gde je sve veća potražnja za proizvodima koji sadrže ili su obogaćeni prirodnim komponentama, ugradnja proteinskih formulacija u različite prehrambene matrikse predstavlja atraktivnu oblast naučnih istraživanja, ali i izazov sa aspekta praćenja aktivnosti, stabilnosti i dostupnost biološki aktivnih komponenta nakon direktnog konzumiranja.

## ***2. Cilj istraživanja***

Cilj doktorske disertacije je primena *in vitro* metode za ispitivanje svarljivosti, dostupnosti i aktivnosti proteina i njihovih formulacija. Istraživanja su fokusirana na primeni *in vitro* digestije na ponašanje proteina iz biljnih izvora kroz tri aspekta: (I) proteina kao izvora bioaktivnih jedinjenja; (II) proteina kao nosača u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja; (III) ugradnje proteinskih formulacija u prehrambeni matriks.

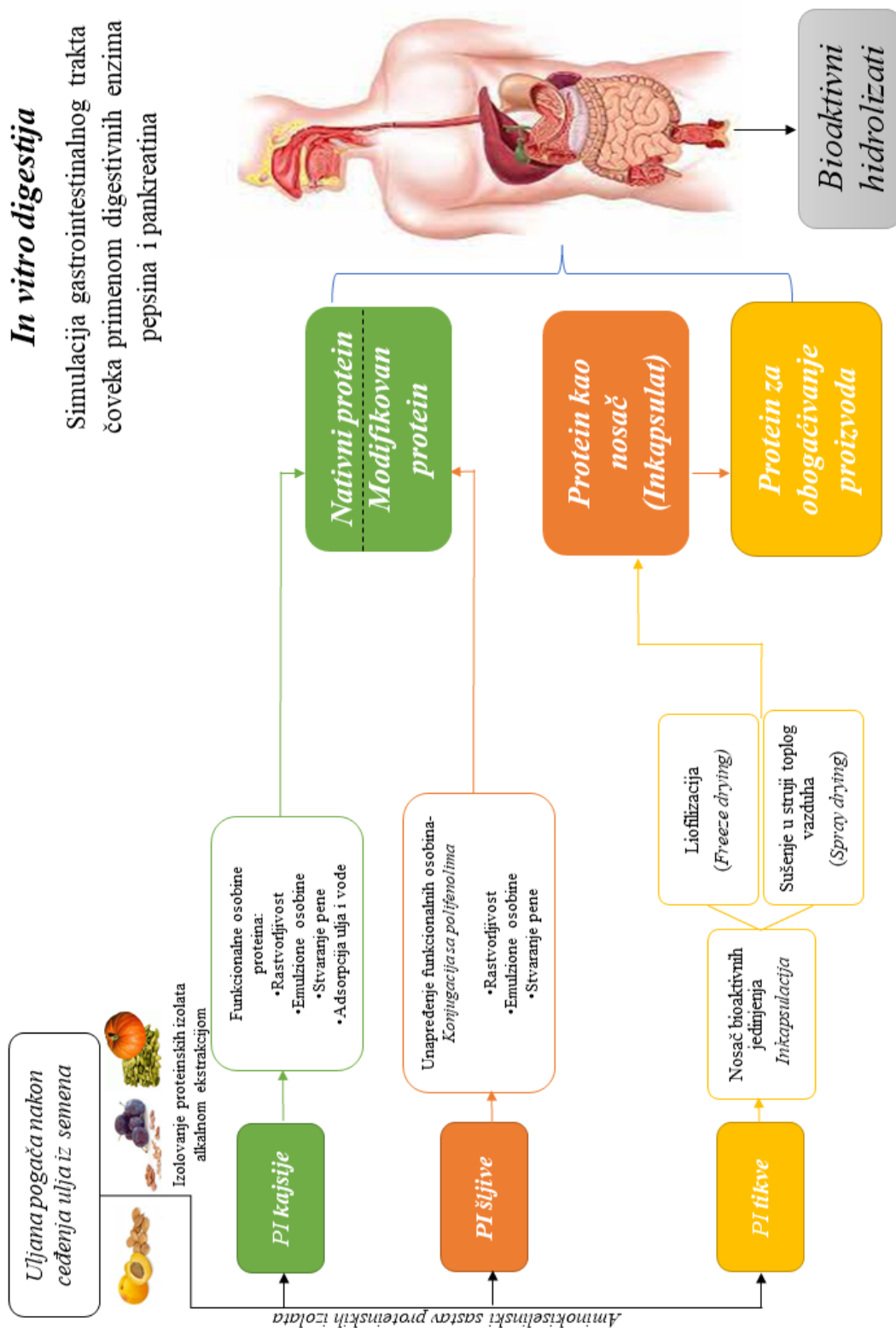
Istraživanja sprovedena u ovoj disertaciji usmerena su na dobijanje proteinskih izolata iz nusproizvoda industrije ulja, uljanih pogača semena tikve (*Cucurbita pepo*), kajsijske (*Prunus armeniaca*) i šljive (*Prunus domestica*).

Grafički prikaz plana eksperimenata koji su izvedeni u radu na ovoj disertaciji prikazan je na Slici 1. Istraživanja su izvedena u okviru tri glavne faze:

1. Definisane uljanih pogača, dobijenih nakon ekstrakcije ulja, kao izvora proteina. Dobijanje proteinskih izolata i njihova karakterizacija u pogledu funkcionalnih osobina sa ciljem moguće primene u raznim prehrambenim sistemima. Osim toga, unapređenje funkcionalnih osobina proteinskog izolata izvedeno je konjugacijom sa polifenolima. Ispitivanje svarljivosti izolata i konjugata izvedeno je primenom modela *in vitro* digestije, koju je pratilo određivanje bioloških aktivnosti dobijenih hidrolizata kao i njihove biodostupnosti.
2. Ispitivanje potencijala proteinskog izolata kao nosača u procesu inkapsulacije bioaktivnih jedinjenja. Ispitivanje njegovog uticaja na zaštitu inkapsuliranih jedinjenja od degradacije koja može nastati pod uticajem spoljnih faktora, kao što su svetlost, vazduh, vlaga, i uticaja koji nastaju nakon procesa *in vitro* digestije.
3. Ugradnja dobijenih inkapsulata u realan prehrambeni matriks sa ciljem dobijanja funkcionalnog proizvoda, kao i ispitivanje njegovih fizičko-hemijskih osobina i dostupnosti bioaktivnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije.

## In vitro digestija

Simulacija gastrointestinalnog trakta  
čoveka primenom digestivnih enzima  
pepsina i pankreatina

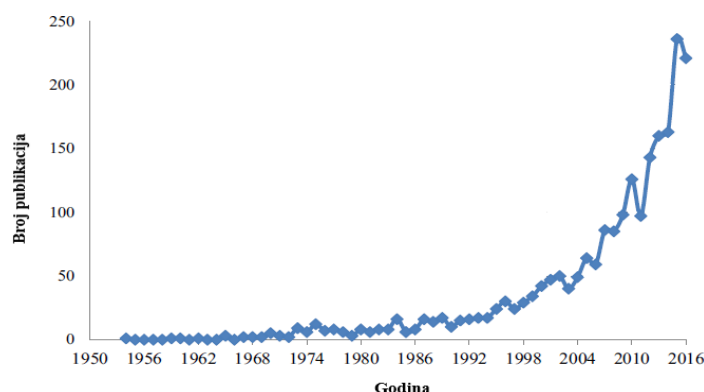


### ***3. Pregled literature***

### 3.1. *In vitro* digestija kao model sistem za ispitivanje svarljivosti

U poslednjih nekoliko godina raste interesovanje za modelom kao sistemom za ispitivanjem i dokazivanje aktivnosti, stabilnosti i dostupnosti različitih komponenti hrane tj. njihove „sudbine” nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT). Dosadašnja naučna istraživanja dokazuju da ispitivanje biodostupnosti komponenata iz hrane i zadržavanje biološke aktivnosti predstavlja izazov kako zbog različitih mehanizama njihove apsorpcije tako i zbog prirode bioaktivnih jedinjenja. Stoga, naučna istraživanja su sve više usmerena na ispitivanje digestije u cilju objašnjenja aspekata koji se odnose na aktivnost, stabilnost i dostupnost, interakciju i oslobađanje aktivnih komponenata hrane kao i same hrane (Karaš i sar., 2017).

Prva naučna studija o digestiji kao *in vitro* metodi potiče iz 1954. godine, što je svake godine praćeno sve većom publikacijom. Najvažniji naponi za simulaciju ljudskog želuca i tankog creva učinjeni su u poslednje dve decenije, u kojoj je objavljeno više od 85% do danas objavljenih radova. U prethodnih deset godina, objavljeno je više od 150 radova godišnje koji se odnose na *in vitro* digestiju hrane, a vrhunac je dostignut 2015. kada je objavljeno 218 radova. Nakon toga započinje ekspanzija naučnih studija na temu primene *in vitro* digestije kao metode za ispitivanje svarljivosti hrane i njenih sastojaka koja se nastavlja i danas (Slika 2). Istraživanja pokazuju da su *in vitro* modeli digestije primenjivani na različite vrste hrane i njene sastojke, najčešća testirana hrana bila je: povrće (26%), mlečni proizvodi (23%), pekarski proizvodi (17%), proizvodi od mesa (13%), plodovi mora (12%) i hrana sa jajima (7%). (Lucas-González i sar., 2018).

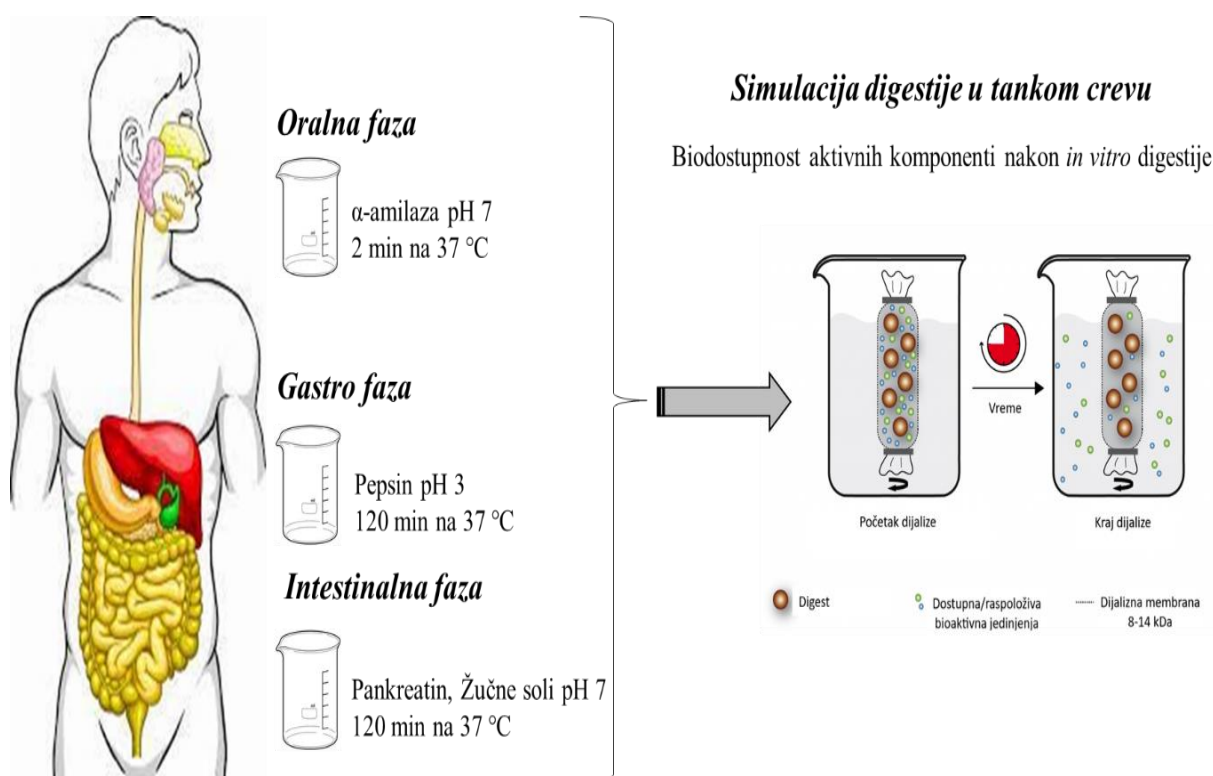


Slika 2. Rast broja publikacija tokom vremena o metodama *in vitro* digestije (Lucas-González i sar., 2018)

Veliki broj *in vitro* metoda u poslednjih nekoliko godina je i zbog toga što su *in vivo* ispitivanje vremenski dugotrajna i zahtevaju poštovanje etičkog kodeksa zbog studija koje se sprovode na ljudima i životinjama (Boisen i Eggum, 1991). Korelacija između *in vivo* i *in vitro* metoda jeste od fundamentalnog značaja za razvoj *in vitro* metoda. Brojna naučna istraživanja potvrđuju pozitivnu korelaciju između ovih metoda (Kleinert i sar., 2018; Brown i sar., 2014; Vetrani i sar., 2016). Prednosti *in vitro* metoda jeste da su brze, jeftine, omogućuju ispitivanje velikog broja uzoraka istovremeno i nemaju etička ograničenja, što ih čini pogodnim za postavljanje hipoteza u naučnim istraživanjima (Bohn i sar., 2017). Princip *in vitro* metode jeste uspostavljanje sistema koji simulira oslobađanje bioaktivne komponente na specifičnoj lokaciji u GIT-u čoveka. Takođe, sistem može biti dizajniran da kontroliše brzinu bioaktivnog oslobađanja, direktno ili kontrolisano (postepeno) otpuštanje. Prema tome, neophodno je istraživanje *in vitro*- *in vivo* korelacija sa dobro definisanim sistemima, tako da se mogu razviti što realniji *in vitro* modeli koji će se koristiti za ispitivanje bioraspoloživosti i svarljivosti hrane.

*In vitro* digestija šematski je prikazana na Slici 3. Metoda *in vitro* digestije zasniva se na primeni specifičnih enzima u svojim optimalnim uslovima sa ciljem ostvarivanja maksimalne vrednosti svarljivosti. Postoji niz faktora koji imaju značajan uticaj na rezultat *in vitro* digestije, kao što su karakteristike uzorka, aktivnost enzima, jonski sastav, primenjena mehanička sila i vreme. Stoga, uslovi *in vivo* nikada ne mogu biti u potpunosti simulirani pod *in vitro* uslovima. Studija Boisen i Eggum (1991) bila je prva koja je definisala odnos između *in vitro* uslova i aktivnosti enzima. Prema tome, najvažniji faktor *in vitro* digestije jeste enzim. Izbor enzima, uslovi inkubacije i oprema izvođenja zavise isključivo od cilja istraživanja. Digestija može da se izvodi sa jednim enzimom ukoliko se ispituje svarljivost i sudbina specifične hrane ili njenih sastojaka, kao što je svarljivost proteina primenom pepsina, skroba primenom amilaze ili lipida primenom lipaza. Međutim, u slučaju složenih uzoraka digestija se izvodi smešom enzima jer svarljivost jedne aktivne komponente može da ima uticaj na svarljivost druge.



Slika 3. Šematski prikaz *in vitro* digestije

Razvijen je veliki broj modela *in vitro* digestije, koji mogu biti statički i dinamički modeli. Zastupljeni su statički modeli gde se digestija u želucu i tankim crevima simulira u dva uzastopna koraka. Statički modeli simuliraju želudac i/ili creva koristeći niz sudova sa mešanjem koji simuliraju skup biohemijskih procesa (temperaturu, enzime, pH i žučne soli) koji čine GIT. Prednost statičkih modela jeste lakoća i mali troškovi, dok nedostatak su značajne varijacije u praćenju i primeni digestivnih parametara. U okviru COST akcije standardizovan je statistički protokol *in vitro* digestije pod nazivom INFOGEST (Minekus *i sar.*, 2014), koji je zasnovan na dosadašnjim istraživanjima o uslovima *in vivo* digestije. Dinamički modeli su složeniji modeli. Oni predstavljaju sistem koji se sastoji od nekoliko delova koji su međusobno povezani i programirani sa ciljem simulacije GIT-a čoveka. U poređenju sa statičkim modelima, dinamički omogućavaju simulaciju dinamičkih aspekata varenja, kao što su transport obroka, konstantno lučenje digestivnih sokova, promenljive koncentracije enzima i promene pH tokom vremena koje se dešavaju u uslovima *in vivo* (Li *i sar.*, 2020). Nedostatak ovakvih modela jesu velika ulaganja u opremu i osoblje koje rukovodi sistemom.

### 3.1.1. Faze *in vitro* digestije

Svaki korak *in vitro* metode, bilo statičkog ili dinamičkog modela, predstavlja fazu koja simulira deo digestivnog trakta čoveka. Tokom svakog koraka, supstrat se inkubira određeno vreme sa simuliranim digestivnim sokovima, sa konstantnim održavanjem pH i temperaturi 37 °C. U simulaciji GIT-a postoje tri faze:

#### 1. Oralna faza

Oralna faza je prva faza digestije i predstavlja mesto gde se čvrsta hrana fizički razgrađuje kroz proces žvakanja. Pored žvakanja, hrana se razgrađuje i uz pomoć pljuvačke koju luče pljuvačne žlezde. To je složeni viskozni vodeni medijum koji sadrži 99,5% vode, 0,3% proteina/enzima, kao i različite elektrolite poput natrijuma, kalijuma, kalcijuma, magnezijuma, fosfata i bikarbonata. Vreme trajanja ove faze je kratko, naročito za tečnu ili polučvrstu hranu, dok čvrsta hrana se uz pomoć pljuvačke razgrađuje do paste i nastavlja prolazak kroz digestivni trakt (*Li i sar., 2020*).

Simulacija oralne faze je uz pomoć soka koji simulira pljuvačku na vrednosti pH 7 u prisustvi enzima  $\alpha$ -amilaza i trajanju oko 2 min. Ova faza je najkraća jer predstavlja usitnjavanje hrane čija svarljivost se nastavlja u želucu.

#### 2. Želudačna faza

Predstavlja drugu fazu digestije koja se dešava u želucu koji ima četiri glavne motoričke funkcije: skladištenje, mešanje, mlevenje i pražnjenje. Ljudski želudac je anatomski podeljen na četiri glavna dela: fundus, telo, antrum i pilorus. Početna zapremina želuca je oko 25 mL, koja se može proširiti na 1,5- 4 L kada je potrebno da primi velike količine hrane (*Norton i sar., 2014*). Fundus i telo čine stomak i deluju kao rezervoar za nesvareni materijal, dok antrum predstavlja glavni deo želuca u kome se vrši mlevenje, mešanje i potpuna razgradnja čvrste hrane.

Stomak prosečno izlučuje 2-3 L želudačnog soka (~ pH 2), oko 0,7 L tokom obroka, koji se sastoji od hlorovodonične kiseline, enzima (pepsin i lipaza), različitih elektrolita i sluzi (*Bornhorst i Singh, 2014*). Brzina ove faze tj. pražnjenja želuca zavisi od više faktora, kao što su sastav materije koja se unosi i sadržaj makronutrijenata (masti, proteini i ugljeni hidrati) u prehrambenoj pasti koja dolazi iz prethodne faze. Tečne i male čestice hrane se prazne brže od većih. Čvrste supstance veće veličine zadržavaju se u želucu za dalju preradu i prazne se kroz pilorus samo kada se smanje na veličinu čestica <2 mm. Ukupno pražnjenje čvrste hrane

uglavnom predstavlja početnu fazu zaostajanja od 20- 40 min nakon unosa hrane, praćenu linearnim obrascem. Potpuno pražnjenje čvrstih supstanci u želucu obično se odvija u roku od 3-5 sati, uglavnom u zavisnosti od fiziohemijskih svojstava hrane (Norton i sar., 2014).

Simulacija želudačne faze traje od 1 do 2 sata jer predstavlja najduži i najvažniji proces u varenju hrane. Sok koji simulira želudačni sastoji se od odgovarajućih rastvora elektrolita i soli koje su prisutne u želucu na vrednosti pH 2 uz prisustvo enzima pepsina. Kao i prethodna faza, ova se odvija uz određeno mehaničko mešanje hrane i rastvora koje simulira fiziologiju želudca. Ovako pripremljena smesa dalje nastavlja digestiju u intestinalnoj fazi.

### 3. Intestinalna faza

Intestinalna faza je glavna faza probave hrane i dešava se u tankom crevu nakon prolaska hrane kroz želudac. Tanko crevo ima dve glavne uloge u varenju i apsorpciji, a to su razgradnja makromolekula na manje jedinice i apsorpcija vode i hranljivih sastojaka. Anatomski uključuje dvanaestopalačno crevo (duodenum) u kome se dešava većina varenja, i jejunum i ileum u koje se apsorbuju svarene materije. U zidovima tankog creva proizvode se enzimi koji predstavljaju kompleks smeša proteaza, amilaza i lipaza, kao i drugi digestivni enzimi koji deluju zajedno u razgradnji sastojaka hrane. Pored toga, u dvanaestopalačnom crevu izlučuje se bikarbonat koji održava vrednost pH tankog creva oko 6-7, što omogućava enzimima da razgrađuju masti, ugljene hidrate i proteine. Ugljeni hidrati se pre apsorpcije razgrađuju u monosaharide (glukoza, fruktoza i galaktoza), proteini u dipeptide, tripeptide i aminokiseline, a masti u slobodne masne kiseline i mono gliceride (Campbell i sar., 2019). Soli žučne kiseline takođe ulaze u duodenum i učestvuju u varenju lipida emulgovanjem masti u male kapljice.

Kao i prethodne dve faze, simulacija intestinalne faze se vrši u prisutvu soka koji čine odgovarajuće soli pri vrednosti pH 7, u prisustvu pankreatina uz odgovarajuće mehaničko mešanje. Ova faza traje 1-2 sata, i predstavlja završetak *in vitro* digestije.

#### 3.1.2. Digestivni enzimi

Kao što je već pomenuto, *in vitro* digestija je enzimski proces koji se sastoji iz nekoliko faza koje simuliraju delove GIT-a kod čoveka. Svaka faza okarakterisana je određenim enzimima i tečnostima koji su prisutni u organizmu čoveka.

Osnovna funkcija digestivnih enzima u organizmu jeste: digestivna funkciju (kao biološki katalizatori pokreću proces razgrađivanja hrane), bolja apsorpcija hranljivih materija iz hrane,

održavanje čistoće creva, sprečavaju nastanak gasova, konstipacije i pozitivno utiču na zdravlje organizma uopšte. Prema digestivnoj funkciji digestivni enzimi dele se u tri grupe: amilaze, proteaze i lipaze.

### 1. Amilaze

$\alpha$ -amilaze (EC 3.2.1.1) su hidrolitički enzimi koje mogu da proizvode biljke, bakterije, gljive, životinje i ljudi. Njihova aktivnost zavisi od prisustva kofaktora metala (kalcijuma). Kod čoveka  $\alpha$ -amilaze se luče u pljuvačnim žlezdama koje izlučuju enzim u usta i pankreasu odakle se enzim izlučuje u tanko crevo (Kim i sar., 2014). Uloga  $\alpha$ -amilaze je da katalizuju hidrolizu skroba tj. razgradnju na njegove podjedinice. To su endo- tip enzimi jer hidrolizuju veze u unutrašnjem delu lanca molekula skroba. Konkretno,  $\alpha$ -amilaze hidrolizuju  $\alpha$ -(1→4)-glikozidne veze u molekulu skroba što dovodi do stvaranja maltoze, maltotrioze, maltotetraze, maltodekstrina i glukoze (Robyt, 2008). Iako se glukoza smatra glavnim proizvodom aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, prema Robyt (2008), primarni proizvod hidrolize su proizvodi maltodekstrina, dok se glukoza formira kao sekundarni proizvod (Papoutsis i sar., 2021).

### 2. Proteaze

Proteaze su hidrolitički enzimi koji se kod čoveka izlučuju u stomaku (pepsin) i tankom crevu (tripsin i himotripsin). Uloga proteaza je razgradnja proteina na manje jedinice kao što su peptidi i aminokiseline.

*Pepsin* (EC 3.4.23.1) raskida peptidne veze između hidrofobnih i aromatičnih aminokiselina kao što su fenilalanin, triptofan i tirozin. Sintetiše se u ćelijama želuca gde nastaje kao neaktivan pepsinogen (kompleks pepsin-pepsininhitor). Ovaj kompleks sadrži 44 ostataka na N-terminalnom kraju, čijim cepanjem nastaje aktivan pepsin. Zimogen se može dobiti u obliku sedam različitih izoformi koje se razlikuju samo u N-terminalnom pro-peptidu, čijim cijepanjem dobijeni aktivni enzimi su identični. Maksimalna aktivnost pepsina izražena je u kiselim vrednostima pH na temperaturi između 37 °C i 42 °C. Neaktivan je na vrednosti pH 6,5 i iznad ove vrednosti, ali nije potpuno denaturisan ili nepovratno inaktiviran do vrednosti pH 8. Stoga, pepsin u rastvoru do vrednosti pH 8 može biti reaktiviran nakon ponovnog vraćanja vrednosti pH na 2.

*Tripsin* (EC 3.4.23.4) raskida peptidne lance uglavnom na karboksilnom delu aminokiselina lizina i arginina, osim ako je svaki od ova dva praćen prolaminom. Ovaj enzim nastaje u pankreasu kao neaktivni pro-enzim tripsinogen. Optimalni radni pH tripsina je od oko 7,5 do 8,5 i optimalna radna temperatura oko 37 °C. U kiselim sredinama njegova aktivnost

opada ali podešavanjem vrednosti pH nazad na 8, tripsin ponovo ispoljava svoju pravu aktivnost.

*Himotripsin* (EC 3.4.23.2) raskida amino veze peptida gde je karboksilna strana amino veze velika hidrofobna aminokiselina (tirozin, triptofan i fenilalanin). Ove aminokiseline sadrže aromatični prsten u svom bočnom lancu koji se uklapa u „hidrofobni džep“ enzima. Osim toga, hidrolizuje i druge amino veze u peptidima, posebno one koje sadrže leucin i metionin. Himotripsin se sintetisuje u pankreasu od prekursora himotripsinogena i sastavni je deo pankreasnog soka koji djeluje proteolitički u duodenumu. Aktivan himotripsin, 3-polipeptidni molekul, nastaje cepanjem tripsina na dva dela koji su povezani preko S-S veze i koji mogu da se aktiviraju uklanjanjem dva mala peptida u trans-proteolizi.

### 3. Lipaze

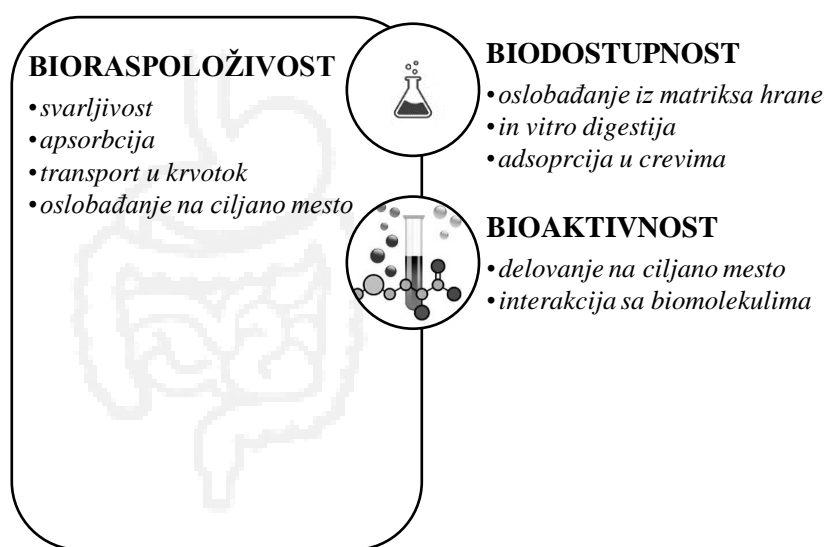
*Lipaze* (EC 3.1.1.3) su enzimi prisutni u želudcu (želudačna lipaza) i pankreasu (pankreasna lipaza). Uloga lipaza je apsorpcija emulgovanih lipida i razgradnja triacilglicerola i diacilglicerola u mono glicerole i slobodne masne kiseline. Nastali proizvodi hidrolize lipida rastvaraju se u micelama i vezikulama koje ih dalje transportuju do ćelija epitela (*Hur i sar., 2011*). Delimična hidroliza masti koja se unosi hranom započinje želudačnom lipazom. Ovi veliki molekuli masti emulguju se solima žučne kiseline i čine složenu strukturu (micele) sa polarnim lipidima, fosfolipidima, holesterolom, slobodnim masnim kiselinama, oligosaharidima i denaturisanim proteinima. Lipaza pankreasa asporbuje se na površini nastalih micela i formira Michaelis-Mentenov adsorpcioni kompleks koji uzrokuje acilaciju enzima (*Kumar i Chauhan, 2021*).

#### 3.1.3. Biodostupnost i bioraspoloživost jedinjenja nakon *in vitro* digestije

Hrana biljnog porekla, uključujući voće, povrće i prerađenu hranu, sadrži brojne vrste fitonutrijenata kao što su vitamini, karotenoidi, polifenoli, kurkuminoidi, polinezasićene masne kiseline, proteini, peptidi, dijetetska vlakna, oligosaharidi i minerali, koja imaju mnoga blagotvorna dejstva na ljudsko zdravlje (*Espin i sar., 2007; Hur i sar., 2011; Wildman, 2007*). Međutim, da bi hrana imala bilo kakav korisno zdravstveni efekat, jedinjenja sa fitonutrijentima oslobođenim iz hrane moraju biti bioraspoloživa, tj. efikasno apsorbovana u krvotok i oslobođena na ciljano mesto (*Actis-Goretta i sar., 2013; Fernandez-Garcia i sar., 2012*).

Termin *bioraspoloživost* može se definisati kao udeo unete komponente dostupne na mestu dejstva u normalnim fiziološkim funkcijama (Guerra i sar., 2012). Bioraspoloživost je rezultat tri glavna koraka: svarljivosti komponenata u GIT-u; apsorpcije komponenata crevnim ćelijama i transportom u cirkulaciju; i uključivanjem iz cirkulacije u funkcionalni entitet ili ciljano mesto (Wienk i sar., 1999; Etcheverri i sar., 2012).

U literaturi, termin bioraspoloživost definiše se na više načina, ali najpouzdanija definicija uključuje dva pojma: biodostupnost i bioaktivnost (Slika 4). *Biodostupnost* je definisana kao frakcija jedinjenja koja se oslobađa iz matriksa hrane u GIT-u i tako postaje dostupna za apsorpciju u crevima. Predstavlja niz procesa koji se dešavaju tokom varenja hrane radi transformacije u potencijalno biološki pristupačan materijal, ali isključuje apsorpciju/asimilaciju kroz epitelno tkivo i pred-sistemički metabolizam. *Bioaktivnost* predstavlja način na koji se hranljivi sastojak ili bioaktivno jedinjenje transportuje i stiže do ciljanog mesta delovanja, način njegove interakcije sa biomolekulima, biotransformacije nastaju kao fiziološki odgovor delovanja jedinjenja (Verhoeckx i sar., 2015). Prema tome, bioaktivna jedinjenja su jedinjenja koja mogu da utiču na metaboličke procese i imaju pozitivan efekat na zdravlje.



Slika 4. Pojmovi koji opisuju dešavanja tokom bioraspoloživosti (Thakur i sar., 2020)

Uvid u bioraspoloživost hranljivih sastojaka je važno za utvrđivanje njihovog nutritivnog kvaliteta. Poslednjih godina, definisane su mnoge *in vitro* metode za ispitivanje biodostupnosti hrane i njenih fitonutrijenata. Svakako, jedna od najznačajnijih jeste metoda *in vitro* digestije i

dijalize za simulaciju gastrointestinalnog stanja koje u velikoj meri se koristi za procenu biodostupnosti (Thakur i sar., 2020). S obzirom, da su *in vivo* metode jako dugotrajne i etički zahtevne sve je zastupljeniji trend razvijanja *in vitro* metoda za procenu biodostupnosti.

### 3.1.4. Primena metode *in vitro* digestije

Tokom godina specifičnost metoda *in vitro* digestije se menjala uzimajući u obzir njenu primenu na različite naučne oblasti kao što su, ishrana, hemija hrane, farmakologija, mikrobiologija i toksikologija. U početku najveći broj objavljenih studija odnosio se na ponašanje makronutrijenata hrane (uglavnom proteina) i lekova tokom varenja. Međutim, u poslednjih nekoliko godina istraživanja otvorena su nova područja primene, među kojima su tri najznačajnija: (i) uticaj procesa digestije na biodostupnost bioaktivnih jedinjenja i na njihovu antioksidativnu aktivnost; (ii) uticaj matriksa hrane na bioaktivna svojstva njihovih nutrijenata; (iii) uticaj digestije na finalni proizvod.

Prema tome, kao što je prikazano na Slici 5 modeli *in vitro* digestije danas mogu da se primenjuju na razne vrste hrane i njihove nutrijente. Tako je uticaj *in vitro* digestije na stabilnost polifenolnih jedinjenja, a samim tim i na njihova antioksidativna svojstva, bio jedna od široko ispitivanih tema tokom poslednje decenije. Takođe, ispitivanje uticaja matriksa hrane na digestiju i njihove interakcije sa enzimima i sokovima digestivnog trakta je jedna od popularnijih tema naučnih istraživanja u poslednjih nekoliko godina (Lucas-González i sar., 2018).



Slika 5. Primena metode *in vitro* digestije

Sve ovo potvrđuje potrebu za razvojem i unapređenjem *in vitro* metoda kao modela za simulaciju humanog digestivnog trakta za ispitivanje promena koje nastaju delovanjem enzima digestivnog trakta.



### 3.2. Proteini

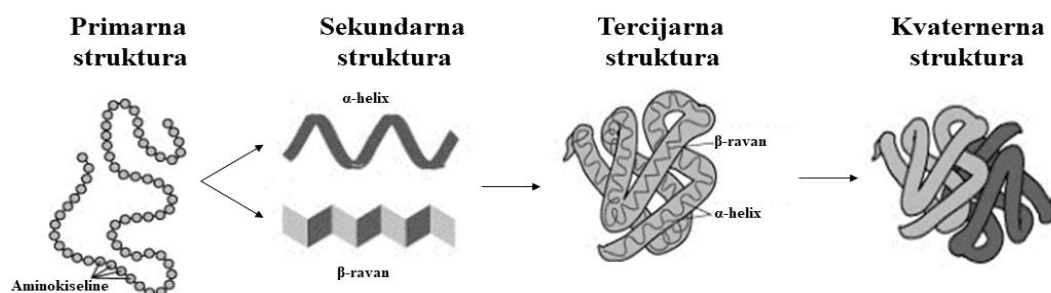
Proteini su izuzetno složeni polimeri na bazi do 20 različitih aminokiselina koje su međusobno povezane peptidnim vezama (koje su tip amidne veze i nastaju vezivanjem karboksilne i amino grupe aminokiselina). Sastav proteina čine: 50-55% ugljenik, 6-7% vodonik, 20-23% kiseonik, 12-19% azot i 0,2-3% sumpor (*Belitz i Grosch, 1999; Damodaran, 2000*). Strukturne i funkcionalne razlike u proteinima su rezultat sekvence u kojoj su aminokiseline povezane, njihove veličine i vrste, kao i veličine peptidnog lanca. Stoga, u teoriji postoji neograničen broj proteina sa jedinstvenim svojstvima.

Na osnovu biološke funkcije proteini se mogu klasifikovati kao enzimski katalizatori, strukturni proteini, kontraktilni proteini (miozin, aktin, tubulin), hormoni (insulin), proteini nosači (hemoglobin, transferin), antitela (imunoglobulin), rezervni proteini (albumin, semenski proteini) i toksini (*Coultate, 1984; Damodaran, 2000*).

Na osnovu oblika proteini se dele na fibrilarne i globularne proteine. *Fibrilarni proteini* su u obliku dugačkih lanaca koji su deo kvaternerne strukture proteina. *Globularni proteini* imaju sferni ili elipsoidni oblik koji nastaju umotavanjem proteinskih lanaca jednih prema drugima formirajući sklopčane strukture. Ovi proteini daju strukturnu funkciju (*Rodrigues i sar., 2012*).

Proteini imaju četiri nivoa strukture (Slika 6):

- ❖ *Primarna struktura*- predstavlja linearni niz (broj, vrstu i redosled aminokiselina u proteinu); veličina lanca i redosled povezivanja aminokiselina određuje fizička, hemijska, strukturna, biološka i funkcionalna svojstva proteina.
- ❖ *Sekundarna struktura*- predstavlja prostorni raspored sekvenci aminokiselina u određenim segmentima peptidnog lanca koje su stabilizovane vodoničnim vezama; postoje dve pravilne podstrukture ( $\alpha$ -heliks i  $\beta$ -ravan).
- ❖ *Tercijarna struktura*- predstavlja prostorni raspored sekundarne strukture, usled nastanka veza između bočnih ostataka sekundarnih segmenata.
- ❖ *Kvaternerna struktura*- predstavlja prostorni raspored protein sa više od jednog polipeptidnog lanca, tako nastaju dimeri, trimeri ili tetrameri, itd. (*Rodrigues i sar., 2012*)



Slika 6. Struktura proteina (Rodrigues i sar., 2012)

Proteini su osnovna komponenta i izvor hrane, pa se tako mogu naći u mleku, mesu (uključujući ribu i živinu), jajima, žitaricama, raznim biljnim vrstama (mahunarke, uljarice, košticama voća). Za proteine u hrani je bitno da su lako svarljivi, netoksični, da imaju visoku nutritivnu vrednost, i da poseduju zadovoljavajuće funkcionalne osobine. Budući da su funkcionalna svojstva proteina povezana sa njihovim strukturnim i fizičko-hemijskim karakteristikama, osobine i primena proteina u hrani može se poboljšati njihovom modifikacijom, bilo enzimskom, hemijskom ili strukturnom.

Sa aspekta nauke i industrije sve veći interes je usmeren na biljne proteine koji se mogu izolovati iz raznih biljnih izvora, ka oi proizvoda zaostalih tokom procesa proizvodnje i prerade hrane. Stoga, iskorišćenje nusproizvoda prehrambene industrije i njihove valorizacije u smislu dobijanja visoko vrednih proizvoda na bazi proteina koji poseduju različite funkcionalne i biološke osobine predstavljaju jedan od važnijih pristupa prehrambene industrije (Moure i sar., 2006; Yu i sar., 2007; Chabanon i sar., 2007).

### 3.2.1. Biljni proteini

Svest o sigurnosti hrane i sve većim izazovima sa kojima se susreće svetska populacija, potraga za održivom i ekološki izvodljivom visoko-hranljivom hranom je potencijal koji uključuje istraživanje alternativnih izvora proteina. Upravo, jedan od načina je zamena tradicionalnih proteina životinjskog porekla sa alternativnim izvorima proteina, kao što su biljni proteini.

Upotreba proteina životinjskog porekla uzrokuje velike ekonomske troškove, gubitak biodiverziteta, velike ekološke posledice kao što je iscrpljivanje izvora vode, ali i opasnost po zdravlje ljudi kao što su kardiovaskularne i druge bolesti koje mogu nastati usled njihovog prekomernog konzumiranja (Alemaiehu i sar., 2015; Lopez i sar., 2018; Pojić i sar., 2018;

Zhao i sar., 2014). Stoga, biljni proteini se sve više koriste kao ekonomična i dobra zamena za proteine životinjskog porekla kao funkcionalni dodaci u formulaciji proizvoda koji se koriste u ljudskoj ishrani. Prednosti biljnih proteina u odnosu na proteine iz životinjskih izvora je to što su: lako dostupni, svarljivi, smatraju se potpuno bezbednim (eng. *Generally Regarded As Safe, GRAS*), nutritivno kvalitetni, ekološki prihvatljivi, imaju nizak sadržaj masnih kiselina koje mogu uzrokovati zdravstvene probleme. Pored toga, posebne grupe potrošača poput vegana, vegetarijanaca i sportista traže alternativne izvore proteina na biljnoj bazi kako bi upotpunili unos aminokiselina u svojoj ishrani.

Nutritivni kvalitet proteina može da varira u zavisnosti od njihove bioraspoloživosti, svarljivosti, profila prisutnih aminokiselina, čistoće, antinutritivnih faktora, načina obrade i dobijanja (Mattila i sar., 2018; Adenekan i sar., 2018; Sa i sar., 2019). Iako mnoga istraživanja ukazuju da većina biljnih proteina obezbeđuje potrebne količine esencijalnih aminokiselina za ljudske potrebe (Sun-Waterhouse i sar., 2014), biljni proteini se često prepoznaju kao nekompletni ili nutritivno inferiorni u odnosu na proteine životinjskog porekla (Kiriakopoulou i sar., 2019). Svaka aminokiselina ima drugačiju ulogu u funkcionisanju organizma. Esencijalne aminokiseline ne mogu se sintetisati u ljudskom organizmu i moraju se uneti isključivo putem ishrane (Gavelle i sar., 2017; Han i sar., 2015; Smith i sar., 2014). To su: histidin (His), izoleucin (Ile), leucin (Leu), lizin (Lis), metionin (Met), fenilalanin (Phe), treonin (Thr), triptofan (Trp) i valin (Val). S druge strane, ljudski organizam može da proizvede neesencijalne aminokiseline, alanin (Ala), arginin (Arg), asparaginsku kiselinu (Asp), cistein (Cis), glutaminsku kiselinu (Glu), glicin (Gli), prolin (Pro), serin (Ser) i tirozin (Tir) (Boye i sar., 2012). Stoga, biljni proteini koji u svom sastavu imaju značajan sadržaj esencijalnih aminokiselina mogu da imaju dragocenu ulogu u ishrani ljudi. Takođe, dobra fizičko-hemijska i funkcionalna svojstva biljnih proteina su od suštinskog značaja za njihovu potencijalnu primenu u formulaciji hrane i novih prerađenih proizvoda sa visokokvalitetnom hranljivom vrednošću (Conde i sar., 2005).

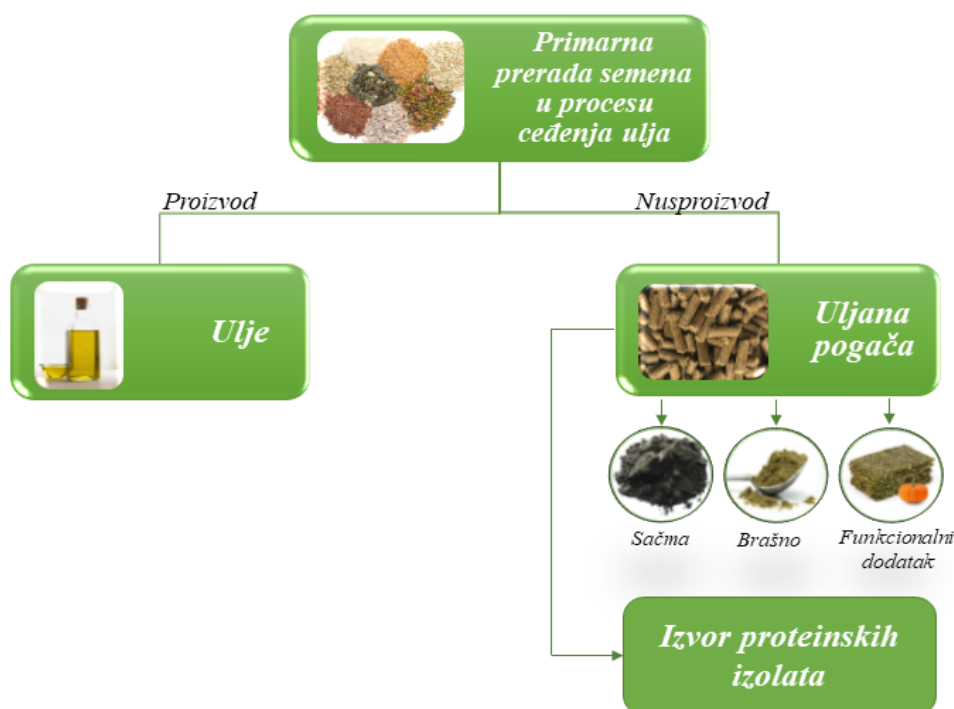
U literaturi je opisan veliki broj biljnih izvora proteinskih suplemenata:

- ❖ Mahunarke- soja, grašak, pasulj, leblebija, lupin, bob, crni grašak (Coda i sar., 2017; Lqari i sar., 2002; Sun i sar., 2012; Tušnio i sar., 2017; Vasconcelos i sar., 2006);
- ❖ Žitarice- pirinač, pšenica, proso, sirak, kukuruz, ječam (López i sar., 2018);
- ❖ Pseudožitarice- amarant, kinoja, heljda (López i sar., 2018);
- ❖ Semenjače- čia, lan, susam, tikva, suncokret (Conde i sar., 2005; Mattila i sar., 2018);
- ❖ Orašasti plodovi- badem, orasi (Sousa i sar., 2011).

### 3.2.2. Nusproizvod prerade ulja kao potencijalni izvor proteina

Proizvodnja ulja daje veliku količinu nusproizvoda, koji sadrže oko obično 40-50% proteina sa visokim sadržajem esencijalnih aminokiselina. Nakon presovanja ulja iz uljarica zaostaje uljana pogača koja se obično koristi kao hrana za životinje i đubrivo (*Ancuta i Sonia, 2020*). Uljane pogače (Slika 7) koje zaostaju nakon ceđenja ulja iz semena su visoko vredni nusproizvodi koji imaju sve veće interesovanje kako sa naučnog tako i sa industrijskog aspekta.

Svetska proizvodnja uljarica u 2018/2019 godini iznosi 600,47 miliona tona, što ukazuje na nastanak velike količine pomenutog otpada čija valorizacija može dovesti do značajnog ekološkog i ekonomskog doprinosa. Stoga, uljane pogače koje zaostaju predstavljaju dobar alternativni izvor proteina koji može da ima sve veći značaj u prehrambenoj industriji. Iako se očekuje da će se svetska potražnja za proteinima životinjskog porekla udvostručiti do 2050. godine, od 2010. godine beleži se nagli porast primene i potrebe za biljnim izvorima proteina (*Pojić i sar., 2018*).



Slika 7. Proizvodi i sporedni proizvodi industrije ulja

Uljane pogače svrstane su u dve kategorije, jestive i nejestive. Jestive uljane pogače, kao što su uljane pogače soje, kikirikija, repice, suncokreta, kokosa, lana, imaju visoku hranljivu vrednost i njihovim odmašćivanjem dobijaju se brašna koja mogu naći primenu u ishrani ljudi kao dodaci pekarskim proizvodima i višenamenski suplementi, kao i u proizvodima za dojenčad. Osim toga, njihovom preradom mogu nastati proteinski dodaci (proteinski koncentrat, izolat, hidrolizat) koji se mogu primenjivati kao izvori bioaktivnih jedinjenja, emulgatori, gelirajući agensi, i dr. Dok, nejestive uljane pogače kao što ricinus, list nima, mahua cveta, koriste se isključivo kao đubrivo zbog prisustva toksičnih jedinjenja koji mogu dovesti do trovanja.

### **3.2.2.1. Izolovanje proteina iz nusproizvoda prerade ulja**

Proces izolovanja proteina iz nusproizvoda prerade ulja podrazumeva nekoliko faza. U zavisnosti od vrste nusproizvoda koji se koristi, njegove prethodne obrade, pH vrednosti, koncentracije soli i temperature, dobijaju se proteinski ekstrakti različitog sastava. U literaturi, podela proteinskih ekstrakata vrši se na dva načina prema procesu proizvodnje i prema sadržaju proteina. Na osnovu sadržaja proteina, proizvodi ekstrakcije proteina klasifikuju se kao proteinsko brašno (~ 65% udela proteina), proteinski koncentrat (65-80% udela proteina) i proteinski izolat (> 90% udela proteina). Prema načinu dobijanja proteinski ekstrakti dele se na proteinski izolat i proteinski koncentrat (*Kumar i sar., 2021*).

Metode za ekstrakciju proteina dele se na konvencionalne (ekstrahovanje primenom različitih rastvarača na bazi vode, rastvora soli, organskih rastvarača) i nekonvencionalne metode (ekstrahovanje primenom enzima, visokog pritiska, mikrotalasne energije, ultrazvuka, superkritična ekstrakcija).

*Konvencionalne metode* se odnose na tehnike koje se primenjuju i u komercijalne svrhe u cilju izolovanja proteina. Primena ovih metoda zasniva se na upotrebi odgovarajućih rastvarača u cilju postizanja maksimalnog prinosa ekstrakcije uz prilagođavanje uslova ekstrakcije kao što su vreme, vrednost pH i temperatura. Nedostatak ovih ekstrakcija jesu dugotrajnost procesa i velike količine otrovnih i opasnih rastvarača, ali prednost su jednostavna i jeftina oprema.

*Nekonvencionalne metode* predstavljaju zelene tehnologije koje nemaju štetan uticaj na životnu sredinu, a dobijeni ekstrakt čine bezbednim za primenu zbog minimalne upotrebe štetnih hemikalija i rastvarača. Prednost ovih metoda u ekstrakciji proteina jesu: postizanje velikih prinosa ekstrakcije, dobijanje ekstrakta relativno visoke čistoće, upotreba male količine

rastvarača, zaostajanje male količine otpada, kraće vremena ekstrakcije. Takođe, ove ekstrakcije su ekološki prihvatljive jer zaostali otpad ima potencijal u daljoj preradi i primeni u industrijske svrhe. Sa druge strane, glavni nedostaci su velika potrošnja energije, velika ekonomska ulaganja i nedostatak jednostavnosti u korišćenju ovih metoda. Brojne studije pokazuju da istovremena upotreba konvencionalnih i nekonvencionalnih metoda ekstrakcije proteina donosi veće prinose i efikasnost samog procesa ekstrakcije (*Ancuța i Sonia, 2020*).

Najčešće primenjena konvencionalna metoda u ekstrakciji tj. izolovanju proteina jeste alkalna ekstrakcija, koja je korišćena u eksperimentalnom delu ove disertacije.

### **3.2.2.2. Alkalna ekstrakcija proteina**

Alkalna ekstrakcija je konvencionalna metoda koja se najčešće koristi za ekstrakciju i izolovanje proteina iz visoko vrednih proteinskih nusproizvoda kao što su uljane pogače. Kao što je prethodno pomenuto izolovanje proteina je proces koji se sastoji iz nekoliko faza.

Prva faza u izolovanju proteina jeste odmašćivanje uljane pogače sa ciljem uklanjanja lipidnih frakcija. U ove svrhe koriste se organski rastvarač tipa heksan, etanol, metanol. Druga faza je ekstrahovanje proteina iz obezmašćene uljane pogače u alkalnoj sredini u kojoj je rastvorljivost proteina najveća. Potom sledi uklanjanje nerastvorljivog materijala, koje može da se vrši centrifugiranjem ili filtracijom pri čemu se dobija protein u rastvoru. Treća faza je taloženje proteina iz dobijenog rastvora izoelektričnim taloženjem, što podrazumeva spuštanje pH rastvora na vrednost njegove izoelektrične tačke (pI) na kojoj je protein nerastvorljiv. Talog se odvaja centrifugiranjem i dalje se suši, nakon čega se dobija prah koji se naziva *proteinski izolat*.

### 3.2.3. Funkcionalne osobine proteina

Funkcionalne osobine proteina su definisane kao fizičko-hemijska svojstva proteina koja utiču na njegovo ponašanje tokom proizvodnje, skladištenja i primene u različite sisteme (Kinsella, 1976). Proteini u formulacijama hrane imaju različitu ulogu kao konzervansi, regulatori kiselosti, emulgatori, pojačivači ukusa i zgušnjavanja. Takođe, mogu uticati na sposobnost zadržavanja vode i ulja, koloidnu stabilnost, viskoznost i formiranje pene, što doprinosi kvalitetu finalnog proizvoda (Faustino i sar., 2019). U zavisnosti od mehanizma delovanja, funkcionalne osobine proteina dele se u tri osnovne grupe:

- ❖ Svojstva povezana sa hidratacionim mehanizmom (rastvorljivost, kapacitet zadržavanja i vezivanja vode i ulja);
- ❖ Svojstva povezana sa strukturom i reološkim osobinama (viskozitet, elastičnost, agregacija, želiranje, filmogena svojstva);
- ❖ Svojstva povezana sa osobinama na površini molekula proteina (emulzione osobine, svojstva formiranja pene).

#### 3.2.3.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost je jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina kako u prehrambenim tako i drugim sistemima, jer utiče na mnoga druga funkcionalna svojstva kao što su stvaranje pene, želiranje i emulgovanje (Williams i sar., 2016). Rastvorljivost proteina zavisi od nekoliko unutrašnjih faktora, kao što su sastav i struktura aminokiselina, veličina i struktura proteina, kao i spoljašnjih faktora, kao što su jonska snaga, vrednost pH i temperatura (Sathe i sar., 2018).

Tako, prisustvo negativno naelektrisanih i polarnih aminokiselina na površini proteina povećavaju, dok nepolarne aminokiseline smanjuju njegovu rastvorljivost (Kramer i sar., 2012). Struktura proteina takođe utiče na rastvorljivost, pa tako proteini manje kompaktne strukture imaju dobru interakciju sa molekulima vode pa time i veću rastvorljivost. Smanjivanje proteina na manje proteinske jedinice može poboljšati rastvorljivost proteina zbog povećanog prisustva jonizujućih grupa, što dovodi do povećanja rastvorljivosti (Gould i Volf, 2018).

Spoljni faktor, kao što je temperatura može značajno uticati na rastvorljivost proteina. Postepeno povećanje temperature dovodi do porasta rastvorljivosti proteina sve do tačke

denaturacije proteina tj. narušavanja njegove strukture što je oko 50 °C. Denaturacijom dolazi do agregacije proteina i taloženja, pri čemu se smanjuje njegova rastvorljivost (*Sathe i sar., 2018*). Na sličan način utiče i jonska jačina rastvora. Pri maloj jonskoj jačini, prisutni joni deluju kao „štit“ sprečavajući međusobno privlačenje molekula proteina i tako povećava njihovu rastvorljivost. Nasuprot tome, pri velikoj jonskoj jačini molekuli prisutnih soli otežavaju interakciju proteina sa molekulima vode i tako čini protein manje rastvorljivim (*Duong-Ly i Gabelli, 2014*). Rastvorljivost proteina takođe zavisi od vrednosti pH. Izoelektrična tačka biljnih proteina je obično između pH 3-6, dok je u kiselim i alkalnim sredinama rastvorljivost proteina mnogo veća. Na pH vrednosti blizu pI protein se nalazi u obliku cviter jona (naelektrisanje proteina je neutralno) što uzrokuje agregaciju i taloženje molekula proteina, pa je i rastvorljivost minimalna. Usled smanjenja ili povećanja pH vrednosti od pI proteini su naelektrisani (negativno, odnosno pozitivno, respektivno) i samim tim imaju veću tenenciju da intereaguju sa molekulima vode što povećava njihovu rastvorljivost (*Gravel i Doyen, 2020*).

### **3.2.3.2. Kapacitet vezivanja vode i ulja**

Kapacitet vezivanja vode je sposobnost proteina da zadrži što više vode po gramu proteina, bilo da je to vezana ili fizički zarobljena voda (*Buβler i sar., 2016; Chen i Lin, 2002*). Sposobnost vezivanja vode je od velikog značaja u procesima u kojima dolazi do interakcije proteina sa vodom, tako prilikom pakovanja mesa vezivanje vode za protein održava sočnost mesa. Takođe, obezbeđuje željeni ukus, teksturu i boju tokom tehnoloških procesa. Količina vezane vode zavisi od teksture proteina, ali i njegove konformacije (*Aryee i sar., 2018*).

Kapacitet vezivanja ulja odnosi se na količinu ulja koja se može vezati po gramu proteina. Sposobnost vezivanja ulja utiče na ukus i teksturu finalnog proizvoda, čineći ga ukusnijim (*Aremu i sar., 2007*). Ova osobina je u velikoj korelaciji sa svojstvima emulgovanja. Proteini malih masa i gustine imaju više hidrofobnih delova pa time i veći kapacitet vezivanja ulja, dok proteini većih masa i gustine su hidrofilniji pa i manju tendenciju za vezivanje uljane faze (*Gravel i Doyen, 2020*).



### 3.2.3.3. Želiranje

Želiranje je prelazni proces između čvrstog i tečnog (Moure i sar., 2006) i predstavlja formiranje proteinske mreže koja može da zadrži veliku količinu vode, stabilnog oblika, određene mehaničke čvrstoće i viskoelastičnosti (Panyam i Kilara, 1996). Formiranje gela zavisi od mnogih unutrašnjih faktora, kao što su elektrostatičke interakcije, i spoljašnjih faktora, kao što je temperatura, vrednost pH i jonska jačina. Proteini koji sadrže nepolarne ostatke uglavnom formiraju čestičaste gelove, dok transparentni gelovi nastaju od proteina hidrofilnog karaktera (Shimada i Matsushita, 1980). Toplota pospešuje stvaranje gela jer pospešuje brzo odvijanje i denaturaciju proteina, što sprečava agregaciju molekula proteina i formiranje gela tokom hlađenja (Totosaus i sar, 2002).

### 3.2.3.4. Emulgovanje

Emulzije su koloidni sistemi koji se sastoje od dve faze, vodene i uljane. Jedna faza je dispergovana, dok je druga kontinualna (McClements, 2010). Zbog velike površine između dve faze koje se ne mogu mešati, emulzije imaju lošu termodinamičku stabilnost. Amfifilni karakter proteina omogućava formiranje emulzije i njenu stabilnost smanjenjem površinskog napona na granici dve faze. Ovo funkcionalno svojstvo proteina od velikog je značaja jer ima primenu u različitim proizvodima, kao što su pekarski proizvodi, majonezi, prelive za salate, smrznutim deserti, mleveno meso, itd. (Kinsella i Melachouris, 1976).

Na emulgovanje utiču unutrašnji i spoljašnji faktori. Pre svega, veličina molekula proteina utiče na stvaranje i stabilnost emulzije. Proteini malih molekula lakše prodiru na granicu faza i brže formiraju emulzije ali manje stabilne, dok veći molekuli proteina imaju suprotno ponašanje teže prodiru na granicu faza ali stvaraju stabilnije emulzije. Suprotno rastvorljivosti, svojstva emulgovanja poboljšavaju se prisustvom hidrofobnih aminokiselina na površini proteina, što je neophodno za adsorpciju ulja u emulziji. Spoljašnji faktori koji utiču na formiranje i stabilnost emulzija jesu vrednost pH, temperatura i jonska jačina (Lam i Nickerson, 2013). Temperatura može da poveća emulgujuću moć proteina tako što uzrokuje razmotavanje proteinske strukture i želiranje zaštitnog filma. Različite pH vrednosti i prisustvo jona utiču na elektrostatičke interakcije i površinska naelektrisanja što omogućava povećanu rastvorljivost proteina, a samim tim i sposobnost lakšeg formiranja emulzija.

### 3.2.3.5. Osobine stvaranja pene

Pene se mogu definisati kao vazdušni mehurići zatvoreni u tečnosti i stabilizovani proteinima na površini gas- tečnost. Formiranje pene može biti od značaja u raznim granama privrede, kao što su građevinarstvo (izolacioni materijali), hemijska industrija (sredstva za čišćenje) i kozmetika (šampon itd.). Formiranje pene, kao i prethodno opisana funkcionalna svojstva proteina, zavisi od niza faktora. Struktura proteina je jedan od ključnih faktora koji utiču na stvaranje pene i njihovu stabilnost. Razmotani proteini brže adsorbuju na površini gas-tečnost, stvaraju brze konformacione promene i preuređenje na kontaktnoj površini gas-tečnost. Stoga, globularni i kompaktni proteini su manje efikasni u formiranju pene. Međutim, brzo stvaranje mehurića vazduha ne podrazumeva uvek stabilnost pene, što je od velike važnosti u formulaciji hrane. Kompaktni i globularni proteini imaju tendenciju da formiraju otpornije filmove, što ih čini boljim u stvaranju pene u odnosu na razmotane proteine (*Kinsella, 1981*).

### 3.2.4. Unapređenje funkcionalnih osobina proteina

Nativni proteini često ne poseduju funkcionalne osobine koje omogućavaju njihovu primenu u formulaciji gotovih proizvoda. Strukturnom modifikacijom proteina moguće je unaprediti i poboljšati njihovu funkcionalnost, što poboljšava njihovu primenu u različitim sistemima. Postoje tri načina strukturne modifikacije proteina u cilju poboljšanja funkcionalnih osobina:

1. hemijska modifikacija ili umrežavanje- dolazi do hemijskih promena usled formiranja novih veza u reakciji funkcionalnih grupa proteina sa funkcionalnim grupama drugih jedinjenja (polifenolima, šećerima, lipidima),
2. fizičke modifikacije- dejstvom fizičke sile (ultrazvuk, elektrostatičko polje, temperatura) narušava se struktura proteina usled raskidanja amidnih veza ili nestajanja pojedinih grupa bočnih lanaca proteina,
3. enzimske modifikacije- primenom različitih enzima usled čega dolazi do raskidanja amidnih veza i cepanja proteina na manje fragmente koji u svojoj strukturi nose određenu funkcionalnost, fizičku ili biološku.

Poslednjih nekoliko godina, u nauci veliki izazov predstavljaju hemijske modifikacije tj. reakcije proteina sa polifenolnim jedinjenjima. Proteini i polifenoli poseduju svoja različita funkcionalna svojstva. Kao što je već prethodno pomenuto, proteini imaju sposobnost da formiraju gel ili stabilizuju penu i emulziju, dok polifenoli poseduju bioaktivnost, naročito antioksidativno delovanje. Interakcija ovih komponenti uglavnom utiče na funkcionalne osobine prehrambenih proizvoda i njihov kvalitet.

#### 3.2.4.1. Interakcija proteina i polifenola- Konjugacija

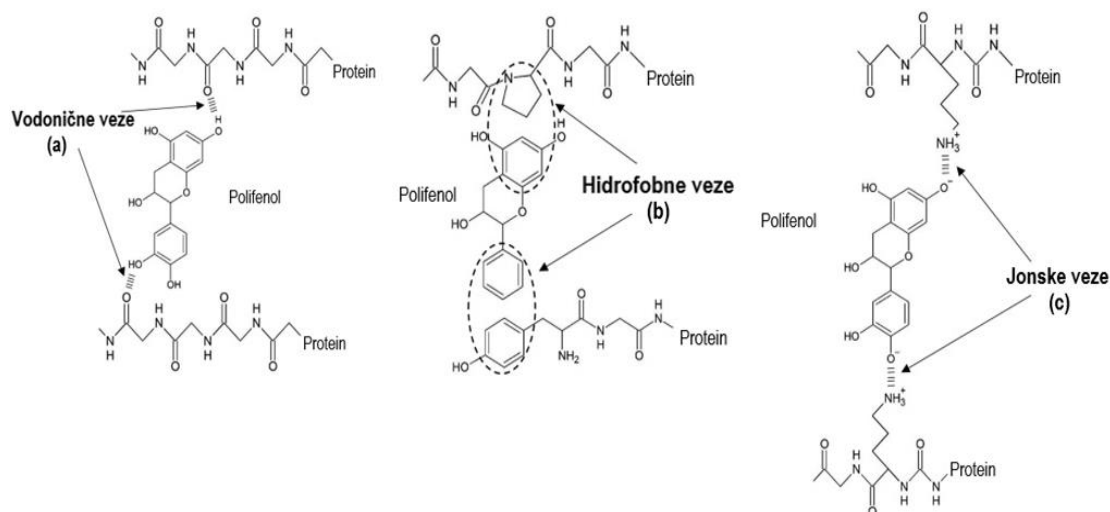
*Konjugacija* predstavlja proces interakcije između različitih jedinjenja pri čemu dolazi do modifikacija u njihovoj strukturi usled nastajanja određenih hemijskih veza između aktivnih grupa reaktanata. Interakcija između proteina i polifenola, dovodi do stvaranja „protein-polifenol konjugata” i ima uticaja na senzorna, funkcionalna i nutritivna svojstva proteinskih proizvoda.

U osnovi, proteini i polifenoli mogu međusobno da se povezuju nekovalentnim (hidrofobne, jonske i vodonične veze) ili kovalentnim (neenzimskim ili enzimskim putem) vezama (*You i sar., 2014*). Nekovalentne interakcije između proteina i polifenola su obično reverzibilne interakcije i slabije od kovalentnih (*Dubeau i sar., 2010*). Međutim, konjugati formirani kovalentnim vezama se češće primenjuju u formulacijama hrane zbog svojih jakih i trajnih veza sa visokom stabilnošću. Enzimski pristup se često smatra ekološkom metodom visoke specifičnosti. Ovi konjugati su pokazali snažnu aktivnost hvatanja slobodnih radikala. Međutim, priprema i postupak koji se koriste su komplikovani i skupi (*Gu i sar., 2017*).

*Nekovalentne interakcije* su reakcije koje nastaju između proteina i polifenola stvaranjem vodoničnih, jonskih i hidrofobnih veza.

- ❖ Vodonične veze (Slika 8a) nastaju usled reakcije između fenolne grupe sa C=O grupom proteina (*Buitimea-Cantua i sar., 2018*); i između OH grupa fenola i posebno hidroksilnih (-OH) i amino (-NH<sub>2</sub>) grupa proteina (*Yildirim-Elikoglu i Erdem, 2018*).
- ❖ Hidrofobne veze (Slika 8b) su veze koje nastaju između hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (leucin, izoleucin, glicin, metionin, alanin, fenilalanin, valin, tirozin, cistein i triptofan) i nepolarnog aromatičnog prstena polifenola (*Kanakis i sar., 2011; Ozdal i sar., 2013*).

- ❖ Jonske veze (Slika 8c) su najmanje zastupljene u interakciji protein-polifenol. Formiraju se između pozitivno naelektrisanih grupa proteina, kao što su  $\epsilon$ -amino grupe lizina i negativno naelektrisanih hidroksilnih (-OH) grupa polifenola (*Le Bourvellec i Renard, 2012*).



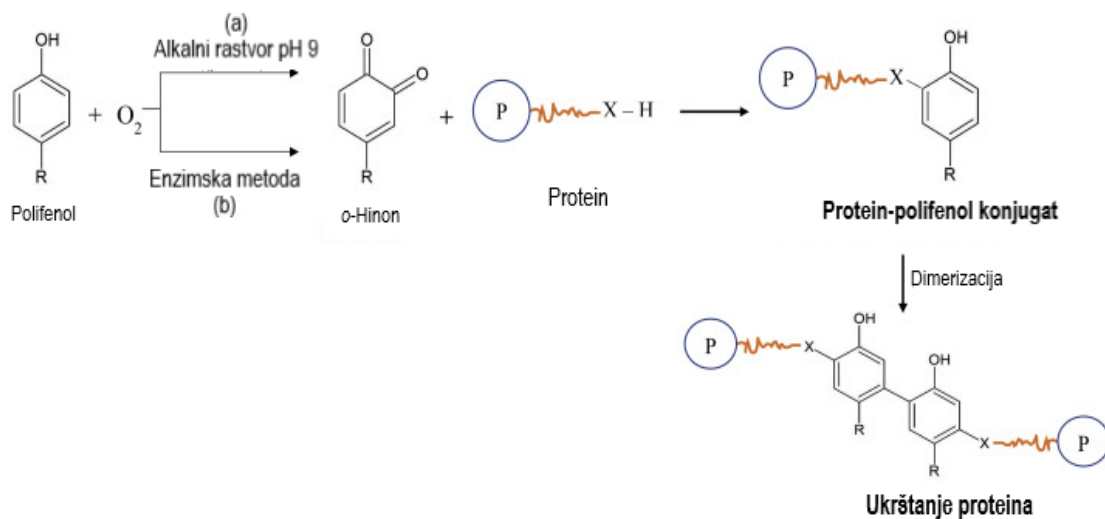
Slika 8. Nekovalentne interakcije proteina i polifenola pomoću: (a) vodoničnih, (b) hidrofobnih, (c) jonskih veza (*Quan i sar., 2019*)

Iako su ove veze reverzibilne i imaju nisku energiju, mogu igrati važnu ulogu u prehrambenoj industriji radi poboljšanja funkcionalnosti i kvaliteta prehrambenih proizvoda.

*Kovalentne interakcije* su reakcije koje nastaju između funkcionalnih grupa proteina i polifenola bilo enzimskim ili neenzimskim putem, u zavisnosti od potreba i prirode jedinjenja koja stupaju u reakciju.

- ❖ Alkalna reakcija (Slika 9a) je najčešća reakcija koja nastaje u konjugaciji proteina i polifenola. U alkalnim uslovima (pH 9) polifenoli su nestabilna jedinjenja sklona oksidaciji. Uz prisustvo kiseonika, polifenoli iz nestabilnih poluhinonskih radikala prelaze u stabilna hinonska jedinjenja, tako što reaguju sa nukleofilnim grupama (metionin, lizin, triptofan i cistein) iz bočnih ostataka proteina uz stvaranje kovalentne veze (C-N ili C-S) (*Chen i sar., 2019; Liu et al., 2017*).
- ❖ Enzimska reakcija (Slika 9b) započinje oksidativnom reakcijom u kojoj mono fenoli prelaze u *o*-difenole. Potom, *o*-difenoli se transformišu u *o*-hinone uz pomoć specifičnih enzima u zavisnosti od prirode jedinjenja koja stupaju u reakciju u prisustvu kiseonika. Nastali reaktivni hinoni intereaguju sa nukleofilnim

aminokiselinskim ostacima proteinskih lanaca pri čemu dolazi do umrežavanja između proteina i polifenola.



Slika 9. Kovalentne interakcije proteina i polifenola pomoću: (a) alkalne, (b) enzimske reakcije  
(Quan i sar., 2019)

### 3.2.4.2. Funkcionalna svojstva proteinsko-polifenolnih konjugata

Konjugati nastali interakcijom proteina i polifenola mogu da predstavljaju nova bioaktivna jedinjenja sa jedinstvenim ili multifunkcionalnim atributima. U literaturi je pokazano da su protein-polifenol konjugati pokazali izvrsne osobine u pogledu rastvorljivosti, želiranja, formiranju pene i emulgovanju, kratak pregled dosadašnjih istraživanja prikazan je u Tabeli 1 (Liu i sar., 2017).

Tabela 1. Pregled metoda konjugacije i promena u funkcionalnim osobinama u interakciji proteina i polifenola

METODA KONJUGACIJE	PROTEIN	POLIFENOL	UTICAJ NA FUNKCIONALNE/BIOAKTIVNE OSOBINE	LITERATURA
<b>Alkalna reakcija</b>	Globulini	Kafena kiselina	Poboljšana antioksidativna aktivnost i emulziona svojstva proteina	<i>Abd El-Maksoud i sar., 2018</i>
	Proteini ribe	Kafena, taninska i ferulna kiselina	Poboljšana antioksidativna aktivnost i mehanička svojstva proteina	<i>Prodpran i sar., 2012</i>
	Proteinski izolat tikve	Pirogalna kiselina	Poboljšana antioksidativna aktivnost	<i>Yang i sar., 2019</i>
<b>Enzimska reakcija</b>	Želatin	Galna, ferulna i taninska kiselina, katehin	Poboljšana gelirajuća svojstva	<i>Temdee &amp; Benjakul, 2015</i>
	Albumin	Hlorogenska kiselina	Smanjena rastvorljivost	<i>Prigent i sar., 2007</i>
	Kazein	Kafena kiselina	Smanjena rastvorljivost i svarljivost	<i>Cirkovic-Velickovic &amp; Stanic-Vucinic, 2018</i>
<b>Nekovalentne reakcije</b>	Proteini mleka i kazein	Hlorogenska kiselina	Poboljšana rastvorljivost, svojstva formiranja pena, antioksidativna aktivnost i svarljivost	<i>Jiang i sar., 2018</i>
	Proteini iz jajeta	EGCG	Poboljšana antioksidativna aktivnost, povećana hidrofobnost površine	<i>Yin i sar., 2014</i>
	Albumin	Procijanidini	Smanjena rastvorljivost proteina i povećana stabilnost pene	<i>Prigent i sar., 2009</i>

S obzirom, da *rastvorljivost* proteina određuje sve ostale funkcionalne osobine, jer se zna da nerastvorljivi proteini poseduju ograničena funkcionalna svojstva, poboljšanje rastvorljivosti je jedna od najbitnijih osobina koje se mogu ostvariti protein-polifenol interakcijom. Konjugacija proteina sa polifenolima može, ili povećati ili smanjiti rastvorljivost proteina u vodi, u zavisnosti od prirode sistema. Vezivanje naelektrisanih polifenola može

izmeniti električna svojstva proteina, posebno na vrednostima njihove izoelektrične tačke, što značajno utiče na njihove profile rastvorljivosti u zavisnosti od pH (Liu i sar., 2017). Konjugacijom nepolarnih polifenola povećava se površinska hidrofobnost proteina, a na taj način smanjuje rastvorljivost u vodi (Bandyopadhyay i sar., 2012). Reakcija između polifenola i proteina može promovisati umrežavanje proteina, što takođe može umanjiti rastvorljivost u vodi (Ozdal i sar., 2013). Zna se da interakcija proteina i polifenola utiče na sekundarne i tercijarne strukture proteina što zauzvrat može da promeni površinske osobine proteina, pojačavajući na taj način hidrofilnu prirodu proteina. Promena hidrofilne/hidrofobne ravnoteže proteina može uticati na rastvorljivost, zajedno sa drugim važnim funkcionalnim svojstvima, uključujući svojstva emulgovanja, formiranja pene i geliranja proteinsko-polifenolnih konjugata. Dakle, na profil rastvorljivosti proteinsko-polifenolnih konjugata najveći uticaj ima vrsta proteina, vrsta polifenola i pH vrednost na kojoj se formira konjugat.

*Emulgovanje* je takođe jedna od bitnijih osobina proteina, naročito u prehrambenoj industriji. Pošto emulzije predstavljaju nestabilne sisteme neophodno je prisustvo emulgatora. Emulgator je amfifilni sastojak, koji se lokalizuje na granici faza ulje/voda radi smanjenja površinskog pritiska i olakšavanja formiranja kapljica tokom homogenizacije kao i smanjenje flokulacije i koalescencije (McClements, 2010). Konjugacija proteina polifenolima poznata je kao efikasan pristup modifikovanju ili poboljšanju funkcionalnosti proteina. Razvoj proteinsko-polifenolnih konjugata kao novih emulgatora izazvao je veliko interesovanje poslednjih godina (Liu i sar., 2017). Proizveden je veliki broj konjugata proteina i polifenola koji imaju odlična emulgujuća svojstva. Međutim, konjugacija proteina i polifenola može negativno uticati na stvaranje emulzije, a da ima pozitivan uticaj na stabilnost emulzije. Dakle, kao i kod rastvorljivosti, efekat konjugacije proteina i polifenola na svojstva emulgatora zavisi od vrste proteina i polifenola koji su uključeni, njihove strukture kao i pH, na kome se vrši konjugacija.

Brojni biljni polifenoli mogu da deluju u interakciji sa proteinima, dajući gelove unapređenih osobina. Gelovi formirani kovalentnim interakcijama su kruti i termički stabilniji od onih koji su nastali delovanjem drugih nekovalentnih interakcija (Zhao i Sun, 2017).

### 3.3. Proteini kao izvori bioaktivnih jedinjenja

Bioaktivni peptidi su mali proteinski fragmenti sastavljeni najmanje od 2-20 aminokiselinskih podjedinica, malih molekulskih masa (<3 kDa) (Görgüç i sar., 2020). Ova jedinjenja predstavljaju multifunkcionalne komponente hrane jer pored nutritivnih osobina poseduju biološke aktivnosti koje imaju pozitivne efekte na fiziološke procese i stanje organizma.

To su hidrolizati koji se dejstvom enzima oslobađaju iz primarne strukture proteina hidrolizom njihovih peptidnih veza. Iz proteina mogu se dobiti na tri načina: enzimskom hidrolizom, gastrointestinalnom digestijom i fermentacijom mikroorganizama.

#### 3.3.1. Enzimska hidroliza

Enzimska hidroliza proteina predstavlja cepanje molekula proteina na polipeptide, peptide i/ili aminokiseline dejstvom proteolitičkih enzima. Tokom procesa hidrolize raskidaju se peptidne veze i oslobađaju se manji delovi proteina tj. peptidi. Proces enzimske hidrolize može da se izvodi primenom jednog enzima ili smeše više enzima u cilju dobijanja hidrolizata određenih osobina. U procesima enzimske hidrolize proteina parametri koji imaju najveći uticaj na produkte hidrolize su: temperatura, vrednost pH, enzim/supstrat odnos i vreme reakcije. Prva tri navedena parametra određuju brzinu reakcije i mogu da utiču na specifičnost enzima, dok se reakciono vreme odnosi samo na finalni stepen, odnosno dužinu hidrolize. Međusobna interakcija ovih parametara ima uticaj na sastav hidrolizata. Izbor navedenih parametara je kompleksan, jer zavisi i od rastvorljivosti proteinskog supstrata i aktivnosti enzima (Banan-Mwine Daliri i sar., 2017). Sve su to faktori od kojih zavisi finalni stepen hidrolize.

Stepen hidrolize (eng. *Degree of Hydrolysis*, DH) je parameter koji karakteriše u kom nivou je došlo do realizacije procesa hidrolize. Definiše se kao udeo hidrolizovanih peptidnih veza u ukupnom molekulu proteina.

Upotreba enzimske hidrolize za proizvodnju bioaktivnih peptida je poželjnija od mikrobiološke fermentacije zbog skraćenog vremena reakcije, relativno lakog i kontrolisanog izvođenja reakcije.



### 3.3.2. Gastrointestinalna digestija

Bioaktivni peptide izvedeni iz hrane kodirani su u matičnim životinjskim i biljnim proteinima i mogu biti oslobođeni *in vivo* i *in vitro* digestijom. *In vivo* biološki aktivni peptide mogu se osloboditi u GIT-u (delovanjem enzima varenja) ili ukoliko su peptidni prekursori apsorbovani u krvotok, mehanizmima razgradnje ekstra- i intracelularnih proteina. *In vitro* oslobađanje bioaktivnih peptida uključuje simulaciju GIT-a sa digestivnim enzimima.

### 3.3.3. Fermentacijom usled proteolitičke aktivnosti mikroorganizama

Uključuje kultivisanje bakterija ili kvasca na proteinskim supstratima, pri čemu se hidrolizuje protein. Rastuće bakterije ili kvasci izlučuju svoje proteolitičke enzime u proteinski materijal i oslobađaju peptide. Odabrana mikrobiološka kultura uzgaja se u kultivacionoj tečnosti do eksponencijalnog rasta na temperaturi pogodnoj za njen rast. Potom, zrele ćelije se sakupljaju, ispiraju i suspenduju u sterilnoj destilovanoj vodi koja sadrži „hranu“ za dalji rast kulture. Ovako pripremljena suspenzija koristi se kao početno sredstvo za inokulaciju sterilisanog proteinskog supstrata (Rizzello *i sar.*, 2017; Aguilar-Toalá *i sar.*, 2017). Obim hidrolize zavisi od soja koji se koristi, vrste proteina i vremena fermentacije.

### 3.3.4. Bioaktivne osobine peptida

U literaturi postoji veliki broj studija koje ukazuju na sve veći potencijal bioaktivnih peptida u razvoju funkcionalne hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Razlog tome jeste što su to nosioci biološki aktivnih osobina kao što su antioksidativna, inhibitorna aktivnost u lečenju hroničnih bolesti poput dijabetesa i hipertenzije, antiinflamatorna i dr. (Xu *i sar.*, 2019; Banan-Mwine Daliri *i sar.*, 2017).

Poslednjih nekoliko godina, istraživanja bazirana na primeni proteinskih izolata kao izvora bioaktivnih peptida dobijenih dejstvom različitih enzima u zavisnosti od njihove primene je u ekspanziji, a pregled nekih literaturnih navoda dat je u Tabeli 2.

Tabela 2. Literaturni pregled proteina kao izvora bioaktivnih peptida

	IZVOR PROTEINA	ENZIM	LITERATURA
Antioksiđativna aktivnost	Seme suncokreta	Pepsin, Pankreatin	<i>Megias i sar., 2008</i>
	Uljana repica	Peptidaze	<i>Xu i sar., 2018</i>
	Odmašćena sojina pogača	Alkalaza	<i>Raiaprolu i sar., 2013</i>
	Seme šljive, kajsije, breskve, višnje, maslina	Pepsin, Alkalaza, Pankreatin, Flavorzim, Termolizin	<i>Garcia i sar., 2016</i>
	Seme konoplje	Pepsin, pankreatin	<i>Girgih i sar., 2014</i>
Antihipertenzivna aktivnost	Riža	Himotripsin	<i>Kontani i sar., 2014</i>
	Grašak	Alkalaza	<i>Li &amp; Aluko, 2010</i>
	Kikiriki	Pepsin, pankreatin	<i>Guo i sar., 2019</i>
	Uljana pogača šljive	Pepsin, pankreatin	<i>Čakarević i sar., 2019</i>
	Uljana pogača lana	Pepsin, pankreatin, flavorzim	<i>Wu i sar., 2019</i>
Antidiјabetska aktivnost	Dinja	Proteinski ekstrakt	<i>Pham i sar., 2019</i>
	Soja	Protein, hidrolizati pepsina	<i>González-Montoya i sar., 2018</i>
	Grašak	Protein	<i>Jadhav i sar., 2021</i>
	Uljane pogače lana, repice, suncokreta, susama	Alkalaza	<i>Han i sar., 2021</i>

### 3.3.4.1. Peptidi kao antioksidanti

Reaktivne vrste kiseonika (ROS) uzrokuju oksidativni stres koji se povezuje sa mnogim bolestima kao što su reumatoidni artritis, dijabetes, upale i rak. Jedan od načina sprečavanja nastanka ovih jedinjenja i njihove oksidacije jeste upotreba antioksidanata. To su jedinjenja koja sprečavaju oksidaciju ROS-a i molekula koja se nalaze u nestabilnom elektronskom stanju.

U zavisnosti od strukture, njihov uticaj na tok procesa oksidacije hrane može biti veoma različit, pa mogu delovati:

- ✓ kao redukcionne supstance,
- ✓ kao jedinjenja koja blokiraju slobodne radikale,
- ✓ formiranjem kompleksa sa metalima koji katalizuju reakcije oksidacije,
- ✓ sprečavanjem reakcija izazvanih jednim aktivnim atomom kiseonika,
- ✓ inhibiranjem aktivnosti oksidativnih enzima (*Jamróz i Kopel, 2020*).

U hrani, najvažniji pokazatelji kvarenja su promene u rastu mikrobioloških kultura i oksidaciji pojedinih sastojaka hrane koji ostavljaju neprijatan miris i ukus. Oksidacija u hrani utiče na lipide, proteine i ugljene hidrate. Međutim, oksidacija lipida je glavni uzrok pogoršanja kvaliteta hrane, što dovodi do užeglosti i skraćivanja roka trajanja proizvoda (*Di Bernardini i sar., 2011*).

U prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji najčešće se koriste sintetski antioksidansi, kao što su BHA (smeša izomera 2-terc-butil-4-hidroksianizola i 3-terc-butil-4-hidroksianizola) i BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol). S obzirom, na niz neželjenih efekata upotreba ovih antioksidanata je zabranjena u nekoliko zemalja. Trenutni trendovi ukazuju na povećano interesovanje potrošača za proizvodima bez sintetskih aditiva i sa povećanim sadržajem prirodnih aktivnih sastojaka koji mogu pozitivno uticati na zdravlje čoveka (*Lorenzo i sar., 2018*). Stoga, poslednjih nekoliko godina istraživanja su usmerena na otkrivanju i izolovanju novih antioksidanata iz prirodnih izvora.

Antioksidativni peptidi spadaju u najdublje proučavanu grupu bioaktivnih peptida. Sastoje se uglavnom od 3 do 16 aminokiselinskih jedinica, a nosioci antioksidativnog dejstva su prolin, glutaminska kiselina, tirozin, histidin, metionin, cistein, lizin, glicin, leucin, izoleucin, fenilalanin, treonin i valin (*Gorska-Warsewicz i sar., 2018*). Ovi peptidi imaju male molekulske mase od 0,4 do 4 kDa što omogućava njihov lakši transport do ciljanog mesta delovanja. Sastav peptida prema prisutnim aminokiselina određuje način njihovog delovanja. Tako, peptidi koji sadrže tirozin deluju putem prenosa atoma vodonika, dok peptidi koji sadrže cistein, triptofan i histidin prenošenjem jednog elektrona (*Esfandi i sar., 2019*). Aromatične aminokiseline poput tirozina i fenilalanina imaju sposobnost doniranja protona (*Ajibola i sar., 2011*).

### 3.3.4.2. Antihipertenzivni peptidi

Hipertenzija je stanje povišenog krvnog pritiska koje može dovesti do mnogo ozbiljnijih oboljenja i bolesti kao što su kardiovaskularne i bolesti bubrega, arterioskleroze i moždanog udara (*Lee i Hur, 2017*). Ova bolest pogađa gotovo jednu trećinu odrasle populacije širom sveta, a budući da nema ranih simptoma hipertenzija se žargonski naziva „tihi ubica“ (*Lin i sar., 2012*). Regulacija krvnog pritiska je pod kontrolom renin-angiotenzin-aldosteron sistema (RAAS). Enzim koji je ključni u regulaciji RAAS-a je angiotenzin konvertujući enzim (ACE) (EC 3.4.15.1), čija je fiziološka uloga da konvertuje dekaeptid (angiotenzin I) u oktapeptid (angiotenzin II). Oslobođeni angiotenzin II je vazokonstriktor koji stimuliše sekreciju hormona aldosterona i vazopresina, koji uzrokuju povećan volumen krvi i dalje do hipertenzije. Prema tome, jedan od primarnih mehanizama u sprečavanju nastanka hipertenzije, jeste inhibicija aktivnosti ACE.

Sintetske ACE inhibitorne supstance koje se koriste u lečenju hipertenzije i kardiovaskularnih oboljenja jesu kaptopril, enalapril i lizinopril. Oko 40 miliona ljudi u svetu leči se primenom ovih inhibitora. Najprimenjeniji lek ovog tipa u SAD-u jeste lizinopril dok je u Evropi ramipril (*Montinaro i Cicardi, 2020*). Ovi podaci ukazuju na sve veću potrebu za prirodnim ACE inhibitorima sa efektima snižavanja krvnog pritiska u lečenju hipertenzije (*Bhat i sar., 2017*).

Prema današnjim naučnim saznanjima, peptidi iz prirodnih izvora imaju veliki potencijal za primenu u lečenju hipertenzije u zamenu za sintetske ACE inhibitore. Peptidi koji inhibiraju ACE sastavljeni su od 2 do 12 aminokiselinskih jedinica, koji sadrže kisele, pozitivno naelektrisane i hidrofobne aminokiseline (*Piovesana i sar., 2018*). Prisustvo aromatičnih grupa na C-terminalu i hidrofobnih grupa na N-terminalu aminokiselinskih ostataka pojačavaju inhibitornu aktivnost peptida (*Acquah i sar., 2018*).

### 3.3.4.3. Antidijabetski peptidi

Dijabetes ili šećerna bolest je jedna od najrasprostranjenijih hroničnih bolesti u svetu (*Neeland i Patel, 2019*). Globalno, u 2019. godini smatra se da oko 463 miliona ljudi je živelo sa dijabetesom, dok se procenjuje da će 2045. taj broj se povećati na oko 700 miliona (*Elflein, 2019*). Dijabetes je hronični poremećaj metabolizma koji se karakteriše hiperglikemijom tj. trajnim povećanjem nivoa glukoze u krvi. Postoje dva tipa dijabetesa:

- ✓ dijabetes tip 1 (što ima oko 5-10% pacijenata) koji se smatra autoimunom bolešću, gde imuni sistem napada i uništava ćelije u pankreasu i sprečava organizam da proizvodi insulin, i
- ✓ dijabetes tip 2 (što ima oko 90-95% pacijenata) gde organizam postaje otporan na insulin, što uzrokuje akumuliranje šećera u krvi (*Neeland i Patel, 2019*).

Dijabetes tip 2 smatra se bolešću koja se može sprečiti jer je najčešće posledica načina života i navika u ishrani koje mogu ostaviti trajne posledice. Način lečenja jeste usvajanje promena koje pomažu u kontroli nivoa glukoze u plazmi. To se upravo može postići stimulacijom lučenja insulina lekovima ili kontrolisanom dijetom, ili prekidanjem ili usporavanjem hidrolize skroba kako bi se smanjila apsorpcije šećera u krvi iz tankog creva (*Barrett i Udani, 2011; Kim i sar., 2014*). Mehanizam kojim je moguće sprečiti pojavu dijabetesa tip 2 jeste inhibicija enzima koji su uključeni u hidrolizu skroba do glukoze, a to su  $\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza (*Barrett i Udani, 2011; Rosak i Mertes, 2012*).

$\alpha$ -amilaza i  $\alpha$ -glukozidaza su hidrolitički enzimi koje proizvode biljke, bakterije, gljive i životinje i ljudi. Uloga ovih enzima jeste hidroliza skroba koji se unosi putem ishrane. Skrob je najrasprostranjeniji biljni polisaharid, sastavljen od dve vrste polisaharida, amiloze (linearno vezane  $\alpha$ -(1→4) glikozidnim vezama) i amilopektina (bočno vezan  $\alpha$ -(1→6) glikozidnim vezama). Konkretno,  $\alpha$ -amilaza hidrolizuje  $\alpha$ -(1→4) glikozidne veze u molekulu skroba što dovodi do stvaranja maltoze, maltotrioze, maltotetraze, maltodekstrina kao primarnog proizvoda; koji se potom razgrađuju do glukoze kao sekundarnog proizvoda. Potom,  $\alpha$ -glukozidaza je enzim koji katalizuje hidrolitičko cepanje disaharida (maltoza i saharoza) oslobođenog iz skroba u monosaharide (glukozu i fruktozu). Stoga, inhibicija ovih enzima može usporiti povećanje šećera u krvi i suzbiti hiperglikemiju koja nastaje nakon jela prilikom konzumacije hrane bogate ugljenim hidratima (*Papoutsis i sar., 2021*).

Akarboza, miglitol i vogliboza su sintetska jedinjenja koja se koriste za inhibiranje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze i  $\alpha$ -glukozidaze. Međutim, kako bi se izbegli neželjeni efekti koji nastaju upotrebom ovih lekova, poput gastrointestinalnih poremećaja, sve više se traga za alternativnim rešenjima kao što su prirodni inhibitori (*Rosak i Mertes, 2012; Trapero i Llebaria, 2012*). Proteini i bioaktivni peptidi pokazuju značajan potencijal za primenu u kontrolisanju i lečenju dijabetesa, posebno kao komponente lekova ili suplemenata kao i funkcionalne hrane. Mnogi antidijabetički peptidi iz prirodnih izvora su izolovani i potvrđeno je njihovo delovanje.

### 3.4. Proteini kao nosači bioaktivnih jedinjenja

Inkapsulacija je postupak kojim se supstanca tj. bioaktivno jedinjenje oblaže materijalom ili matriksom da bi se dobile čestice različitih veličina, u rasponu od nanometra do milimetra. Materijal koji se inkapsulira naziva se aktivna komponenta ili jezgro, dok se materijal kojim se inkapsulira naziva materijal nosač ili omotač. Čestice koje nastaju nazivaju se kapsule i mogu biti sferne, cilindrične, ovalne i nepravilnog oblika (*Zuidam i Shimoni, 2010*). Prema morfologiji, odnosno obliku i strukturi, kapsule se mogu podeliti na mikrokapsule (rezervoar tip) i mikrosfere (matriks tip). Dok mikrokapsule imaju jasnu morfologiju „jezgro–omotač”, kod mikrosfera je aktivna komponenta dispergovana u materijalu omotača (*Paulo i Santos, 2017; Sobel i sar., 2014*).

Bioaktivna jedinjenja su definisana kao mikronutrijenti ili molekuli sa terapijskim potencijalom koje ljudsko telo ne može da sintetiše. Igraju vitalnu ulogu u čovekovom životu sa svojim specifičnim funkcijama da regulišu metaboličke i ćelijske funkcije, promovišu zdravlje, reprodukciju i rast, smanjuju rizik od raznih bolesti. Ova jedinjenja, kao što su fenoli, vitamini, karotenoidi, peptidi, itd., su metaboliti biljaka i dobijaju se najčešće ekstrakcijom iz različitih biljnih vrsta. Osim toga, nalaze se u prehrambenim izvorima kao što su voće, povrće, žitarice od celog zrna, njihovi proizvodi, itd. Međutim, bioaktivna jedinjenja su hemijski reaktivna jedinjenja jako osetljiva na spoljašnje faktore i tako podložna degradaciji. Tokom obrade i skladištenja hrane na stabilnost mnogih bioaktivnih jedinjenja utiču hemijski i fizički faktori kao što su svetlost, temperatura, vrednost pH, nivo kiseonika, prisustvo enzima i/ili metalnih katalizatora, i sl. Sve ovo čini ova jedinjenja nestabilnim tokom prerade i skladištenja, a smanjuje i bioraspodivnost čime ograničava njihovu primenu. Da bi sprečila ove gubitke, prehrambena industrija teži iznalaženju rešenja koje mogu zaštititi ova jedinjenja tokom proizvodnje i skladištenja. Jedan od načina jeste inkapsulacija. To je savremena tehnologija koja inkorporira bioaktivne supstance (vitamine, enzime, fenole, molekule, ćelije) u određenu oblogu kako bi ih zaštitila od elemenata životne sredine (*Dhakal i He, 2020*).

Polimeri, prirodni ili sintetički, su materijali koji se najčešće koriste kao nosači u procesu inkapsulacije. Kriterijumi za izbor materijala kao nosača koji bi bio pogodan za inkapsulaciju i proizvodnju stabilnih inkapsulata su:

- ❖ da zaštiti jezgro od uticaja okoline u preradi hrane uključujući visoku temperaturu, pritisak, mehanička naprezanja, kiseonik, kiselost i alkalnost, vlaga i druga reaktivna jedinjenja,

- ❖ da je svarljiv u ljudskom digestivnom sistemu,
- ❖ da je bezbedan za ljudsku upotrebu,
- ❖ da je bez mirisa i boje,
- ❖ dobro rastvorljiv u vodi,
- ❖ jeftin.

Ugljeni hidrati ili tačnije polisaharidi su dobar izbor omotača, s obzirom da poseduju sposobnost stvaranja većih poroznih molekularnih struktura (*Liu i sar., 2018*), uglavnom su iz prirodnih sastojaka hrane i široko se koriste u prehrambenoj industriji, a mnogi od njih su svarljivi u humanom sistemu za varenje. Međutim, nijedan od navedenih kriterijuma ne zadovoljava potražnju potrošača za funkcionalnom hranom sa fiziološkim osobinama koja pozitivno utiču na zdravlje ljudi. S obzirom da proteini na osnovu svojih funkcionalnih osobina imaju tendenciju da budu dobri nosači u inkapsulaciji, sve je veći trend njihove primene kao nosača, naročito biljnih proteina.

Proteini su nova generacija nosača u inkapsulaciji za kojima je izražena sve veća potreba u cilju njihove primene u industriji. U poređenju sa drugim nosačima (ugljenihidrati, gume, vlakna, itd.) prednost proteina je u njihovoj visoko hranljivoj vrednosti, izvoru esencijalnih aminokiselina, ali i lakoj svarljivosti (*Čakarević i sar., 2020*). Zbog svojih amfifilnih svojstava, sposobnosti interakcije sa drugim supstancama, velikih molekulskih masa i fleksibilnosti molekulskog lanca, proteini imaju i odlične funkcionalne osobine kao što su rastvorljivost, viskoznost, sposobnost emulgovanja i stvaranja filmova, što ih čini pogodnim materijalom kao nosača aktivnih jedinjenja prilikom inkapsulacije (*Madene i sar., 2006*). Pored toga, kao što je već naglašeno proteini predstavljaju izvor bioaktivnih peptida njihovim prolaskom kroz GIT. Poznato je da se hidrolizom prehrambenih proteina digestivnim enzimima oslobađaju se bioaktivni peptidi sa različitim fiziološkim svojstvima poput antioksidativnih, antidijabetičkih, antihipertenzivnih, antikancerogenih i antimikrobnih aktivnosti (*Čakarević i sar., 2019; Popović i sar., 2017*).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su proteini korišćeni kao nosači u procesu inkapsulacije, najčešće proteini životinjskog porekla kao što su proteini jaja (*Liu i sar., 2018*), želatin (*Ducel i sar., 2004*), proteini surutke (*Amrita i sar., 1999*). Međutim, sve je češća primena biljnih proteina kao nosača u procesu inkapsulacije. Proizvodnja biljnih proteina zahteva manju potrošnju prirodnih resursa, zbog čega se ovi proteini smatraju ekonomičnim sa aspekta zaštite životne sredine. Biljni proteini u prirodnom obliku ili u obliku derivata se smatraju pogodnim nosačima u mikroinkapsulaciji, i predstavljaju dobru alternativu proteinima

životinjskog porekla i sintetičkim polimerima (*Li i Tang, 2013; Nesterenko i sar., 2013; Quintero i sar., 2018*).

Neki od primera biljnih proteina kao nosača opisanih u literaturi su:

- ❖ proteini soje u inkapsulaciji rezvertrola (*Pujara i sar., 2017*),
- ❖ proteini kikirikija u inkapsulaciji vitamina D (*Jiang i sar., 2019*),
- ❖ proteini uljane pogače tikve u inkapsulaciji soka cvekle (*Čakarević i sar., 2020*),
- ❖ proteinski izolat graška u inkapsulaciji ulja pirinča (*Benito-Román i sar., 2020*),
- ❖ protein suncokreta u inkapsulaciji tokoferola (*Nesterenko i sar., 2013*).



### 3.5. Ugradnja proteina u prehrambeni matriks

Danas je interes potrošača za "zdravim" prehrambenim proizvodima u stalnom porastu. S tim u vezi, prehrambena industrija treba da podstiče poboljšanje i razvoj novih formulacija široko upotrebljivanih proizvoda kao što su konditorski proizvodi. Ti proizvodi su veoma popularni zbog svoje privlačnosti i posebnih organoleptičkih svojstava. S obzirom da su ovakvi proizvodi bogati sintetičkim aditivima, obogaćivanje konditorskih proizvoda prirodnim izvorima bioaktivnih jedinjenja, predstavlja dobru alternativu. Na ovaj način ne samo da se mogu poboljšati organoleptička svojstva proizvoda, već se on može nutritivno obogatiti i posedovati blagotvorno dejstvo na zdravlje čoveka.

U poslednjih nekoliko godina opisan je veliki broj potencijalnih proizvoda obogaćenih prirodnim izvorima bioaktivnih jedinjenja, a to su: čajni keks (*Kaderides i sar., 2020; Lucini i sar., 2020; Kolavole i sar., 2020; Bhat i sar., 2020*), keks (*Mahloko i sar., 2019*), napolitanke (*Jakubczik, 2018; Różyło i sar., 2019*), krekeri (*Nirmala i sar., 2018*).

Naročito je izraženo obogaćivanje komercijalnih proizvoda proteinskim formulacijama, kao što su proteinski izolati, proteinska brašna, hidrolizati proteina, proteinski inkapsulati i slično. Kao što je već pomenuto, proteini poseduju prihvatljive funkcionalne osobine koje olakšavaju njihovu primenu u proizvodima. Osim toga, svarljivi su i mogu biti izvor bioaktivnih jedinjenja, nutritivno su hranljivi i bogati aminokiselinama.

Takođe, prehrambena industrija razvija funkcionalne inovacije i nove formule u hrani radi sprečavanja bolesti povezanih sa ishranom, a efikasna strategija je razvoj pekarskih proizvoda sa dodatkom različitih sastojaka kao što su proteini. Cilj ovakvih formulacija jeste dobijanje proizvoda prikladnih senzornih karakteristika sa niskim sadržajem brzo svarljivog skroba i malim glikemijskim indeksom (GI).

*Glikemijski indeks* je rangiranje ugljenohidratne hrane na osnovu glikemijskog odgovora koji ukazuje sposobnost hrane na povećanje glukoze u krvi. Eksperimentalno, GI se definiše kao odnos površina ispod krive odziva glukoze koja se oslobodi iz testirane hrane u odnosu na onu iz kontrolne hrane (glukoza ili beli hleb) (*Venn & Green, 2007*). Glikemijski odgovor namirnice zavisi od faktora kao što su veličina čestica, stepen prerade, način kuvanja, struktura skroba i udeo ostalih sastojaka hrane (dijetalna vlakna, proteini, masti). Hrana i prehrambeni proizvodi su kategorisani prema sposobnosti povećanja glukoze u krvi nakon obroka, na namirnice sa visokim (više od 70), srednjim (56-69) i niskim (manje od 55) GI. Hrana sa

visokim GI uzrokuje brz i visok postprandijalni odgovor (hiperglikemija), ne preporučuje se dijabetičarima, ali ni osobama bez patoloških stanja jer dovodi do gojaznosti koja može biti preduslov za razna oboljenja.

Istraživanja tokom poslednjih godina usmerena su na otkrivanje novih ili unapređenje postojećih formulacija prehrambenih proizvoda sa smanjenim GI indeksom. Stoga, obogaćivanje hrane sa proteinima i vlaknima predstavlja strategiju u smanjenju GI namirnica i rizika od hroničnih bolesti.

Kroz literaturu je opisan veliki broj naučnih radova koji potvrđuju da je implementacija proteina ili njihovih prerađevina u komercijalnim prehrambenim proizvodima je odgovorna za sporu svarljivost prisutnog skroba što smanjuje nizak odgovor glukoze u krvi pa time i nizak GI indeks. Neki od ovih proizvoda su:

- ❖ testenina obogaćena proteinima mahunarki kao što su crni pasulj, bob, sočivo (*Laleg i sar., 2016*),
- ❖ beli hleb obogaćen lanenim semenkama (*Sęczyk i sar., 2017*),
- ❖ kesek obogaćen alfala semenom (*Giuberti i sar., 2018*).

## **4. *Materijal i metode***

## 4.1. Materijali

### 4.1.1. Sirovine

Uljana pogača tikve golice (*Cucurbita pepo* L. c. v. Olinka) pribavljena je od firme “Linum”, Čonoplja u Srbiji. Ona predstavlja nusproizvod industrije ulja i dobijena je u procesu ceđenja ulja iz semena tikve, postupkom hladnog ceđenja. Koštice kajsije (*Prunus armeniaca*) i šljive (*Prunus domestica*) pribavljene su preko Udruženja vinogradara i vinara vinogorja Baranje, Kneževi Vinogradi u Hrvatskoj. Njihove uljane pogače dobijene su ceđenjem ulja iz semena postupkom hladnog ceđenja i superkričnom ekstrakcijom.

Cvekla (*Beta vulgaris* L., cv 'Bicolor') je pribavljena u lokalnoj prodavnici iz koje je ceđenjem pomoću sokovnika dobijen sok koji je korišćen kao sirovina.

### 4.1.2. Hemikalije i reagensi

Svi reagensi i hemikalije korišćeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke ili višeg stepena čistoće. 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina (ABTS), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal, N-Hipuril-His-Leu hidrat, o-ftaldialdehid (OPA), kalijum-persulfat i Dalton Mark VII su proizvodi Sigma Chemical Company (Sigma Aldrich, SAD).

Za ispitivanja su korišćeni komercijalno dostupni tečni ili čvrsti enzimski preparati:  $\alpha$ -amilaza iz ljudske pljuvačke (deklarisane aktivnosti 1 KU), pankreatin poreklom iz pankreasa svinje (deklarisane aktivnosti 4\*USP),  $\alpha$ -glukozidaza iz *Saccharomyces cerevisiae* (deklarisane aktivnosti 107 U/mg) pribavljeni od proizvođača Sigma Chemical Company (Sigma Aldrich, SAD); pepsin iz želudca svinje (deklarisane jačine 0,7 FIP U/mg) od proizvođača AppliChem (Darmstadt, Nemačka).

Kafena kiselina je komercijalni preparat kompanije Merck KGaA (Darmstadt, Nemačka). GOPOD enzimski kit pribavljen od kompanije Megazyme (Wicklow, Ireland).

## 4.2. Metode

### 4.2.1. Hemijski sastav uljanih pogača

Hemijski sastav uljanih pogača određivan je prema standardnim metodama (Association Official of Analytical Chemists – AOAC, 2000) za: određivanje sadržaja vlage (984,25), proteina (950,36), masti (935,38) i ukupnih prehrambenih vlakana (985.29).

Sadržaj ukupnih i redukujućih šećera, kao i sadržaj saharoze, određen je metodom po Luff-Schoorl-u (Sl. list SFRJ, 29/83).

Sadržaj vlage određen je sušenjem na  $105 \pm 0,5$  °C do konstantne mase.

Sadržaj proteina određen je metodom po Kjeldahl-u, pri čemu je korekcionni faktor 6,25 korišćen za preračunavanje količine azota određene titracijom u ukupnoj količini sirovih proteina.

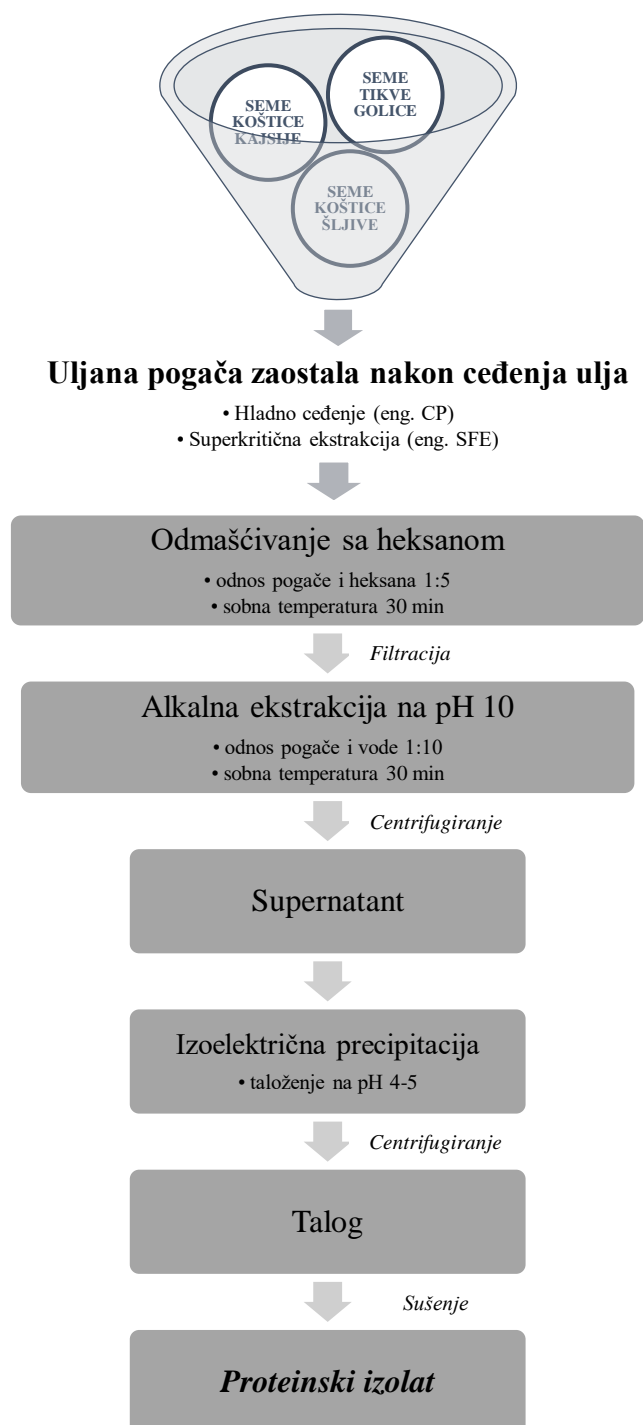
Sadržaj masti određen je metodom po Weibull-Stoldt-u, čiji princip se zasniva na tretiranju proizvoda hlorovodoničnom kiselinom u cilju hidrolize masti, koja se nakon hidrolize ekstrahuje organskim rastvaračem u Soxhlet-ovoj aparaturi.

### 4.2.2. Postupci dobijanja proteinskog izolata, konjugata, inkapsulata i ugradnje inkapsulata u matriks

#### 4.2.2.1. Dobijanje proteinskog izolata

Proteinski izolat (PI) pripreman je metodom alkalne ekstrakcije opisanoj prema *Vaštag (2011)*, šematski prikazanoj na Slici 10. Uljana pogača je samlevena u aparatu za mlevenje kafe, do veličina čestica ispod 2 mm. Samlevena pogača je obezmašćena heksanom, u odnosu mase i zapremine 1:5, uz stalno mešanje na sobnoj temperaturi tokom 30 min, a zatim je heksan uklonjen filtracijom. Postupak obezmašćivanja je ponovljen dva puta. Potom, samlevena i obezmašćena pogača suspendovana je u vodi u odnosu 1:10, uz podešavanje vrednosti pH na 10 sa 0,1M rastvorom NaOH. Ovako pripremljena suspenzija je mešana uz konstantnu kontrolu pH tokom 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je centrifugirana na 10 000 o/min, tokom 10 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Nakon toga, vrednost pH supernatanta se spušta pomoću 0,1M rastvor HCl do pH vrednosti

izoelektrične tačke proteina (pH 5). Usled spuštanja pH pojavljuje se beličasti talog u kome se nalazi protein koji se odvaja centrifugiranjem pri 10 000 o/min, tokom 20 min, na +4 °C (Sorvall® RC-5B Refrigerated Suprespeed Centrifuge, Du Pont Instruments). Supernatant se odbacuje, a dobijeni talog se suši na sobnoj temperaturi i usitnjava do praškastog oblika.



Slika 10. Šema izolovanja proteinskog izolata iz uljane pogače

Prinos proteinskog izolata prema opisanom postupku kreće se od 10 do 15% preračunato na polaznu masu samlevene uljane pogače. Proteinski izolat čuvan je u frižideru (+4 °C) i stabilan je do nekoliko meseci.

#### 4.2.2.2. Dobijanje konjugata

Konjugacija proteinskog izolata šljive (PI) i kafene kiseline (KK) rađena je prema metodi opisanoj od strane autora *Yang i sar. (2019)*. Rastvor KK pripreman je rastvaranjem različitih masa (0,05; 0,15 i 0,25 g) u 50 mL destilovane vode uz podešavanje vrednosti pH rastvora na 9. Rastvor PI šljive pripreman je u koncentraciji 20 mg/mL u vodi sa podešavanjem vrednosti pH na 9 sa 0,1M rastvorom NaOH. Pripremljeni rastvori PI i KK pomešani su u jednakoj zapremini i homogenizovani na šejkeru (Heidolph Instruments Unimax 2010, Nemačka) 24 h na sobnoj temperaturi i izloženi vazduhu. Nakon 24 h rastvor je potamnio što ukazuje da je došlo do hemijske reakcije. Slobodni fenoli uklonjeni su dijalizom (polupropustljivom membranom veličine pora 14 kDa) na 4 °C tokom 48 h, uz česte promene vode. Nakon dijalize uzorci su smrznuti na -80 °C na 48 h i potom sušeni na liofilizatoru model Alpha 2-4 LSC (Martin Christ, Nemačka) do potpunog gubitka tečne faze i dobijanja praha. Nakon sušenja uzorci su pakovani u kivete i čuvani u zamrzivaču. Pored konjugata pripreman je i sam PI šljive kao kontrolni uzorak.

Uzorci su definisani u odnosu na sadržaj kafene kiseline u konjugatu kao: *K1* (sa 0,05 g KK), *K2* (sa 0,15 g KK), *K3* (sa 0,25 g KK), *PI* (rastvoren PI šljive).

#### 4.2.2.3. Inkapsulacija soka cvekle na proteinskom izolatu tikve

U eksperimentalnom delu disertacije, rađena je inkapsulacija soka cvekle (SC) kao aktivne komponente na proteinskom izolatu (PI) tikve kao nosaču. Odnos nosača i aktivne komponente bio je 1:20 (m/V), i u obe tehnike inkapsulacije primenjen je isti odnos. Smeša je pre inkapsuliranja dobro homogenizovana na šejkeru (Heidolph Instruments Unimax 2010, Nemačka). Kao kontrolni uzorak korišćen je PI rastvoren u 0,1M fosfatnom puferu pH 8, koji ima isti pH kao SC. Ovako pripremljene smeše sušene su *freeze* i *spray drying* tehnikama.

Za sušenje inkapsulata liofilizacijom, odnosno *freeze drying* tehnikom, korišćen je laboratorijski liofilizator model Alpha 2-4 LSC proizvođača Martin Christ (Osterode am Harc, Nemačka). Pripremljene suspenzije za inkapsulaciju su zamrznute na -80 °C u uređaju za

dubinsko zamrzavanje (Snijders Labs, Tilburg, Holandija). Momenat izjednačavanja temperature uzorka i grejanja je bio indikator da nema preostalog leda za sublimaciju, odnosno da je proces liofilizacije završen.

Za sušenje inkapsulata u struji toplog vazduha, odnosno *spray drying* tehnikom, korišćen je laboratorijski Mini Spray Dryer "Büchi 190" (Flavil, Švajcarska). Ulazna temperatura je bila 130 °C, a izlazna 70 °C, protok vazduha iznosio je 600 L/h, a protok tečnosti 7,4 mL/min.

#### 4.2.2.4. Ugradnja inkapsulata u matriks

Dobijeni inkapsulati ugrađivani su u prehrambeni matriks, za koji je izabrano da bude čajno pecivo u obliku keksa. Testo čajnog peciva rađeno je prema metodi *Pajin (2009)*. Formulacija za testo sadrži sledeće: belo pšenično brašno (46,86 g), šećer (16,4 g), biljna mast (9,84 g), natrijum hlorid (0,26 g), natrijum karbonat (0,14 g), amonijum bikarbonat (0,09 g) i voda do sadržaja vlage od 23%. U testu je izvršena supstitucija brašna sa inkapsulatima u sadržaju od 10%, 15% i 20% inkapsulata. Prvo su pomešani suvi sastojci, a potom je dodavano mast i voda, i testo je mešano tokom 15 min. Ovako pripremljeno testo ostavljeno je da odmori 3 h na 20 °C u termostatu. Nakon toga testo je razvučeno na debljinu od 3 mm (Laminoir Marchand LA4-500) i sečeno u pravougaoni oblik dimenzija 4x3 cm. Ovako pripremljeni uzorci pečeni su na 160 °C tokom 17 min. Nakon pečenja čajno pecivo je ohlađeno do sobne temperature (najmanje 60 min) i nakon toga svaki keks je posebno pakovan u polipropilensku foliju i čuvan u kartonskim kutijama na tamnom mestu.

Uzorci su definisani u odnosu na sadržaj inkapsulata u keksu kao: *KO1* (sa 10% inkapsulata), *KO2* (sa 15% inkapsulata), *KO3* (sa 20% inkapsulata), *KO* (keks sa belim brašnom).



### **4.2.3. Hemijske analize u karakterizaciji proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa**

#### **4.2.3.1. Aminokiselinski sastav**

Analiza aminokiselinskog sastava u proteinskim izolatima izvedena je jonoizmjenjivačkom hromatografijom sa amino analizatorom Biochrom 30+ (Biochrom, Cambridge, UK), prema metodi opisanoj od strane *Spackman i sar. (1958)*. Tehnika se zasniva na razdvajanju aminokiselina primenom hromatografije sa izmenjivanjem katjona, praćene bojenom reakcijom ninhidrina i fotometrijskom detekcijom na 570 nm i 440 nm (za prolin). Pre analize, uzorci su hidrolizovani u 6M HCl na 110 °C tokom 24 h. Nakon hidrolize, uzorci su ohlađeni na sobnu temperaturu i rastvoreni u 25 mL pufera (vrednosti pH 2,2) za punjenje analizatora. Dobijena retencionna vremena aminokiselina su identifikovana sa retencionim vremenima standarda aminokiselina. Rezultati su izraženi kao g aminokiseline na 100 g proteinskog izolata (*Tomičić i sar., 2020*).

#### **4.2.3.2. Određivanje sadržaja amigdalina**

Sadržaj amigdalina u proteinskim izolatima određen je metodom opisanoj prema *Bolarinwaa i sar. (2014)*, uz pojedine korekcije. U odmernu tikvicu izmereno je 2 g PI i dodato je 50 mL etanola. Ovako pripremljena smeša kuvana je tokom 120 min na 78,5 °C, nakon čega su ekstrakti profiltrirani i upareni pod vakuumom da bi se potpuno uklonio etanol. Potom, uzorci su rastvoreni u destilovanoj vodi i analizirani tečnom hromatografijom visoke rezolucije (eng. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*). Uslovi 1290 Agilent HPLC sistema sa DAD detektorom su: razdvajanje na koloni Supelco Analytical HS-C18 (4,6\*250 mm, 5 µm), protok 1 mL/min, temperatura 20 °C, zapremina injektovanja 20 µL, UV detekcija na 210 nm. Mobilna faza je smeša destilovane vode i metanola u odnosu 75:25 (v/v).

#### **4.2.3.3. Određivanje sadržaja fenola**

U eksperimentalnom delu disertacije ukupan sadržaj fenola u uzorcima određivan je iz više metoda, u zavisnosti od analiziranog uzorka.

U ekstraktima i hidrolizatima čajnog peciva i inkapsulata sadržaj fenola u uzorku određivan je spektrofotometrijski prema metodi *Singleton i sar. (1999)*. U konjugatima i njihovim

hidrolizatima fenolni ekvivalent u uzorku određivan je spektrofotometrijski prema metodi Yang i sar. (2019).

#### 4.2.3.4. Određivanje sadržaja betalaina

Sadržaj betalaina određivan je u uzorcima inkapsulata i čajnog peciva, prema metodi opisanoj od strane autora Von Elbe i sar. (2004). Metoda je prilagođena za mikrotitar ploče (Nunc, Roskilde, Denmark) merene na spektrofotometru Multiskan GO Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finland). U otvor mikrotitar ploče, pomešan je uzorak u X ( $\mu\text{L}$ ) zapremini sa 250  $\mu\text{L}$  0,05M fosfatnim puferom pH 6,5 tako da izmerena apsorbance rastvora na 538 nm bude između 0,4 i 0,5. Dobijenom rastvoru meriti apsorbance i na 476 nm i 600 nm. Slepa proba je sam pufer. Tačne apsorbance betalaina i vulgaksantina izračunate su prema sledećim jednačinama (3.1., 3.2., 3.3.):

$$x = 1,095 * (a - c) \quad (3.1.)$$

$$y = b - z - \frac{x}{3,1} \quad (3.2.)$$

$$z = a - x \quad (3.3.)$$

Gde su:  $a$  apsorbance ekstrakta na 538 nm,  $b$  apsorbance ekstrakta na 476 nm,  $c$  apsorbance ekstrakta na 600 nm,  $x$  apsorbance betalaina umanjena za vrednost apsorcije obojenih nečistoća,  $y$  apsorbance vulgaksantina umanjena za vrednost apsorcije betalaina i obojenih nečistoća.

Koncentracija betalaina i vulgaksantina u uzorcima izračunava se prema jednačini (3.4.):

$$C \left( \frac{\text{mg}}{100 \text{ mL}} \right) = x(y) * F * 1000 / A^{1\%} \quad (3.4.)$$

Gde su:  $F$  faktor razblaženja,  $A^{1\%}$  koeficijent apsorbancije (za betalaine 1120, za vulgaksantin 750).

#### 4.2.3.5. Određivanje glikemijskog indeksa

Glikemijski indeks čajnog peciva određivan je prema metodi opisanoj od strane autora Molinari i sar. (2018), uz pojedine modifikacije. Metoda je zasnovana na hidrolizi skroba do glukoze u uzorcima. Pre toga, pod određenim uslovima vrši se hidroliza pepsinom nakon čega

se oslobođeni škrob dalje hidrolizuje do maltoze uz pomoć enzima  $\alpha$ -amilaze. Nakon toga, sledi razgradnja maltoze do glukoznih jedinica uz pomoć enzima amiloglukozidaze.

Koncentracija oslobođene glukoze određuje se uz pomoć GOPOD enzimskog kita (Megazyme, Wicklow, Ireland). Površina ispod dobijene krive hidrolize koristi se za izračunavanje stepena hidrolize i očekivanog glikemijskog indeksa

#### **4.2.4. Karakterizacija proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa**

##### **4.2.4.1. Elektroforeza**

U eksperimentalnom delu disertacije korišćene su dve metode elektroforeze:

*SDS gel elektroforeza*- izvedena je po metodi *Laemmli (1970)*. Sistem za elektroforezu se sastoji od dva akrilamidna gela: gel za uzorke 4% (w/v) i separacioni gel 10 ili 12% (w/v). Uzorci su pripremani u koncentracijama oko 1 mg/mL u Tris/Glicin puferu pH 8,9 koji sadrži 20 g/L SDS-a i 50 g/L  $\beta$ -merkaptetoetanol. Gelovi su bojeni u zavisnosti od vrste i koncentracije uzoraka na dva načina:

- Bojenje *Coomassie brilliant blue R-250* u trajanju od 30 min, rastvorom koji sadrži 10% (v/v) sirćetne kiseline, 50% (v/v) metanola i 0,2% *Coomassie brilliant blue R-250* (w/v). Potom su obezbojavani sa rastvorom koji sadrži 10% (v/v) sirćetne kiseline i 40% (v/v) metanola.
- Bojenje srebrom.

*Kapilarna elektroforeza* izvedena je automatskom Lab-on-a-Chip kapilarnom elektroforezom prema metodi *Tomić i sar. (2016)*. Razdvajanje proteina je izvedeno na uređaju Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) uz pomoć Protein 80 Plus LabChip kit i softvera (Protein 80 software assay on 2100 expert software). Čip je pripremljen prema protokolu koji je obezbedio proizvođač, u skladu sa odabranom analizom.

##### **4.2.4.2. Furije transformišuća infracrvena (FTIR) spektroskopija**

Uzorci su pripremani za FTIR snimanje tako što su pakovani u tablete sa KBr, u masenom odnosu 1:1. Svi uzorci su snimani na sobnoj temperaturi na uređaju Nicolet IS10 FT-IR spektrofotometar (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Spektri su snimani u opsegu 4000-

500  $\text{cm}^{-1}$ , pri rezoluciji od 4  $\text{cm}^{-1}$ . Pre snimanja svakog uzorka snimljena je slepa proba. Softver *Omnice 8.1*. (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) je korišćen za prikupljanje i obradu FTIR spektara. Rezultati snimanja prikazani su grafički.

#### 4.2.4.3. Mikroskopska analiza uzoraka

Morfologija uzoraka ispitivana je skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), na uređaju HITACHI TM 3030. Svaki uzorak sniman je na različitim uvećanjima nekoliko puta. Rezultati su prikazani slikama.

#### 4.2.4.4. Gel hromatografija

Gel permeaciona hromatografija visokih performansi (eng. *Size exclusion-HPLC*) rađena je na HPLC sistemu Agilent 1100 Series koristeći ZORBAX GF-450 kolonu, (Analytical, 9,4x250 mm, 6  $\mu\text{m}$ , Agilent). Eluiranje se sprovodi smešom mobilnih faza A i B u odnosu 50%:50%, gde je faza A - 0,1% trifluorosirćetna kiselina (TFA) u vodi, a faza B - 0,1% TFA u acetonitrilu, i pri protoku od 1mL/min. Eluiranje je vršeno na temperaturi 20 °C, i detekcija na 210 nm.

Uzorci su rastvoreni u vodenoj fazi, i prethodno su filtrirani kroz filter 0,45  $\mu\text{m}$ . Korišćena su četiri proteinska standarda: Carbonic Anhydrate molekulske mase 29 000 Da, Alcohol Dehidrogenase molekulske mase 150 000 Da, Albumin molekulske mase 66 000 Da, Citohrom C molekulske mase 12 000 Da.

#### 4.2.4.5. Fluoroscencija

Fluoroscencija je rađena prema metodi *Jia i sar. (2016)*.

#### 4.2.4.6. Određivanje raspodela veličine čestica

Raspodela veličine čestica inkapsulata određena je primenom metode difrakcije laserske svetlosti. Merenje je izvršeno na uređaju Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK) opremljenim sa disperzionom jedinicom Scirocco2000 i Mastersizer 2000 Softver-om. Ispitivani uzorak propušta se kroz snop svetlosti i rasejava svetlost pod karakterističnim

prostornim uglovima. Uređaj Mastersizer 2000 koristi dva izvora svetlosti, HeNe laser predstavlja izvor crvene svetlosti talasne dužine 633 nm, i smešten je u osi instrumenta. Drugi izvor svetlosti, koji nije u osi, je LED koji emituje plavu svetlost talasne dužine 455 nm. Opseg veličina čestica koje se mogu izmeriti instrumentom je od 0,02 do 2000  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4.7. Određivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost inkapsulata određena je prema metodi koju su opisali *Correia i sar. (2017)*. Prah inkapsulata (0,5 g) pomešan je sa 50 mL destilovane vode, potom homogenizovan na velikim brzinama tokom 5 minuta i centrifugiran pri 4000 o/min 5 minuta. Alikvot supernatanta (25 mL) prenet je u prethodno izmerene aluminijske posude i sušen do konstantne mase na 105 °C. Odnos dobijene masa i prethodno izmerene mase predstavlja rastvorljivost inkapsulata izraženu u procentima.

#### 4.2.4.8. Određivanje aktivnosti vode

Aktivnost vode ili  $a_w$  vrednost u inkapsulatu je izražena merenjem na  $a_w$ - metru LabSwiftawmeter Novasina (Švajcarska) na 25 °C.

#### 4.2.4.9. Određivanje vlage

Određivanje sadržaja vlage u uzorku inkapsulata rađena je prema gravimetrijskoj metodi, sušenjem do konstantne mase na 105 °C, koju propisuje Ph. Jug. IV.

#### 4.2.4.10. Određivanje higroskopnosti

Higroskopnost inkapsulata je određivana prema metodi koju su opisali *Cai i Corke (2000)*, uz izvesne ismene. Uzorci inkapsulata (0,5 g) postavljeni su na petri ploče i čuvani u eksikatoru pod uslovima relativne vlažnosti 75,3% (koja se postiže zasićenim rastvorom NaCl) na 25 °C u trajanju od 7 dana. Nakon skladištenja, uzorci su izmereni i dobijeni rezultati predstavljaju higroskopnost koja se izražava kao gram apsorbovane vode na 100 g uzorka.

#### 4.2.4.11. Određivanje nasipne gustine

Nasipna gustina se najčešće definiše kao odnos mase praškastog uzorka i zapremine koju zauzima njegova masa. Kod inkapsulata izražena je kao odnos mase inkapsulata (10 g) i zapremine očitane koju inkapsulat zauzima u menzuri od 100 mL. Vrednost nasipne gustine je izražena kao masa inkapsulata po mL (g/mL).

#### 4.2.4.12. Određivanje boje

Boja inkapsulata određena je uz pomoć kolorimetra Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan) i sistema boja CIE Lab. Uzorci su smešteni u providnu plastičnu čeliju debljine 15 mm bez poklopca. Crna podloga je korišćena kao podloga za standardizaciju, a bela ploča za kalibraciju. Rezultati su izraženi prema CIE Lab sistemu boja gde su koordinate definisane na sledeći način:  $L^*$  je koordinata svetloće boje (gde 0 označava crno, a 100 belo),  $a^*$  je udeo crvene/zelene boje (gde  $a^* > 0$  označava crvenu i  $a^* < 0$  označava zelenu boju), i  $b^*$  je udeo žute/plave boje (gde  $b^* > 0$  označava žutu i  $b^* < 0$  označava plavu boju).

#### 4.2.4.13. Određivanje efikasnosti inkapsulacije

Efikasnost inkapsulacije, dobijenih *freeze* i *spray drying* tehnikama, određena je prema modifikovanoj metodi *Robert i sar. (2010)*. Parametar efikasnosti inkapsulacije predstavlja odnos površinskih i ukupnih fenola u inkapsulatu. Za određivanje površinskih fenola (PF), 100 mg inkapsulata rastvoreno je u 1 mL smeše etanol- sirćetna kiselina- voda (50:8:42). Smeša je homogenizovana na vortex-u 1 min i centrifugirana na 5000 o/ min u toku 2 min, iz dobijenog supernatanta određivan je sadržaj fenola (Poglavlje 3.2.3.3.). Za određivanje ukupnih fenola (UF), 100 mg inkapsulata rastvoreno je u 1 mL smeše etanol- metanol (1:1). Smeša je homogenizovana na vortex-u 1 min i centrifugirana na 5000 o/ min 2 min, iz dobijenog supernatanta određivan je sadržaj fenola (Poglavlje 3.2.3.3). Vrednost efikasnosti inkapsulacije (EI) izračunata je prema jednačini (3.5.):

$$EI (\%) = ((UF - PF)/UF) * 100 \quad (3.5.)$$

#### 4.2.5. Određivanje funkcionalnih osobina proteinskih izolata i konjugata

U eksperimentalnom delu disertacije ispitane su funkcionalne osobine proteinskih izolata i konjugata. Metode su izvođene uz razne korekcije u zavisnosti da li se radi o PI ili konjugatu.

##### 4.2.5.1. Rastvorljivost

Rastvorljivost PI određivana je na različitim vrednostima pH (pH 2-9) i jonskoj jačini (0,1; 0,5 i 1 mol/L NaCl), dok je kod konjugata praćena samo na različitim vrednostima pH (pH 2-10). Odmerenom uzorku (10 mg) u ependorf kivetama dodato je 1 mL pufera određene vrednosti pH. Uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 1h na mini šejkeru Biosan TS 100-C (Biosan, Latvia). Nakon toga uzorci su centrifugirani pri 14 500 rpm u trajanju od 10 min (Ependorf Mini spin plus, Eppendorf, Nemačka). Rastvorljivi proteini iz supernatanta PI određivani su prema metodi *Lowry i sar. (1951)*, dok iz supernatanta konjugata prema metodi *Bradford (1976)*.

##### 4.2.5.2. Emulzione osobine

Emulzije pripremane u eksperimentalnom delu su emulzija tipa ulje u vodi sa 15% uljane faze (suncokretovo ulje), sa određenim koncentracijama vodene faze, pripremane u 0,1M fosfatnom puferu pH 10: 10 mg/mL za PI kajsije i 5 mg/mL za konjugate. Pomešane faze su homogenizovane su pri 15 000 i 10 000 rpm tokom 10 min uz pomoć Ultra-Turrax T 25 (IKA, Kina).

Indeks stabilnosti emulzije (ESI) i indeks sposobnosti emulgovanja (EAI) određivani su prema metodi *Pearce i Kinsella (1978)*. Iz sveže pripremljene emulzije uzima se alikvot od 0,05 mL i meša sa 5 mL 0,01% SDS i meri apsorbanca na  $\lambda=500$  nm (T80/T80+ UV-Vis Spectrophotometer PG instruments LTD). Postupak se ponavlja nakon 10 min. Vrednosti ESI i EAI su izračunate prema jednačinama (3.6., 3.7.):

$$EAI (m^2/g) = \frac{2*2.303*A_0*D}{10000*\lambda*C} \quad (3.6.)$$

$$ESI (min) = \frac{A_0}{A_0-A_{10}} \quad (3.7.)$$

Gde su:  $A_0$  apsorbancu u 0 min nakon formiranja emulzije,  $A_{10}$  apsorbancu nakon 10 min od formiranja emulzije,  $C$  koncentracije vodene faze (g/mL),  $D$  faktor razblaženja,  $\lambda$  udeo uljane faze (%).

Stabilnost emulzija praćena je kriming testom, prema metodi *Bučko i sar. (2015)*. Sveže pripremljene emulzije sipane su u graduisane menzure od 10 mL i ćuvane tokom 14 dana na sobnoj temperaturi. Tokom vremena skladištenja, emulzije se razdvajaju na sloj krem (gornji sloj) i sloj serum (donji sloj). Kriming indeks (KI) izraćunat je iz jednaćine (3.8):

$$KI (\%) = \frac{H_s}{H_e} * 100 \quad (3.8.)$$

Gde su:  $H_s$  visina serum sloja,  $H_e$  visina emulzije.

#### 4.2.5.3. Stvaranje pene

Pene su pripremane rastvaranjem proteinskog izolata ili konjugata u 0,1M fosfatnom puferu pH 10 koncentraciji: 10 mg/mL za PI kajsije i 5 mg/mL za konjugate. Pripremljeni rastvori homogenizovani su pri 5 000 rpm (Ultra-Turrax T 25) tokom 2 min i prebaćeni u graduisani cilindar. Tokom 0, 1, 10, 30, 60, 90 min oćitavane su zapremine formirane pene.

Kapacitet pene (eng. *Foam capacity*, FC) i stabilnost pene (eng. *Foam stability*, FS) izraćeni su u procentima, a izraćunati prema jednaćinama (3.9., 3.10.):

$$FC (\%) = \frac{(V_{p,0} - V_{t,0})}{V_{t,0}} * 100 \quad (3.9.)$$

$$FS(\%) = \frac{(V_{p,90} - V_{t,90})}{V_{t,0}} * 100 \quad (3.10.)$$

Gde su:  $V_{p,0}$  visina pene u 0 min i 90 min.

#### 4.2.5.4. Kapacitet vezivanja ulja i vode

Kapacitet vezivanja ulja i vode odrećivan je prema metodi *Rodsamran i Sothornvit (2018)* uz izvesne korekcije. U prethodno izmerene ependorf kivete dodato je 0,1 g uzorka PI i 1 mL ulja ili vode. Pripremljene kivete su mešane na šejkeru (Thermo-Shaker TS-100C, Biosan, Latvia) na 30 °C tokom 30 min, nakon ćega su centrifugirane na 14 500 rpm (Ependorf Mini spin plus, Eppendorf, Nemaćka) tokom 20 min. Nakon toga, odlivanjem iz kiveta uklonjeni su



voda i ulje. Kivetama sa uzorcima je nakon toga izmerena masa i kapacitet vezivanja ulja i vode je izražen kao g ulja ili vode/g PI.

#### **4.2.6. Ispitivanje svarljivosti i bioaktivnosti dobijenih hidrolizata proteinskih izolata, konjugata, inkapsulata i matriksa**

##### **4.2.6.1. *In vitro* digestija**

Metoda *in vitro* digestije izvedena je prema metodama *Vaštag i sar. (2013)* i *Minekus i sar. (2014)* uz pojedine modifikacije. U zavisnosti od vrste uzorka kojoj je određivana svarljivost primenjivana je neka od navedenih metoda.

##### ***In vitro* digestija proteinskih izolata i inkapsulata**

U slučaju proteinskih izolata i inkapsulata *in vitro* digestija je izvedena iz metode opisane prema *Vaštag i sar. (2013)*, uz pojedine izmene. Metoda je zasnovana na dvostepenoj hidrolizi uz pomoć digestivnih enzima pepsina i pankreatina. Prva faza digestije je hidroliza pepsinom u odnosu enzim/ supstrat (E/S= 1/25), koja simulira uslove u želucu. Ova faza se izvodi na pH 3 i traje 120 min. Nakon toga, sledi druga faza digestije koja predstavlja hidrolizu pankreatinom u odnosu enzim/ supstrat (E/S= 1/25), koja simulira uslove u tankom crevu. Ova hidroliza se izvodi pri pH 7 i traje 120 min. Proces digestije se izvodi na temperaturi od 37 °C.

##### ***In vitro* digestija konjugata i čajnog peciva**

U slučaju konjugata i čajnog peciva *in vitro* digestija je izvedena iz metode opisane prema *Minekus i sar. (2014)*, uz pojedine izmene. Metoda je zasnovana na tri faze koje simuliraju uslove u ustima, želucu i crevu. Simulirani sokovi pljuvačke (SSP), želuca (SSŽ) i creva (SSC) pripremljeni su prema recepturi koja je prikazana u Tabeli 3.

Samleveni uzorak se pomeša sa 5 mL vode i 4 mL SSP i 25 µL 0,3 M CaCl<sub>2</sub>. Potom, vrednost pH rastvora se podesi na pH 7 nakon čega se doda 0,5 mL enzima α-amilaze i rastvor dopuni sa destilovanom vodom do 10 mL. Oralna faza izvodi se na 37 °C i traje 2 min, što simulira proces žvakanja. Želudačna faza započinje dodavanjem 8 mL SSŽ i 5 µL 0,3 M CaCl<sub>2</sub> i podešavanjem vrednosti pH na 3. Nakon toga, dodaje se 0,04 g enzima pepsina i dopuni se zapremina rastvora sa destilovanom vodom do 20 mL. Ova faza se inkubira na 37 °C i traje 120 min. Na kraju faze uzima se alikvot koji se centrifugira na 10 000 rpm 5 min, dobijeni supernatant se čuva i koristi za dalje analize. Potom započinje intestinalna faza tako što se u

rastvor doda 11 mL SSC i 40  $\mu$ L 0,3 M  $\text{CaCl}_2$ . Vrednost pH rastvora podešava se na 7. Zatim se dodaje 0,04 g enzima pankreatina i dopunjava se zapremina rastvora sa destilovanom vodom do 40 mL. Intestinalna faza se inkubira na 37 °C i traje 120 min. Nakon toga, uzorci se centrifugiraju 10 000 rpm na 10 min. Dobijeni supernatant se čuva u zamrzivaču i koristi za dalje analize.

Tabela 3. Priprema simuliranih sokova digestivnog trakta

	Koncentracija soli u sokovima (mM)		
	SSP (pH 7)	SSŽ (pH 3)	SSC (pH7)
<b>KCl</b>	15,1	6,9	6,8
<b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math></b>	3,7	0,9	0,8
<b><math>\text{NaHCO}_3</math></b>	13,6	25	85
<b>NaCl</b>	-	47,2	38,4
<b><math>\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6</math></b>	0,15	0,1	0,33
<b><math>(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3</math></b>	0,06	0,5	-

\*pH sokova podešavan uz pomoć 0,1M NaOH i 6M HCl

#### 4.2.6.2. Određivanje stepena hidrolize (DH)

Stepen hidrolize (eng. *Degree of Hydrolysis* DH) se određuje primenom TCA prema metodi opisanoj od strane *Tsumura i sar. (1999)*. Metoda se zasniva na određivanju udela rastvorljivih proteina hidrolizata u rastvoru TCA, određene koncentracije. Supernatant hidrolizata i hladnog rastvora 0,44M TCA mešaju se u jednakim zapreminama i inkubiraju u frižideru (na +4 °C). Nakon 30 min stajanja, uzorak se centrifugira na Mini spin plus (Eppendorf, Nemačka) na 14 500 rpm 5 min. U talogu pada neistaloženi protein dok u supernatantu ostaje rastvorljiv protein čija se koncentracija određuje metodama *Lowry* ili *Bradford* u zavisnosti od vrste uzorka.

Vrednost DH je izračunata prema jednačini (3.11.):

$$DH (\%) = \frac{C_{TCA}}{C_{UK}} * 100 \quad (3.11)$$

Gde su:  $C_{TCA}$  koncentracije rastvorljivih proteina u TCA frakciji,  $C_{UK}$  koncentracije ukupnih proteina u hidrolizatu.

#### 4.2.6.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost uzoraka određivana je uz pomoć spektrofotometrijskih metoda neutralizacije ABTS i DPPH radikala (Popović i sar., 2013). Princip metode prema neutralizaciji ABTS radikal katjona je na obezbojavanju zelenog rastvora ABTS radikal katjona u prisustvu uzoraka, na  $\lambda=734$  nm. Princip metode prema neutralizaciji DPPH radikala je na merenju promene koncentracije stabilnih DPPH radikala u prisustvu ispitivanih uzoraka, praćenjem obezbojavanja ljubičastog rastvora DPPH radikala na  $\lambda=520$  nm. Apsorbance proba i slepih proba merene su na spektrofotometru T80 + UV-Vis Spectrophotometer, PG instruments LTD. Na osnovu apsorbanci u probi i slepoj probi nakon reakcije, antiradikalna aktivnost hidrolizata izračunata je prema jednačini (3.12.):

$$AA (\%) = \frac{A_{sp} - A_p}{A_{sp}} * 100 \quad (3.12.)$$

Gde su:  $A_{sp}$  apsorbance u slepoj probi, a  $A_p$  apsorbance u probi sa uzorkom ( $t=10$  min za ABTS,  $t=30$  min za DPPH).

#### 4.2.6.4. Određivanje antihipertenzivne aktivnosti

Antihipertenzivna aktivnost uzoraka praćena je određivanjem ACE inhibitorne sposobnosti uzorka, prema modifikovanoj metodi Yoshie-Stark i sar. (2004). Osnovni princip metode je praćenje razgradnje hipuril-L-histidil-leucina (HHL) u prisustvu ACE na  $37^\circ\text{C}$  tokom 80 min. Kvantifikacija produkta reakcije hipurne kiseline (HA) merena je na  $\lambda=228$  nm. HHL (37,51 mM) je pripreman u 0,2M fosfatnom puferu pH 8,3 koji sadrži 300 mM NaCl. Enzim je pripreman rastvaranjem u smeši glicerola i metanola (50:50) tako da je aktivnost ACE 375 mU/mL. Koncentracije HHL i ACE u testu su 10 mM i 25 mU/ml. Test se izvodi tako što se 60  $\mu\text{L}$  uzorka čija se aktivnost određuje pomeša sa 80  $\mu\text{L}$  HHL i inkubira na  $37^\circ\text{C}$ . Dobijeni produkt reakcije predstavlja probu B. Pored toga, na isti način se priprema proba A, u koju se umesto uzorka dodaje pufer. Potom se u obe probe dodaje po 10  $\mu\text{L}$  rastvora enzima koji započinje reakciju. Nakon 80 min reakcija se prekida dodavanjem 110  $\mu\text{L}$  1M HCl. Za obe probe pripremane su i slepe probe ( $A_{sp}$  i  $B_{sp}$ ), u kojima je obrnut redosled dodavanja rastvora HCl i ACE.

Produkt reakcije se kvantifikuje tečnom hromatografijom visoke rezolucije (engl. *High Performance Liquid Chromatography - HPLC*). Uslovi rada na 1100 Agilent HPLC sistemu su: razdvajanje na kolono Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6\*150 mm, 5  $\mu\text{m}$ , 80 Å; Agilent

Technology, Santa Clara, CA, USA), protok 1 mL/min, temperatura 23 °C, zapremina injektovanja 20 µL, UV detekcija na 228 nm. Mobilna faza je 50 % (v/v) metanol sa 1 % trifluorsirćetne kiseline (v/v) u destilovanoj vodi. Pre svakog injektovanja uzorci su profiltrirani kroz membranske filtre veličine pora 0,45 µm (LLG Labware, Lakeville, MA). Procenat inhibicije uzorka izračunava se prema jednačini (3.13.):

$$ACE \text{ inhibicija (\%)} = \left( \frac{(A - A_{sp}) - (B - B_{sp})}{(A - A_{sp})} \right) * 100 \quad (3.13.)$$

Gde su: A apsorbancia probe sa ACE, bez prisustva inhibitorne supstance,  $A_{sp}$  apsorbancia slepe probe probe A, B apsorbancia u probi sa ACE i inhibitornom supstancom i  $B_{sp}$  apsorbancia u slepoj probi probe B.

#### 4.2.6.5. Antidijabetska aktivnost

Antidijabetska aktivnost uzorka merena je na principu određivanja inhibitorne sposobnosti enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Metoda za merenje rađena je prema metodi koju su opisali *Chan i sar.* (2010). U otvorima mikrotitar ploča meša se 100 µL 7,2 mM supstrata 4-nitrofenil  $\alpha$ -D-glukopiranozid i 20 µL uzorka potencijalnog inhibitora. Potom se dodaje 100 µL enzima  $\alpha$ -glukozidaze koji započinje reakciju u trajanju 10 min na 37 °C. Na kraju reakcije meri se apsorbancia 4-nitrofenola oslobođenog iz 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopiranozida na 405 nm. Apsorbancia se meri pre i nakon inkubacije od 10 min. Procenat inhibicije izračunava se prema jednačini (3.14.):

$$\% \text{ inhibicije} = ((\Delta A_k - \Delta A_{uz}) / \Delta A_k) * 100 \quad (3.14.)$$

Gde su:  $\Delta A_k$  i  $\Delta A_{uz}$  razlike apsorbanci reakcione smeše kontrole i sa uzorkom pre dejstva enzima i nakon 10 minuta inkubacije sa enzimom.

#### 4.2.7. Matematička analiza rezultata

Eksperimenti su izvedeni u određenom broju ponavljanja (tri i više), a rezultati su izraženi kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija. Statistička značajnost između aritmetičkih sredina sprovedena je primenom analize varijanse (eng. ANOVA) i Tukey HSD (eng. Honest Significant Difference) testa višestrukih poređenja sa pragom značajnosti 0,05. Rezultati su

obrađeni statistički uz pomoć softverskog paketa STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

#### 4.2.7.1. Analiza glavnih komponenta

Analiza glavnih komponenti (eng. *principal component analysis*, PCA) sprovedena je uz pomoć matematičkog postupka koji vrši ortogonalnu transformaciju eventualno korelisanih podataka u skup linearno nekorelisanih promenljivih koje se nazivaju glavne komponente. Rezultati PCA analize se obično tumače na osnovu doprinosa (engl. *score*) promenljivih u komponentama. PCA je najzastupljenija multivarijaciona analiza koja otkriva međusobni odnos podataka na način koji najbolje objašnjava njihovu varijansu (Otto, 1990: Kaiser i Rice, 1974).

#### 4.2.7.2. Kinetički modeli procesa

Kinetički modeli procesa urađeni su po modelu Tessier-a (Velázquez-Martí i sar., 2018), prema jednačini (3.15.):

$$y(t) = y_0 + A_1 * \exp(-\frac{t}{t_1}) \quad (3.15.)$$

Gde su:  $y_0$  – početne vrednosti praćenih,  $y_0 + A_1$  - maksimalna vrednost parametra,  $t_1$  - koeficijent brzine promene vrednosti parametra.

Konstante neophodne za evaluaciju kinetike procesa, su izračunate nelinearnom regresionom metodom koristeći tzv. Solver funkciju u okviru programskog paketa Microsoft Excel 2019.

Tačnost modela tj. numerička verifikacije razvijenog modela je testirana upotrebom statističkih indikatora, kao što su koeficijent determinacije koje obuhvataju koeficijenta determinacije ( $r^2$ ), redukovano  $\chi^2$  (redukovanog hi-kvadrata ( $\chi^2$ ), srednje greške odstupanja (MBE), koren kvadrata srednje greške (RMSE) i srednje procentualne greške (MPE) (Pavlić i sar., 2020). Ovi parametri se mogu izračunati korišćenjem jednačina (3.16., 3.17.), gde  $x_{exp,i}$  predstavlja eksperimentalne vrednosti, a  $x_{pre,i}$  su predviđene vrednosti dobijene iz modela.  $N$  i  $n$  su brojevi posmatranja, odnosno konstante.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_{exp,i} - x_{pre,i})^2}{N-n}, RMSE = \left[ \frac{1}{N} * \sum_{i=1}^N (x_{pre,i} - x_{exp,i})^2 \right]^{1/2} \quad (3.16.)$$

$$MBE = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{pre,i} - x_{exp,i}), MPE = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|x_{pre,i} - x_{exp,i}|}{x_{exp,i}} \quad (3.17.)$$

## **5. *Rezultati i diskusija***

## **5.1. Proteini kao funkcionalni agens i izvor biološki aktivnih jedinjenja**

*U ovoj celini doktorske disertacije su opisani i okarakterisani proteinski izolati dobijeni alkalnom ekstrakcijom iz uljanih pogača koje zaostaju nakon postupka hladnog ceđenja ulja iz semena. Osim toga, izolacija proteina rađena je i iz uljanih pogača koje zaostaju nakon ceđenja ulja superkričnom ekstrakcijom. Prikazan je hemijski sastav uljanih pogača i proteinski i aminokiselinski sastav proteinskih izolata. Dobijeni proteinski izolati karakterisani su ispitivanjem funkcionalnih osobina. Takođe, ispitana je konjugacija proteinskog izolata sa polifenolima kao način unapređenja pojedinih funkcionalnih osobina. Dobijenim izolatima i konjugatima ispitana je i svarljivost radi mogućnosti njihove primene u prehrambenim sistemima s obzirom na potvrđene unapređene funkcionalne osobine. Ispitana je biološka aktivnost dobijenih hidrolizata in vitro digestijom proteinskih izolata kajsije i šljive. Po uzoru na prethodna istraživanja, za hidrolizate proteina tikve ispitane su antioksidativne i antihipertenzivne osobine proteinskih izolata kajsije i šljive nakon in vitro digestije. Osim toga, ispitane su antidijabetske aktivnosti proteinskih izolata kao i njihovih hidrolizata. U drugoj podcelini, ispitana je dostupnost fenolnih komponenti i antioksidativna aktivnost konjugata nakon in vitro digestije.*

### **5.1.1. Izolovanje i karakterizacija proteinskih izolata**

Uljana pogača je nusproizvod ekstrakcije ulja iz semena uljarica ili voća koja su bogata uljima koja se primenjuju u ishrani ljudi. Zaostale uljane pogače najčešće se koriste u ishrani životinja jer nutritivno predstavljaju dobar izvor hranjivih komponenti kao što su proteini i masti, a predstavljaju jeftin i pristupačan izvor hrane. S obzirom da su uljane pogače bogate proteinima, imaju veliki potencijal kao sirovina za izolovanje i dobijanje čistih proteinskih izolata koji mogu da pronađu primenu u mnogim proizvodima.

#### **5.1.1.1. Hemijski sastav uljanih pogača i parametri bezbednosti dobijenih izolata**

Pre samog procesa izolovanja proteina neophodno je ispitati bezbednost i hemijski sastav uljane pogače kao sirovine za izolovanje visokovrednih proteinskih proizvoda. U okviru ove disertacije, definisanje uljane pogače kao sirovine za izolovanje proteina izvršeno je u dva koraka.

Prvi korak je bio da se ispita hemijski sastav uljanih pogača zaostalih nakon postupka hladnog ceđenja ulja (eng. *cold pressing*, CP). Ovakav način dobijanja ulja je najstariji postupak ekstrakcije ulja iz semena koji se koristi u komercijalne svrhe. Njihova valorizacija ima ekološki doprinos jer predstavljaju veliki nusproizvod industrije ulja. Za tu svrhu izabrane

su tri uljane pogače, zaostale nakon postupka hladnog ceđenja ulja iz semena kajsije, šljive i tikve. Hemijski sastav ovih uljanih pogača prikazan je u Tabeli 4.

Koštice kajsije i šljive sadrže seme sa visokim sadržajem proteina i lipida (*Garcia i sar. 2016*). Ekstrakcijom ulja iz semena šljive i kajsije zaostaju uljane pogače koje imaju veliki sadržaj proteina sa oko 40% za kajsiju i oko 50% za šljivu. U odnosu na voće, uljana pogača tikve ima veći sadržaj proteina sa preko 60% (*Peričin i sar., 2007*). Ovakav rezultat ukazuje na potencijal uljanih pogača, koje zaostaju nakon ekstrakcije ulja iz semena kao sirovina za izolovanje proteina. Osim proteina u uljanim pogačama ispitan je i sadržaj vlakna, šećera i masti. Sadržaj vlakana u uljanim pogačama je 8% za kajsiju, 6% za šljivu i 5% za tikvu. Najveći sadržaj masti je kod pogače kajsije (22%), dok je sadržaj masti kod tikve i šljive približno isti (9%). U pogledu sadržaja šećera, veliki udeo čine redukujući šećeri sa oko 6% za kajsiju i 11% za šljivu.

Tabela 4. Hemijski sastav uljanih pogača kajsije, šljive i tikve dobijenih nakon dva postupka ekstrakcije ulja, sadržaj proteina i amigdalina u proteinskim izolatima

	KAJSIJA		ŠLJIVA		TIKVA
	CP	SFE	CP	SFE	CP
<i>Uljane pogače nakon ekstrakcije ulja</i>					
Vlaga (%)	8,90 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,25 ± 0,03 <sup>a</sup>	10,80 ± 0,10 <sup>b</sup>	6,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,02
Vlakna (%)	8,94 ± 0,40 <sup>b</sup>	8,06 ± 0,19 <sup>a</sup>	5,86 ± 0,40 <sup>a</sup>	11,57 ± 0,19 <sup>b</sup>	5,11 ± 0,04
Masti (%)	22,04 ± 0,23 <sup>b</sup>	6,37 ± 0,54 <sup>a</sup>	9,93 ± 0,23 <sup>a</sup>	10,51 ± 0,54 <sup>b</sup>	8,37 ± 0,13
Ukupni šećeri (%)	15,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	23,23 ± 0,06 <sup>b</sup>	12,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	12,59 ± 0,06 <sup>a</sup>	20,33 ± 0,17
Redukujući šećeri (%)	6,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	6,72 ± 0,02 <sup>b</sup>	10,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	10,90 ± 0,02 <sup>a</sup>	-
Protein (%)	42,31 ± 0,53 <sup>a</sup>	43,43 ± 0,80 <sup>a</sup>	50,69 ± 0,53 <sup>b</sup>	48,94 ± 0,80 <sup>a</sup>	61,02 ± 0,35
<i>Proteinski izolati</i>					
Protein (%)	83,94 ± 0,71 <sup>b</sup>	70,68 ± 0,18 <sup>a</sup>	97,94 ± 0,71 <sup>a</sup>	99,15 ± 0,18 <sup>b</sup>	94,44 ± 0,04
Amigdalini (mg/g PI)	0,0046 ± 0,0002	<LOD	0,027 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,020 ± 0,001 <sup>a</sup>	<LOD

\*LOD- ispod granice detekcije. Vrednosti u istom redu za iste vrste sirovina, a različitih pogača sa različitim slovima statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Drugi korak u iskorišćenju uljanih pogača kao sirovine za izolovanje proteina bio je ispitivanje uticaja različitih procesa ekstrakcije ulja iz semena na kvalitet sirovine kao izvora proteina. Nutritivna vrednost i hemijski sastav uljanih pogača zavisi od vrste i načina prerade tj. ekstrakcije ulja iz semena. U cilju dobijanja što većeg prinosa ulja prilikom ekstrahovanja iz semena kajsije i šljive, primenjena je ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. *supercritical*



*fluid extraction*, SFE). Stoga, poređene su pogače zaostale nakon SFE ekstrakcije ulja iz semena kajsije i šljive sa CP pogačama, čije vrednosti su takođe prikazane u Tabeli 4.

Iz Tabele 4 se uočava da postoje pojedine razlike u hemijskom sastavu pogača, ali ove vrste pogača odlikuje značajan udeo proteina. Na osnovu rezultata iz Tabele 4 vidi se da je udeo proteina u ovim SFE pogačama podjednak u poređenju sa CP pogačama. Kod SFE pogače kajsije značajno je manji sadržaj vlage i masti dok je udeo šećera posledično mnogo veći u odnosu na CP pogaču. SFE pogača šljive ima značajno manji sadržaj vlage, a veći sadržaj vlakana u odnosu na CP pogaču.



Slika 11. Proteinski izolati dobijeni alkalnom ekstrakcijom iz uljanih pogača nakon hladnog ceđenja ulja: (1) proteinski izolat kajsije; (2) proteinski izolat šljive; (3) proteinski izolat tikve

Proteinski izolati (PI) su praškasti proizvodi sa velikim sadržajem proteina izolovanih iz uljanih pogača semena kajsije, šljive i tikve (Slika 11). Prema sadržaju proteina (Tabela 4) u dobijenim izolatima, 84% za PI kajsije, 98% za PI šljive i 95% za PI tikve, može se zaključiti da se dobijaju čisti, visoko koncentrovani proteinski proizvodi. U slučaju SFE pogača, PI kajsije ima manji sadržaj proteina 71% u odnosu na CP, dok je PI šljive istog proteinskog sadržaja 99% kao i za CP pogaču. Međutim, ograničenje za eksploataciju uljanih pogača kao izvora proteina jeste prisustvo cijanogenog glikozida, amigdalina. Sam amigdalin nije toksičan ali dejstvom enzima digestivnog trakta u organizmu dolazi do hidrolize amigdalina. Njegovom hidrolizom nastaje glukoza, benzaldehid koji daje gorčinu hrani i cijanovodonična kiselina koja je toksična u prekomernim količinama i može dovesti do trovanja (*Garcia i sar. 2016*). Veći sadržaj amigdalina imaju koštice šljive, kajsije, jabuke, breskve, nektarina, bademi, a u nešto nižem sadržaju je u malinama, jagodama, heljdi. itd. Dozvoljeno prisustvo amigdalina u pojedinim namirnicama regulisano je pravilnicima. Maksimalna dozvoljena količina cijanida u hrani i pićima koja se dobijaju preradom ovih proizvoda na osnovu Evropske agencije za bezbednost hrane (*EFSA*) iznosi 50 mg/kg u nugatu, marcipanu ili sličnim proizvodima, 5 mg/kg u konzervisanom voću i 35 mg/kg u alkoholnim pićima. Velika količina amigdalina u

košticama kajsije i šljive zahteva detekciju prisutnog amigdalina u izolovanim proteinima. Rezultati prikazani u Tabeli 4 pokazuju da je amigdalin detektovan u izolatima daleko ispod propisom dozvoljene količine, dok u PI kajsije dobijenom iz SFE pogače nije detektovan prisutan amigdalin. Takođe, prisustvo amigdalina nije detektovano u PI tikve jer se i ne očekuje.

Iz prethodnih rezultata, može se zaključiti da uljana pogača, bez obzira na način dobijanja predstavlja dobar izvor za proizvodnju proteinskih izolata, a samim tim mogla bi biti izvor proizvoda kao što su brašna ili koncentрати. Takođe, dobijeni izolati mogu se smatrati bezbednim po pitanju sadržaja amigdalina za primenu u različitim proteinskim formulacijama hrane.

#### 5.1.1.2. Aminokiselinski sastav proteinskih izolata

Nutritivni kvalitet proteina definisan je sadržajem esencijalnih aminokiselina, čija je količina neophodna da zadovolji potrebe u ljudskom telu preporučena odgovarajućim vodičima (*WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007*). Esencijalne aminokiseline su kiseline koje su neophodne za rast i razvoj organizma ali koje se ne mogu sintetisati u ljudskom organizmu već se moraju unositi isključivo putem ishrane (*Đuragić i sar., 2020*). Unos ovih kiselina putem hrane nadoknađuje telesni gubitak azota i održavanje proteinske mase, pruža strukturnu i funkcionalnu osnovu za održavanje i rast organizma. Na primer, lizin (Lys) je neophodan za telesnu ravnotežu azota, jačanje kostiju, sintezu krvi i mišića i održavanje aktivnosti jetre; metionin (Met) i cistein (Cis) su sumporne aminokiseline koje imaju važnu ulogu u funkcionisanju i održavanju imunog sistema (*Grimble, 2006*), zaštite u mišićima i kardiovaskularnom i nervnom sistemu (*Reeds, 2000*); valin (Val) pomaže u motoričkoj koordinaciji; izoleucin (Ile) i leucin (Leu) su gradivni blokovi prisutni u većini proteina (*Nenova i Drumeva, 2012*); glutamin (Gln) i aspartat (Asp) su značajni u imunološkoj stimulaciji, odnosno u hormonskoj regulaciji (*Lopez i sar., 2018*).

Aminokiselinski sastav proteinskih izolata kajsije, šljive i tikve dobijenih iz CP uljanih pogača prikazan je u Tabeli 5. Vrednosti su izražene kao g prisutne aminokiseline na 100 g PI. Ukupan sadržaj aminokiselina u dobijenim izolatima je 34,23% za kajsiju, 36,34% za šljivu i 34,80% za tikvu. Najveći sadržaj esencijalnih aminokiselina ima PI šljive 13,22%, potom sledi PI tikve sa 12,93% i PI kajsije sa 12,48%. Od esencijalnih aminokiselina u najvećem sadržaju su prisutni Leu i Ile u sva tri PI sa oko 2%. U najmanjem sadržaju prisutan je Met sa oko 0,5%.

Pored ovih u sva tri PI detektovano je još pet esencijalnih aminokiselina, od kojih su Val, Phe, His, Thr i Lys sa sadržajem od 1,5 do 1,9%. Sadržaj neesencijalnih aminokiselina u PI je 21,75% za kajsiju, 23,12% za šljivu i 21,87% za tikvu. U najvećem procentu prisutni su Gln i Arg sa oko 4 - 5%, dok je u najmanjem procentu prisutan Gly sa oko 1,4%.

Tabela 5: Aminokiselinski sastav u proteinskim izolatima

<i>g/100 g PI</i>	<i>PI kajsije</i>	<i>PI šljive</i>	<i>PI tikve</i>
<b><i>Esencijalne aminokiseline</i></b>	<b>12,48</b>	<b>13,22</b>	<b>12,93</b>
Izoleucin (Ile)	2,10	2,10	2,03
Leucin (Leu)	2,21	2,34	2,12
Valin (Val)	1,83	1,91	1,75
Fenilalanin (Phe)	1,26	1,98	1,66
Histidin (His)	1,77	1,82	1,72
Metionin (Met)	0,51	0,35	0,56
Treonin (Thr)	1,36	1,36	1,41
Lizin (Lys)	1,44	1,36	1,68
Triptofan (Trp)	no	no	no
<b><i>Neesencijalne aminokiseline</i></b>	<b>21,75</b>	<b>23,12</b>	<b>21,87</b>
Aspartat (Asp)	2,86	3,10	2,66
Serin (Ser)	1,39	1,45	1,47
Glutamin (Gln)	4,25	4,74	3,93
Prolin (Pro)	3,64	3,99	3,64
Glicin (Gly)	1,40	1,48	1,35
Alanin (Ala)	1,50	1,59	1,41
Cistein (Cys)	no	no	no
Tirozin (Tyr)	2,57	2,54	2,67
Arginin (Arg)	4,14	4,25	4,73
<b><i>Ukupne aminokiseline</i></b>	<b>34,23</b>	<b>36,34</b>	<b>34,80</b>

\*no- nije određivano

U poređenju sa proteinima životinjskog porekla glavno ograničenje biljnih proteina za upotrebu u prehrambenoj industriji je neuravnoteženi sastav esencijalnih aminokiselina (Fathollahy i sar., 2021). Prema opisanim rezultatima možemo reći da dobijeni PI mogu da posluže kao proteinski dodaci za ljudsku ishranu jer prema WHO/FAO/UNU Expert Consultation 2007 imaju zadovoljavajući aminokiselinski sastav. S obzirom, da se ovi PI dobijaju iz materijala koji predstavlja nusproizvod i nutritivno slabiji materijal u odnosu na čisto seme, možemo reći da predstavljaju dobar alternativni izvor za produkciju prehrambenih proizvoda sa uravnoteženim aminokiselinskim sastavom.

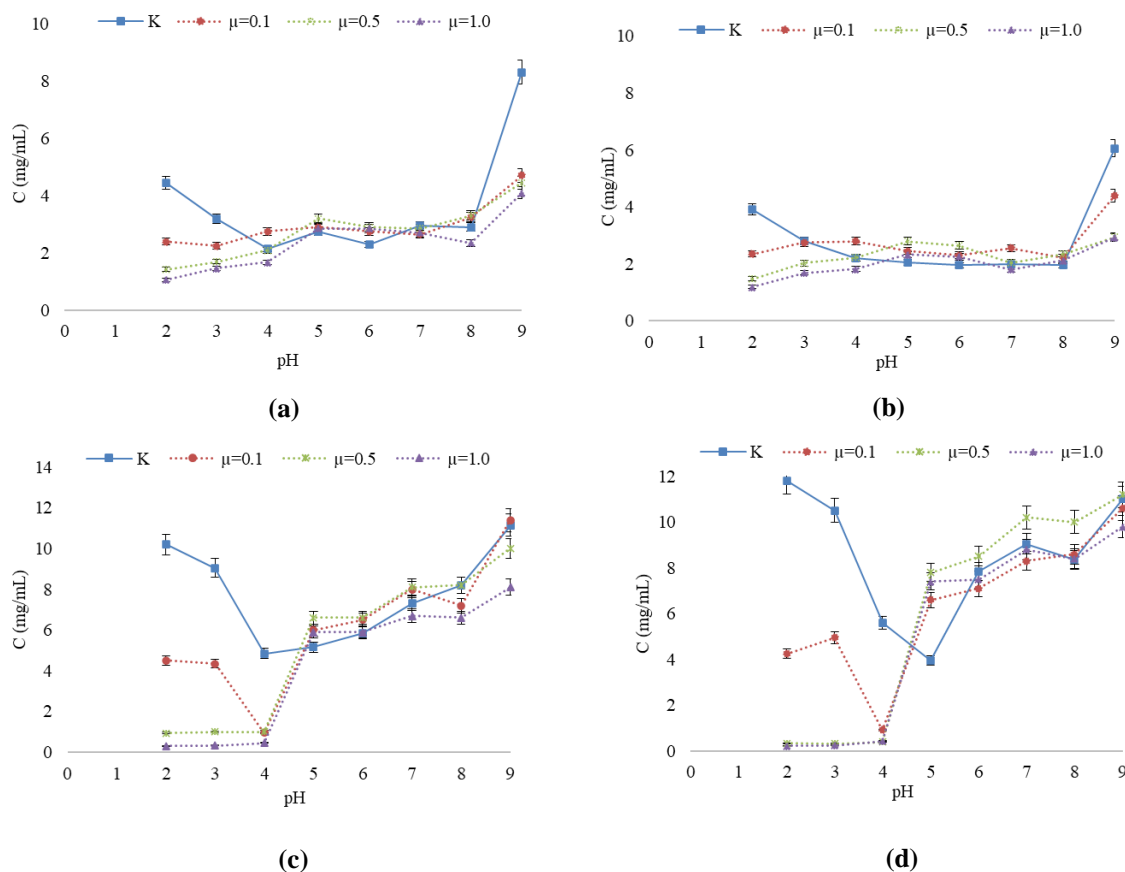
### **5.1.2. Karakterizacija proteinskih izolata- Funkcionalne osobine**

Funkcionalne osobine proteina utiču na njihovo ponašanje u različitim sistemima (prehrambenim ili kozmetičkim), tokom skladištenja, pripreme, konzumiranja, bilo samostalno ili u nekom sistemu. Iz tih razloga, u ovoj disertaciji ispitane su funkcionalne osobine dobijenih proteinskih izolata zbog tumačenja njihovog ponašanja u različitim aspektima primene. Ispitane su funkcionalne osobine proteinskih izolata dobijenih iz različitih uljanih pogača (CP i SFE), kao što su rastvorljivost, emulzione osobine, sposobnost formiranja pene, kapacitet vezivanja vode i ulja.

#### **5.1.2.1. Rastvorljivost**

Kao što je ranije napomenuto, rastvorljivost je jedna od najvažnijih karakteristika proteina koja utiče na ostale funkcionalne osobine kao što su emulzione osobine i sposobnost formiranja pene (Roodsamran i Sothornvit, 2018). pH profili rastvorljivosti za PI kajsijske i šljive pri različitoj jonskoj jačini rastvarača prikazani su na Slici 12, dok je pH profil rastvorljivosti PI tikve prethodno opisan u literaturi (Bučko, 2020).

Rastvorljivost PI ispitivana je na različitim vrednostima pH (K) i pri različitoj jonskoj jačini ( $\mu$ ).



Slika 12: pH profil rastvorljivosti proteinskih izolata pri različitoj jonskoj jačini ( $\mu$ ): (a) PICP kajsije; (b) PISFE kajsije; (c) PICP šljive; (d) PISFE šljive

Sa Slike 12 uočavamo da se profil rastvorljivosti za PI kajsije i šljive potpuno međusobno razlikuju, da svaki PI ima drugačije ponašanje. Slika 12a prikazuje profil rastvorljivosti PI kajsije iz CP uljane pogače. Najniža rastvorljivost PI je pri pH 4 sa 2,2 mg/mL, dok je najveća rastvorljivost postignuta u ekstremnim alkalnim uslovima pri pH 9 sa 8,3 mg/mL. Poređenjem sa PI kajsije iz SFE pogače (Slika 12b), uočavamo da PI iz SFE pogače ima isto ponašanje ali sa još nižim vrednostima rastvorljivosti, njegova najveća vrednost rastvorljivosti ide do 6,1 mg/mL. Ovako niske koncentracije proteina pri rastvorljivosti PI iz SFE pogače mogu biti posledica malog sadržaja proteina u samom izolatu, što znači da proces izolovanja ulja iz semena može uticati na ponašanje PI dobijenog iz uljane pogače. Prema ovim rezultatima vidi se da je izoelektrična tačka PI kajsije u širokom opsegu pH (3-8), jer tek na pH 2 i pH 9 dolazi do porasta rastvorljivosti. Različita jonska jačina utiče na rastvorljivost proteina, što je naročito izraženo na ekstremnim kiselim i alkalnim pH vrednostima. Pri pH 2 i pH 9 u slučaju oba PI kajsije dolazi do smanjenja rastvorljivosti proteina sa povećanjem jonske jačine soli. Ovakav fenomen naziva se izoljavanje (eng. *salting out*) i javlja se kod velikih biomolekula kao što su proteini. Slično ponašanje pokazuju i proteini lišća sa velikom rastvorljivošću u alkalnim

sredinama i širim opsegom izoelektrične tačke tj. niskom rastvorljivošću u kiseloj sredini (Sedlar i sar., 2020).

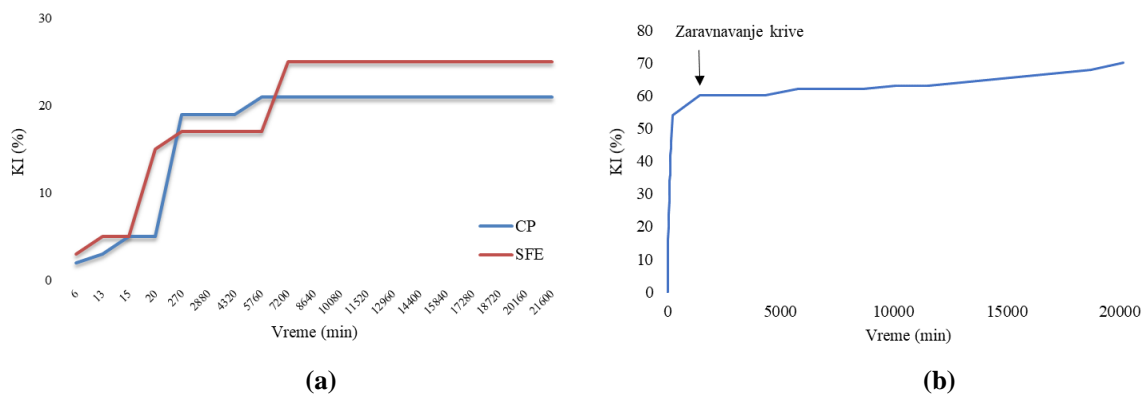
pH profil rastvorljivosti PI šljive (Slika 12c, 12d) potpuno se razlikuju u odnosu na prethodno opisane pH profile rastvorljivosti PI kajsije (Slika 12a, 12b). PI šljive imaju krivu rastvorljivosti sa karakterističnim U-oblikom. Najniža rastvorljivost PI iz CP pogače (Slika 12c) je pri pH 4 sa 4,85 mg/mL, dok je najveća rastvorljivost postignuta u ekstremnim alkalnim uslovima pri pH 9 sa 11,15 mg/mL. PI izolovan iz SFE pogače ima još izraženiji U-oblik krive (Slika 12d) i pomerenu izoelektričnu tačku na pH 5, sa najnižom rastvorljivošću sa 3,95 mg/mL. Jonska jačina prisutne soli utiče na rastvorljivost PI, tako što u ekstremnim kiselim pH vrednostima uzrokuje smanjenje rastvorljivost sa povećanjem jonske jačine, dok u alkalnim sredinama uzrokuje istu ili blago povećanju rastvorljivost. Na osnovu prethodnih rezultata i literature, može se zaključiti da PI šljive ima slično ponašanje kao PI tikve. Prema literaturi, PI tikve ima izraženu krivu rastvorljivosti U-oblika sa izoelektričnom tačkom na pH 5 i velikom rastvorljivošću u ekstremnim kiselim i baznim sredinama (Bučko, 2020).

#### 5.1.2.2. Emulzione osobine

Emulzione osobine PI kajsije ispitane su za obe vrste pogača (CP i SFE), dok su za PI šljive ispitane za izolat dobijen iz CP pogače. U slučaju kajsije, izolati su ispitani na sposobnost formiranja emulzije sa ciljem poređenja kako različit sadržaj proteina u izolatu utiče na stvaranje emulzije. Emulziona svojstva su ispitana veličinom kapljica emulzije i praćenjem kriming indeksa (KI).

Kriming indeks emulzija sa PI kajsije prikazan je na Slici 13a. Povećanjem KI tokom vremena ukazuje da dolazi do raslojavanja emulzije na dva dela: krem- bogat kapljicama ulja i serum- bogat kontinualnom fazom (Bučko, 2020). Formiranje platoa već nakon 20 min stajanja emulzije ukazuje da nema daljeg razdvajanja emulzija koje može da potiče od gravitacione nestabilnosti usled prisustva velikih kapljica, i konstantno je do kraja perioda skladištenja. Izolat iz CP pogače pokazuje brže razdvajanje emulzije sa brzim rastom KI od 19% nakon 4 h stajanja, ali sa konačnom vrednosti KI od 21% tokom 14 dana skladištenja. U slučaju izolata iz SFE pogače razdvajanje ide sporije u odnosu na CP izolat, ali je tokom skladištenja došlo do izrazitijeg razdvajanja faza (KI = 25%). Srednji prečnik kapljica emulzije je  $3,29 \pm 0,1 \mu\text{m}$  za CP i  $3,38 \pm 0,4 \mu\text{m}$  za SFE. Ovako male kapljice poboljšavaju stabilnost emulzije jer tokom skladištenja nije došlo do izdvajanja kapljica ulja što govori u prilog dobrim

emulgirajućim osobinama PI kajsije. Takođe, zaključeno je da oba PI bez obzira na vrstu uljane pogače pokazuju dobra emulgirajuća svojstva i mogu da se koriste kao prirodni emulgatori u pripremi emulzija u prehrambenim ili kozmetičkim proizvodima.



Slika 13: Kriming indeks emulzija stabilizovanih rastvorom proteinskog izolata: (a) kajsije; (b) šljive

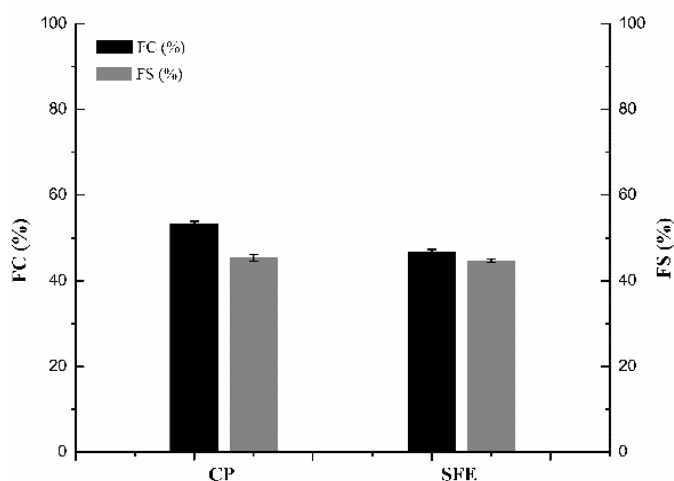
Emulgirajuće osobine PI šljive ispitane su pripremanjem 15% emulzije ulje u vodenoj fazi (rastvoru proteina) i praćenjem KI tokom vremenskog perioda skladištenja emulzije. Slika 13b prikazuje KI emulzije sa PI šljive tokom 14 dana skladištenja. Kriva pokazuje da do potpunog zaravnavanja dolazi nakon 24 h, koje je do kraja skladištenja konstantno (KI = 60%). Kao i u prethodno opisanim emulzijama (Slika 13a) razdvajanje emulzije na krem i serum dolazi posle 20 minuta stajanja od momenta pripremanja emulzije. Tokom skladištenja emulzija nije došlo do potpunog izdvajanja kapljica ulja, što ukazuje na potencijal PI šljive kao dobrog emulgatora u pripremi emulzija. Slično ponašanje pokazano je i za PI tikve koji pri pH 8 pokazuje stabilnost emulzije sa KI od 50% nakon 20 min stajanja emulzije (Bučko, 2020).

### 5.1.2.3. Sposobnost formiranja pene

Sposobnost proteina za formiranjem pene je slično svojstvu proteina da stvara emulzije. Formiranje pene je osobina koja zavisi od strukture proteina ali i njihove rastvorljivosti, jer odmotavanje molekula proteina na međufaznoj površini, prisustvo naelektrisanja i polarnih grupa omogućava stabilizaciju mehura tj. gasne faze. Osobine formiranja pene su ispitane merenjem kapaciteta pene (FC) i stabilnost pene (FS). Ovi parametri ispitani su za PI kajsije (za CP i SFE pogaču), i prikazani na Slici 14.

Prema literaturi, osobine formiranja pene proteinskih izolata zavise od postupka obrade izolata i sadržaja proteina (*Fidantsi i Doxastakis, 2001*). Na osnovu rezultata sa Slike 14, ustanovljeno je da postoji korelacija sadržaja proteina sa vrednostima FC. Izolat sa većim sadržajem proteina PICP (84%) ima vrednost FC od 53%, u odnosu na PISFE (71%) čija je vrednost FC 47%. Postignuta veća vrednost FC za PICP očekivana je zbog veće rastvorljivosti PI na vrednosti pH 10 na kojoj je i formirana pena. Vrednosti FS za oba izolata su identične i dostižu vrednost od 45%.

Dobijene vrednosti za oba PI kajsije mogu da se uporede sa literaturnim podacima za PI kokosa, čije vrednosti FC iznose u opsegu od 20 do 80%, a za FS dostižu vrednost od oko 39 do 80% (*Ma i sar., 2018*). Takođe, *Sharma i sar. (2010)* opisuju PI kajsije kao dobar agens u formiranju pene sa vrednosti FC od 21% čija stabilnost traje i do 3 h.



Slika 14: Kapacitet i stabilnost pene proteinskih izolata kajsije

#### 5.1.2.4. Kapacitet vezivanja vode i ulja

Vezivanje vode i ulja su svojstva proizvoda koja utiču na strukturu i karakteristike hrane i prehrambenih proizvoda u ustima. Sposobnost zadržavanja vode je svojstvo proteina izraženo u viskoznoj hrani, kao što su supe, testo, kreme, dok zadržavanjem ulja i masti proteini obezbeđuju zadržavanje ukusa finalnog proizvoda. U ovom radu, ispitana je i međusobno poređena sposobnost zadržavanja vode i ulja za PI kajsije dobijen iz CP i SFE pogača (Tabela 6).



Tabela 6: Kapacitet vezivanja ulja i vode proteinskih izolata kajsije

	<i>CP</i>	<i>SFE</i>
<b>Vezivanje vode (g vode/g PI)</b>	0,53 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,03 <sup>b</sup>
<b>Vezivanje ulja (g ulja/g PI)</b>	0,67 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,05 <sup>b</sup>

Vrednosti u istom redu za različite vrste sirovina statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Na osnovu rezultata u Tabeli 6 vidimo da postoje značajne razlike u sposobnosti zadržavanja vode i ulja između dva PI. Može se zaključiti da ne postoji korelacija između sadržaja proteina u PI i vrednostima vezivanja ulja i vode. Pogača zaostala nakon SFE ekstrakcije ulja daje PI koji ima veću sposobnost u zadržavanju ulja i vode u odnosu na PI izolovan iz CP pogače. Naročito je izraženo vezivanje ulja sa vrednosti od 0,91 g/g PI. Dobijene vrednosti su manje u odnosu na literaturne vrednosti za različite PI: kajsije koje iznose 1,4 g/g PI (Sharma i sar., 2010), čija semena čiji opseg vezivanja ulja i vode iznosi od 2,1 do 3,6 g/g PI (Timilsena i sar., 2016), kokosa čiji opseg vezivanja ulja i vode iznosi od 1,4 do 4,7 g/g PI (Ma i sar., 2018). Prema rezultatima, može se zaključiti da PI kajsije nemaju značajno izražen kapacitet vezivanja vode i ulja, u odnosu na druge pomenute PI.

### 5.1.3. Unapređenje funkcionalnih osobina proteinskog izolata

Funkcionalne osobine proteina mogu da se unaprede fizičkim, hemijskim i enzimskim modifikacijama. Iz literature je poznato da vezivanje proteina sa polifenolima poboljšava funkcionalne osobine kao što su rastvorljivost, emulziona svojstva i sposobnost formiranja pene (Quan i sar., 2019). Osim toga, u konjugatima koja se tom prilikom formiraju dolazi do strukturnih promena koje ukazuju da je došlo do formiranja veze sa polifenolima i oni ispoljavaju drugačije ponašanje u odnosu na nativni protein (Yan i sar., 2021).

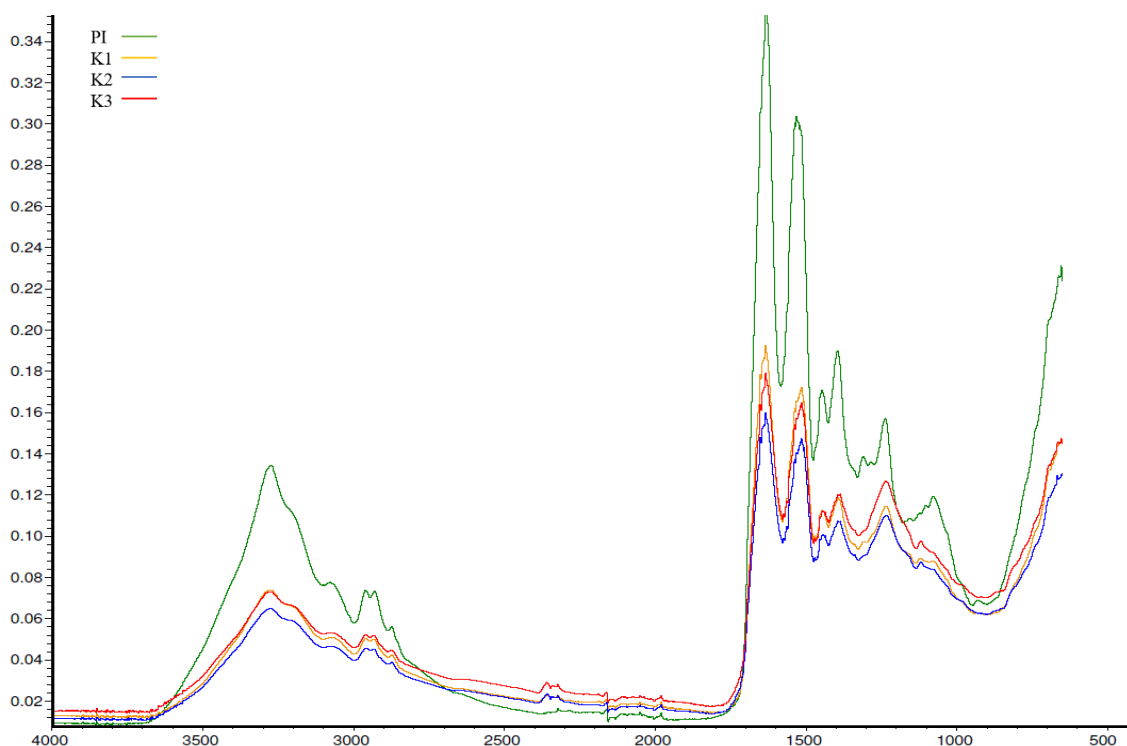
U ovom radu, ispitan je uticaj konjugacije tj. vezivanje proteina sa jednim polifenolnim jedinjenjem u cilju poboljšanja funkcionalnih osobina PI šljive iz CP uljane pogače. Odabrana je kafena kiselina (KK), kao jedna od najjačih antioksidativnih jedinjenja, koja je dodavana u tri različite koncentracije. Dobijenim konjugatima okarakterisane su strukturne promene koje su nastale tokom konjugacije. Za te svrhe su korišćene FTIR i fluorescentna spektroskopija,

SEM mikroskopija, elektroforeza i gel hromatografija. Od funkcionalnih osobina ispitane su rastvorljivost, emulzione osobine i stvaranje pena.

### 5.1.3.1. Karakterizacija konjugata

#### *FTIR spektroskopija*

Sekundarna struktura proteina i promene koje nastaju usled njegove interakcije sa KK ispitane su FTIR spektroskopijom. Spektri osušenih uzoraka prikazani su na Slici 15, u spektralnom opsegu 500 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ .



Slika 15. FTIR spektri proteinskog izolata (PI) šljive i konjugata proteinskog izolata šljive i kafene kiseline u tri različite koncentracije (K1, K2, K3)

Spektar PI pokazuje apsorbciju na talasnim dužinama koje odgovaraju karakterističnim strukturama za protein. Intenzivne apsorbcije uočene su na: 3300  $\text{cm}^{-1}$  koja je deo Amid A strukture (odgovara N-H istezanju i vodoničnim vezama), 1650  $\text{cm}^{-1}$  koja je deo Amid I strukture (predstavlja C=O istezanje, vodoničnu vezu i COO-), 1550  $\text{cm}^{-1}$  koja je deo Amid II strukture (amid II koji predstavlja C-N istezanje i N-H savijanje) i 1230  $\text{cm}^{-1}$  (amid III koji

predstavlja istežanje C-N i N-H veza ili vibracija CH<sub>2</sub> grupa). Sa Slike 15 se vidi da se spektri konjugata u nekim delovima razlikuju u odnosu na spektar PI. Ovakva pojava ukazuje da je vezivanjem proteina za KK došlo do strukturnih promena, naročito u oblasti sekundarne strukture (1600 - 1000 cm<sup>-1</sup>). Intenzitet apsorpcije konjugata značajno je smanjen u oblasti Amid I i II strukture što ukazuje da je došlo do interakcije amidne grupe (-NH<sub>2</sub>) PI sa aktivnim grupama KK. Takođe, do smanjenja apsorpcije dolazi na 1650 cm<sup>-1</sup> i 1550 cm<sup>-1</sup> usled istežanja N-H grupe iz Amida I i II, i na 1230 cm<sup>-1</sup> usled istežanja C-N i N-H grupe iz amida III. Smanjena apsorpcija na 3300 cm<sup>-1</sup> ukazuje na smanjen broj OH grupa fenola, što znači da je došlo do interakcije sa amidnim grupama PI. Konformacije prisutne u Amid I sekundarnoj strukturi su  $\alpha$ -helix (1646- 1664 cm<sup>-1</sup>),  $\beta$ - ravan (1615- 1637 i 1682- 1700 cm<sup>-1</sup>),  $\beta$ - zavoaj (1664- 1681 cm<sup>-1</sup>), slučajni zavoaji (1637- 1645 cm<sup>-1</sup>) (Jiang i sar., 2019). Promene koje nastaju usled interakcije amidnih grupa PI sa aktivnim grupama KK potvrđene su ispitivanjem konformacijskih promena koje nastaju u sekundarnoj strukturi uzoraka (Tabela 7).

Tabela 7: Sadržaj konformacija u sekundarnoj strukturi proteinskog izolata šljive (PI) i konjugata sa tri različite koncentracije KK (K1, K2, K3)

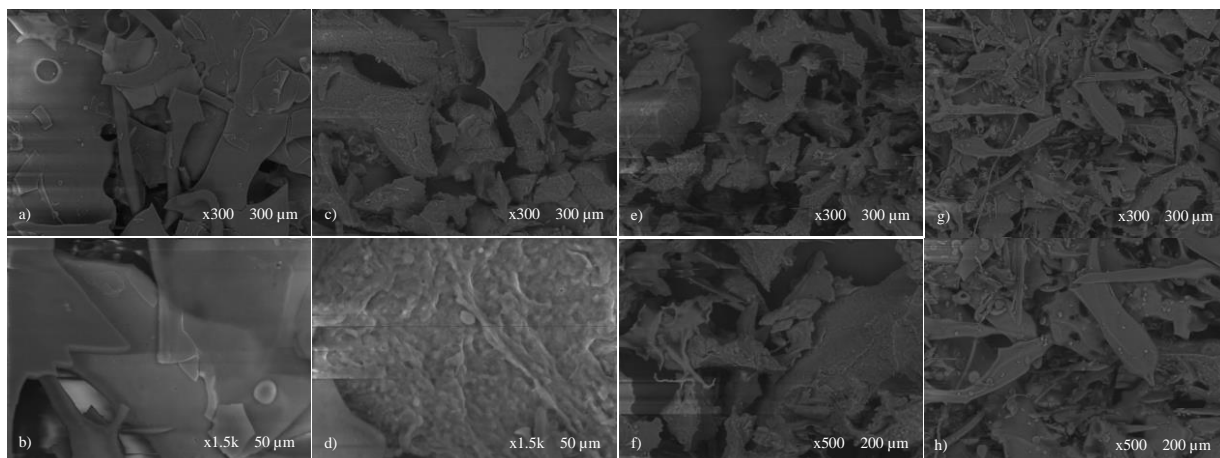
	Udeo konformacija (%)			
	<i><math>\alpha</math>-helix</i>	<i><math>\beta</math>-ravan</i>	<i><math>\beta</math>-zavoaj</i>	<i>Slučajni zavoaji</i>
<b>PI</b>	26,58	43,85	7,81	21,75
<b>K1</b>	35,87	44,15	14,38	5,59
<b>K2</b>	31,89	41,96	15,59	10,82
<b>K3</b>	32,38	40,17	12,94	14,50

Prema rezultatima iz Tabele 7 se vidi da je vezivanjem polifenola za protein došlo do značajnih promena u sekundarnoj strukturi PI. Različite koncentracije KK u konjugatu pokazuju da nisu u korelaciji sa promenama koje nastaju tj. povećanje koncentracije KK ne dovodi do smanjenja udela sekundarnih struktura. Sadržaj  $\alpha$ -helix i  $\beta$ -zavoajnica struktura značajno se povećao, dok se sadržaj slučajnih zavoaja smanjio u konjugatima u odnosu na PI. Promene koje nastaju u sadržaju  $\alpha$ -helix struktura dokazuju da je došlo do promena u veličini molekula i naelektrisanja bočnog lanca aminokiselina. Povećanje sadržaja  $\beta$ -zavoajnice je posledica vezivanja polarnih ili naelektrisanih grupa sa bočnim lancima aminokiselina i

menjanjem polarnosti bočnog lanca PI. Značajno smanjenje sadržaja slučajnih zavoja ukazuje da je došlo do kovalentne konjugacije PI i KK i konverzije ovih struktura u pravilnije strukture. Ovo smanjenje je najviše izraženo u K1 uzorku. Dobijeni rezultati ukazuju na formiranje konjugata koji treba da imaju bolju stabilnost u odnosu na nativni protein iz kojih nastaju. Slična zapažanja pokazali su *Yang i sar. (2019)* kod konjugata proteina tikve sa pirogalnom kiselinom gde se uočava da vezivanje pirogalne kiseline dovodi do promena u sekundarnoj strukturi proteina tikve.

### SEM mikroskopija

Morfološke karakteristike konjugata analizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 16. Svaki uzorak skeniran je sa više različitih uvećanja i prikazani su na Slikama: (a, b) PI, (c, d) K1, (e, f) K2, (g, h) K3.



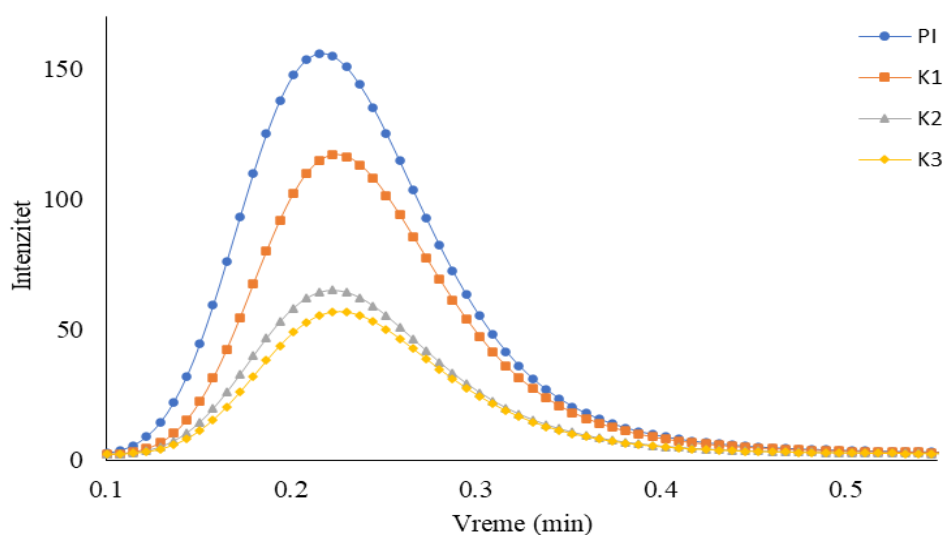
Slika 16: SEM mikrografije proteinskog izolata šljive sa uvećanjem od a) 300 i b) 1500; konjugata K1 sa uvećanjem od c) 300 i d) 1500; konjugata K2 sa uvećanjem od e) 300 i f) 500; konjugata K3 sa uvećanjem od g) 300 i h) 500

Na osnovu prikazanih slika uočavaju se razlike u morfologiji PI i nastalih konjugata. Protein ima pločaste strukture koje nisu uniformne veličine. Struktura konjugata ispunjena je mrežastim strukturama (Slika 16d) koje grupisanjem formiraju krupnije forme, što ukazuje da je uređena struktura proteina narušena u interakciji proteina sa polifenolom. Takođe, na površinama konjugata uočavaju se pore (Slika 16g, 16h) koje su naročito izražene pri najvećoj

koncentraciji KK. Prisustvo pora omogućava efikasno “zaglavljivanje” molekula drugih komponenti pa se očekuju i poboljšane emulzione osobine usled boljeg “zaglavljivanja” molekula uljane faze. Dobijeni rezultati pokazuju da dodavanje polifenola utiče na mikrostrukturu proteina. Zapažanja u promeni strukture proteina usled interakcije sa polifenolima objavili su *Liu i sar. (2021)*, u konjugaciji proteina surutke sa polifenolima.

### Fluorescencija

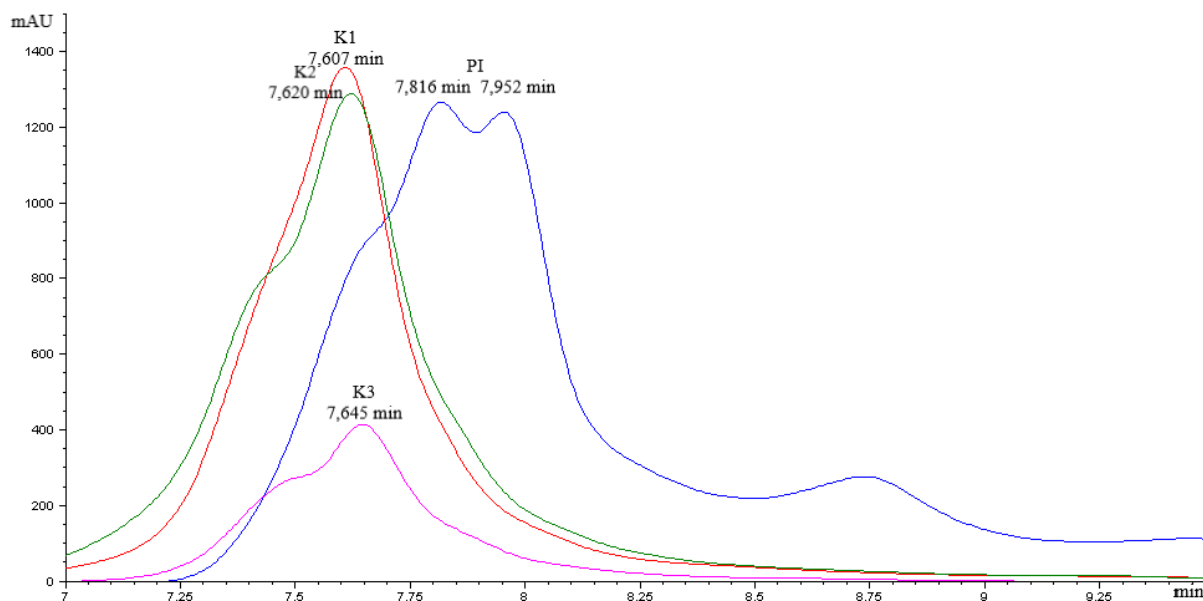
Fluorescentna spektroskopija je još jedna od metoda kojom se mogu registrovati promene u strukturi proteina tj. interakcije između proteina i polifenola. Tokom snimanja spektra meri se intenzitet apsorpcije fluorescencije sa emisijom na 300 nm koji odgovara prisutnim slobodnim amino grupama proteina. Spektri fluorescencije nativnog PI i konjugata prikazani su na Slici 17. U poređenju sa kontrolnim PI, intenzitet apsorpcije fluorescencije sva tri konjugata je značajno smanjen. Ova pojava nastaje usled trošenja slobodnih amino grupa PI usled interakcije sa KK. Sa povećanjem koncentracije KK intenzitet fluorescencije se značajno smanjuje, i najmanji je u K3 uzorku. Shodno tome, rezultati ukazuju da je PI pretrpeo konformacionu promenu nakon procesa konjugacije. Do sličnih saznanja došli su *Yang i sar. (2019)* i *Guo i sar. (2021)*, koji tumače konformacione promene u proteinu tikve i soje u interakciji sa polifenolima.



Slika 17: Spektar fluorescencije proteinskog izolata šljive (PI) i konjugata (K1, K2, K3), sa emisijom na 300 nm

## Gel hromatografija

Rezultati dobijeni gel hromatografijom prikazani su na hromatogramu na Slici 18. Profil eluiranja uzoraka pokazuje da su konjugati K1, K2 i K3 imali kraće vreme zadržavanja u koloni u odnosu na PI. Ovakva pojava ukazuje da se konjugacijom proteina sa fenolima dobijaju kompleksi većih molekularnih masa nastalih usled međusobnog umrežavanja (Özsan i Öner, 2020; Jia i sar., 2016). Kalibraciona kriva određena je uz pomoć proteinskih standarda čija retenciona vremena su: 7,547 min (albumin 66 kDa), 7,294 min (alkohol dehidrat 150 kDa) i 7,072 min (tiroglobulin 669 kDa). Na osnovu kalibracione krive i retencionih vremena uzoraka mogu se odrediti molekulske mase: PI= 16 kDa, K1= 43 kDa, K2= 41 kDa i K3= 35 kDa. Dobijeni rezultati potvrđuju da je umrežavanjem PI sa KK došlo do formiranja struktura većih molekularnih masa u odnosu na nativni protein. Ovakve rezultate potvrđuje i elektroforetski profil konjugata prikazan u nastavku, a daljom detaljnijom analizom uzoraka došlo bi se do potpunog saznanja o prisustvu i većih struktura što se vidi na Slici 18.



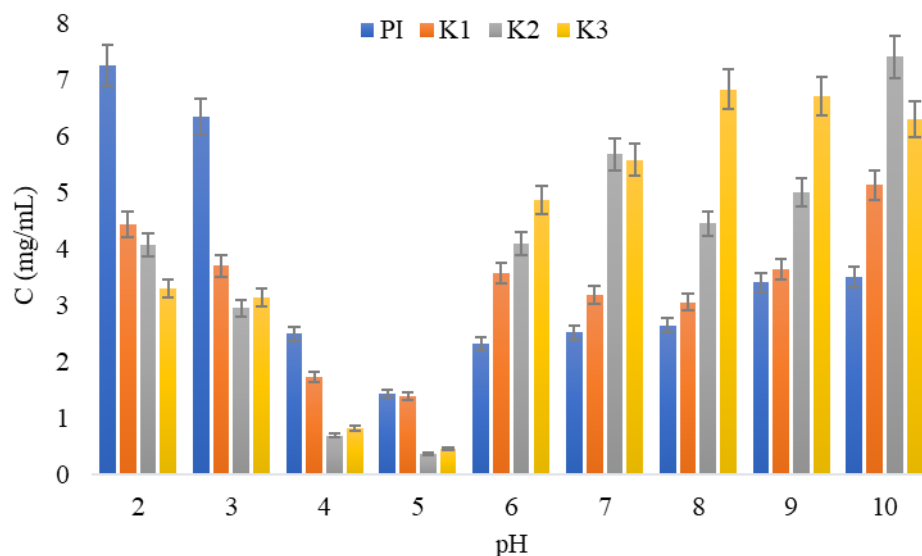
Slika 18: Hromatogram molekularnih masa konjugata proteinskog izolata šljive i kafene kiseline: proteinski izolat šljive (PI) i konjugati (K1, K2, K3)

### 5.1.3.2. Funkcionalne osobine konjugata

Konjugatima su ispitane funkcionalne osobine kao što su rastvorljivost, emulzione osobine i sposobnost stvaranja pene. Prema literaturnim pregledima (*Quan i sar., 2019*) očekuje se unapređenje funkcionalnih osobina u odnosu na sam protein.

#### *Rastvorljivost*

Kao što je prethodno pomenuto, rastvorljivost je jedna od najznačajnijih funkcionalnih osobina proteina koja utiče na sva ostala funkcionalna svojstva. Generalno poznato je da proteini loše rastvorljivosti imaju ograničena funkcionalna svojstva. Stoga, neophodno je poznavanje profila rastvorljivosti u ispitivanju i karakterisanju drugih funkcionalnih osobina. Konjugacija proteina sa fenolima može dovesti do povećanja ili smanjivanja rastvorljivosti proteina u vodi, u zavisnosti od prirode sistema (*Liu i sar., 2017*). Zato je ispitana rastvorljivost PI i konjugata u širokom opsegu pH od 2 do 10 i prikazana na slici 19.



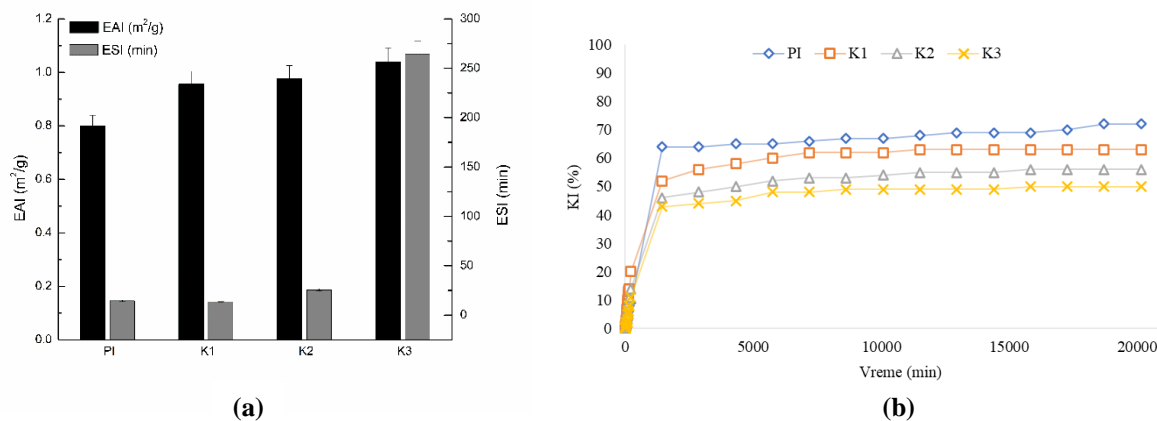
Slika 19: pH profil rastvorljivosti konjugata proteinskog izolata šljive i kafene kiseline: proteinski izolat šljive (PI) i konjugati (K1, K2, K3)

PI pokazuje karakterističan profil rastvorljivosti za protein uljarica slova U i najmanjom rastvorljivošću u oblasti izoelektrične tačke, na pH 4-5. Najveća rastvorljivost pH je pokazana u kiselim pH vrednostima (pH= 2 i pH=3), dok je najmanja na pH 5. U odnosu na PI profil, rastvorljivosti konjugata se razlikuje, sa većom rastvorljivošću od pH 6 do pH 10 i manjom pri

pH 2 do pH 5. Pri alkalnim vrednostima pH, rastvorljivost konjugata je veća u odnosu na PI i povećava se sa povećanjem koncentracije KK u konjugatima. Pri kiselim vrednostima pH rastvorljivost konjugata je značajno smanjena u odnosu na PI. Do toga dolazi zbog povećanja koncentracije fenolne komponente iznad optimalne pri čemu nastaju agregati koji uzrokuju zamućenost i smanjenje rastvorljivosti. Promene u profilima rastvorljivosti tokom konjugacije mogu biti posledice strukturnih promena i delimičnog odvijanja proteinskog lanca uz dodatak fenola. *Yan i sar. (2021)* opisali su rastvorljivost konjugata proteina soje sa epigalokatehin galatom (EGCG) i pokazali sličnu pojavu ponašanja sa povećanjem rastvorljivosti na pH 5-11 i smanjenjem na pH 2 - 4.

### Emulzione osobine

Emulzione osobine PI i nastalih konjugata opisane su merenjem vrednosti indeksa stabilnosti emulzije (ESI) i indeksa sposobnosti emulgovanja (EAI) sveže pripremljenih emulzija, i praćenjem kringing indeksa emulzije tokom 14 dana skladištenja (Slika 20). EAI izražava sposobnost proteina da stvara i stabilizuje novonastale emulzije apsorbujući kapljice na površini i sprečavajući njihovo raspadanje. ESI predstavlja sposobnost emulzije da se odupre razdvajanju (*Sui i sar., 2018*).



Slika 20. Emulzione osobine emulzija stabilizovanih rastvorom proteinskog izolata šljive (PI) i konjugata (K1, K2, K3): (a) vrednosti ESI i EAI parametara; (b) kringing indeks

Na osnovu Slike 20a se vidi da je došlo do značajnih promena ( $p < 0,05$ ) u vrednostima EAI i ESI konjugata u odnosu na PI. U odnosu na EAI konjugati imaju veću tendenciju za stvaranjem emulzija od samog PI, što se pokazuje većim vrednostima. Ovo povećanje je

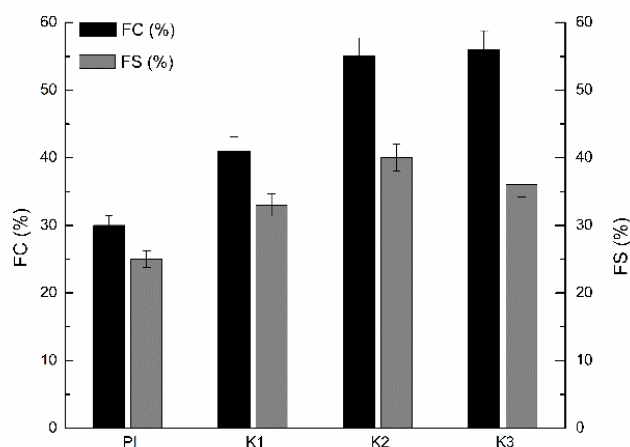


naročito uočljivo kod K3 konjugata sa  $1,04 \text{ m}^2/\text{g}$  u odnosu na PI sa  $0,80 \text{ m}^2/\text{g}$ . Vrednosti ESI ukazuju da konjugati stvaraju stabilnije emulzije u odnosu na emulzije sa PI. Ova pojava je naročito izražena kod K3 konjugata gde ESI vrednost iznosi 264 min, dok je za PI svega 14 min. Dobijeni rezultati pokazuju da modifikacija proteina sa fenolima dovodi do poboljšanja njegovih emulzionih osobina. Emulzije sa konjugatima kao emulgatorima su stabilnije i otpornije na pojavu flokulacije nego one sa PI šljive kao emulgatorom. Ovo poboljšanje je u velikoj meri povezano sa povećanom rastvorljivošću u alkalnoj sredini, na kojoj su emulzije i pravljene, jer na taj način povećana njihova sposobnost za bržu adsorpciju na molekulima uljane faze na granici dve faze.

Kriming indeks emulzija sa PI i konjugatima prikazan je na Slici 20b. Tokom vremena KI emulzija raste, naročito u prvih 24 sata nakon čega se kriva zaravnjava i vrednosti KI su konstante do kraja perioda skladištenja. Vrednost KI za emulzije sa PI je 70%, dok su vrednosti KI niže u emulzijama sa konjugatima. Ovo smanjenje je srazmerno koncentraciji KK u konjugatima sa vrednostima od 63% za K1, 56% za K2 i 50% za K3. Manji KI tokom vremena skladištenja ukazuje da su emulzije otpornije na razdvajanje na sloj krema i seruma što smanjuje i mogućnost razrušavanja emulzije. Tokom vremena skladištenja nije došlo do izdvajanja kapljica ulja. Dakle, stabilnost emulzije ulje u vodi koje su emulgovane konjugatima bila je veća od stabilnosti emulzije stabilizovane PI. Slično su pokazali *Yan i sar. (2021)* gde konjugat proteina soje sa polifenolima čini emulzije stabilnijima od samog proteina soje.

### ***Sposobnost stvaranja pene***

Sposobnost stvaranja pene je jedna od najznačajnijih osobina proteina. U ispitivanju sposobnosti PI i njegovih konjugata za stvaranjem pene praćeni su parametri FC i FS (Slika 21). Sa Slike uočavamo da pene formirane sa konjugatima pokazuju jasan trend poboljšanja u odnosu na pene sa PI. Vrednost FC za pene sa PI je 30%, a FS je 25%. Kod konjugata ove vrednosti su značajno veće ( $p < 0,05$ ), za FC idu do 70% dok za FS do 45%. Rezultati ukazuju da je svojstvo stvaranja pene za PI šljive značajno poboljšano njegovom modifikacijom sa fenolnom komponentom. Ova pojava je posledica povećanja rastvorljivosti jer usled odvijanja proteina dolazi do lakšeg stvaranja elastičnih mreža pene na granici površina vazduh-voda. Pojavu poboljšanja sposobnosti formiranja pene objasnili su *Jiang i sar. (2018)*, gde konjugati proteina surutke i kazeina sa hlorogenskom kiselinom pokazuju bolja svojstva stvaranja pene u poređenju sa samim proteinima.



Slika 21: Kapacitet i stabilnost pene proteinskog izolata šljive (PI) i konjugata (K1, K2, K3)

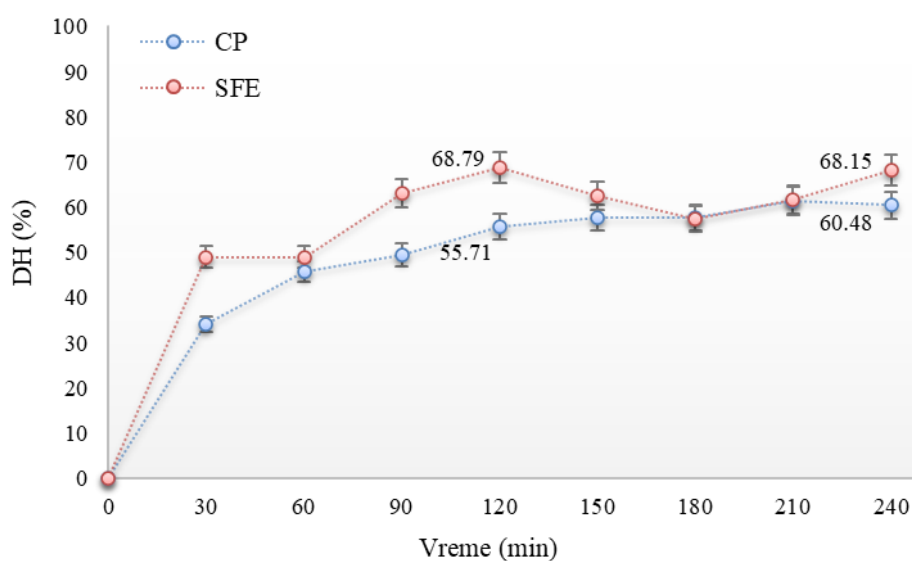
#### 5.1.4. Svarljivost proteinskih izolata i konjugata- *In vitro* digestija

Sledeća faza u ispitivanju i karakterizaciji dobijenih proteinskih izolata i konjugata je njihova svarljivost. Ispitivanje svarljivosti proteina i njihovih proizvoda predstavlja noviju oblast istraživanja koja ima veliki potencijal u ispitivanju njihove dostupnosti nakon izloženosti uticaju uslova digestivnog trakta, kao što su enzimi i promena pH sredine. U literaturi je opisan veliki broj metoda i modela koje se koriste za ispitivanje svarljivosti, a uglavnom su bazirane na enzimskoj hidrolizi sa enzimima iz digestivnog trakta pepsinom i pankreatinom.

*In vitro* digestija je korišćena kao model sistem u cilju ispitivanja svarljivosti proteinskih izolata i njihovih konjugata, koji nastaju usled modifikacije proteina, i dobijanja hidrolizata sa različitim bioaktivnostima nakon prolaska kroz digestivni trakt. Metoda *in vitro* digestije primenjena u radu predstavlja dvostepenu hidrolizu proteazama pepsin i pankreatin uz uslove koje simuliraju gastrointestinalni trakt (GIT) čoveka, kao što su temperature od 37 °C i određena pH vrednost sredine. Glavni cilj *in vitro* digestije je ispitivanje svarljivosti dobijenih PI i konjugata i potencijalne bioaktivnosti u organizmu nakon direktnog konzumiranja. Step ena hidrolize (DH) je parametar koji je korišćen u praćenju toka digestije tj. stepena hidrolize, a SDS gel elektroforeza je primenjena za detekciju peptidnih frakcija pre i posle digestije. U radu je ispitana svarljivost proteinskih izolata kajsije i šljive i konjugata. U literaturi je opisana *in vitro* digestija proteinskog izolata tikve i biološke aktivnosti dobijenih hidrolizata (Popović i sar., 2017).

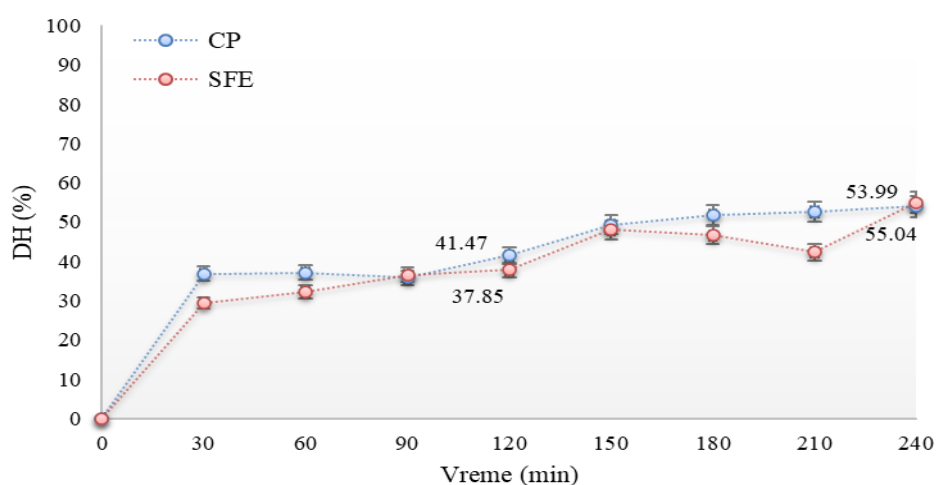
Digestija PI dobijenih iz uljanih pogača kajsije i šljive ispitane su u trajanju od 240 min što simulira vreme varenja hrane kod čoveka, prvih 120 min praćena je hidroliza pepsinom i narednih 120 min pankreatinom. Osim toga, analizirani su PI dobijeni iz različitih uljanih pogača (CP i SFE) kako bi se ispitaio uticaj načina dobijanja pogača na svarljivost dobijenih proteinskih izolata. Krive hidrolize PI kajsije i šljive koje pokazuju dobijene vrednosti DH tokom vremena hidrolize prikazane su na Slikama 22 i 23.

Sa Slike 22 se vidi da oba PI pokazuju porast vrednosti DH tokom vremena što ukazuje na potencijalno dobru svarljivost nakon prolaska kroz GIT čoveka. U prvih 120 min digestije, nakon pepsina, DH dostiže vrednost oko 56% za PICP i 69% za PISFE. Dalja hidroliza PI ne dovodi do značajnog povećanja DH jer nakon hidrolize pankreatinom iznosi oko 61% za PICP i 68% za PISFE. Ponašanje obe vrste izolata (CP i SFE) i dobijene vrednosti DH su prilično slične pa na osnovu toga može se zaključiti da način dobijanja uljane pogače nema velikog uticaja na svarljivost PI. Prema tome, može se reći da oba PI kajsije pokazuju dobru svarljivost koja se uglavnom vrši u želucu i koja se nešto malo dodatno produžava hidrolizom pankreatinom.



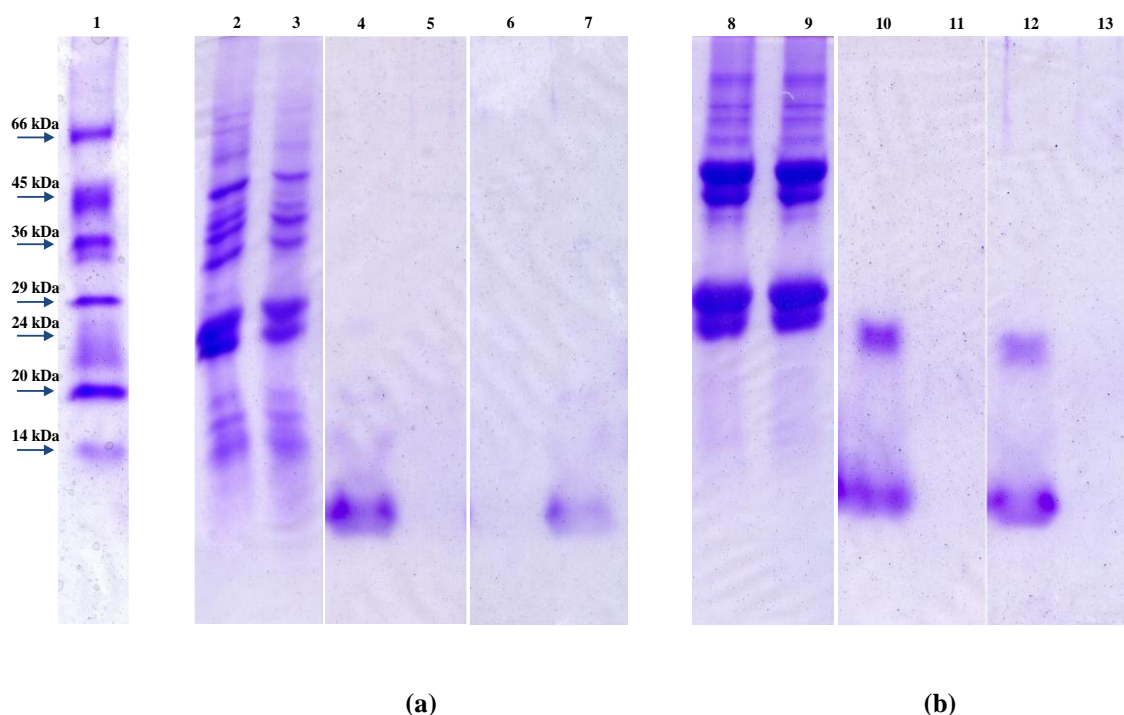
Slika 22. Vremenski tok in vitro digestije proteinskih izolata kajsije (CP i SFE) primenom proteaza, pepsin i pankreatin

U odnosu na prethodno opisanu digestiju PI kajsijske, sa Slike 23 vidi se da PI šljive pokazuju malo drugačije ponašanje. Razlika je u tome što se svarljivost PI šljive može posmatrati kao postepeni proces jer nakon hidrolize pepsinom dolazi do dalje hidrolize delovanjem pankreatina. Sa slike se vidi da u prvoj fazi digestije sa pepsinom (120 min) vrednost DH iznose oko 42% za PICP i 38% za PISFE. Dok u drugoj fazi digestije tj. hidrolize pankreatinom dolazi do povećanja DH koje dostižu vrednosti od 54% za PICP i 55% za PISFE. Kao i kod PI kajsijske, dobijene vrednosti DH su slične za obe vrste pogača (CP i SFE) pa se može zaključiti da ni u slučaju šljive nema uticaja vrste pogače na svarljivost dobijenih PI.



Slika 23. Vremenski tok *in vitro* digestije proteinskih izolata šljive (CP i SFE) primenom proteaza, pepsin i pankreatin

Distribucija molekularnih masa proteinskih izolata kajsije i šljive i njihovih hidrolizata dobijenih nakon *in vitro* digestije prikazana je na Slici 24.



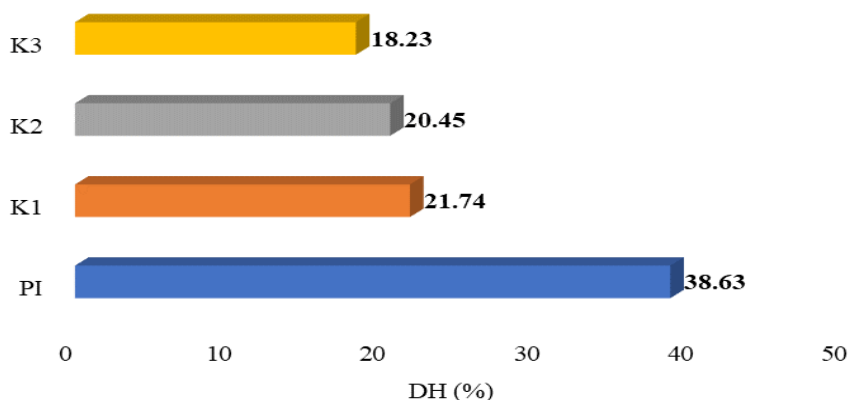
Slika 24. Elektroforetski profili proteinskih izolata i njihovih hidrolizata: (a) kajsije; (b) šljive. Markeri molekularnih masa 1; PICP kajsije 2; PISFE kajsije 3; PICP hidrolizati kajsije pepsina 4; PICP hidrolizati kajsije pankreatina 5; PISFE hidrolizati kajsije pepsina 6; PISFE hidrolizati kajsije pankreatina 7; PICP šljive 8; PISFE šljive 9; PICP hidrolizati šljive pepsina 10; PICP hidrolizati šljive pankreatina 11; PISFE hidrolizati šljive pepsina 12; PISFE hidrolizati šljive pankreatina

Linija 1 pokazuje raspored molekularnih masa standarda koji je u rasponu od 14 do 66 kDa. Slika 24a prikazuje molekularne mase proteinskih izolata kajsije CP i SFE (linije 2 i 3) i njihove hidrolizate nakon digestije (linije 4 – 7). Na Slici se uočava da nativni PI kajsije (linije 2 i 3) pokazuju intenzivne trake u rasponu između 20 – 29 kDa i 29 – 45 kDa koje pripadaju globulinskoj frakciji. Sličnost u elektroferetskim profilima proteinskih izolata CP i SFE, ukazuje da način dobijanja uljane pogače kao sirovine za izolaciju proteina ne utiče na profil molekularnih masa dobijenih izolata. Dobijeni rezultati pokazuju sličnost sa drugim PI dobijenih iz koštica roda *Prunus*, kao što je višnja (*Garcia i sar., 2015*). Profil molekularnih masa hidrolizata kajsije pokazuje samo tragove ispod 14 kDa što se očekuje zbog visokih vrednosti DH i skoro potpune hidrolize na male peptide (linije 2, 3, 4, 5). Kod hidrolizata PICP kajsije sa pepsinom vidi se intenzivna traka ispod 14 kDa (linija 2) koja postepeno nestaje nakon digestije sa pankreatinom (linija 3). Hidrolizat PISFE kajsije ne pokazuje vidljive trake nakon

pepsina (linija 4), dok nakon pankreatina uočava se blago obojena traka ispod 14 kDa (linija 5). Ovakav elektroforetski profil dobijenih hidrolizata je u korelaciji sa visokim DH što ukazuje na prisustvo malih proteinskih fragmenata tj. peptida.

Slika 24b prikazuje molekulske mase proteinskih izolata šljive CP i SFE (linije 8 i 9) i njihove hidrolizate (linije 10 – 13). Linije 8 i 9 pokazuju intenzivne trake između 24 – 29 kDa i 36 – 45 kDa, koje pripadaju kao i u slučaju kajsije globulinkoj frakciji koja je karakteristična za biljne proteine. Međutim, kada se uoče pepsinski hidrolizati PI šljive vidi se da je prisutna intenzivna traka na oko 24 kDa (linije 10 i 12). S obzirom, na manje vrednosti DH posle pepsina opravdano je prisustvo većih proteinskih frakcija oko 25 kDa. Međutim, nakon potpune hidrolize (linije 11 i 13) na gelu nisu više vidljive trake, što potvrđuje da je došlo do dalje hidrolize proteinskih izolata i nastajanja peptida. Nakon poređenja dobijenih rezultata proteinskih izolata kajsije i šljive može se zaključiti da su proteinski izolati kajsije brže i bolje svarljivi u odnosu na šljivu.

Svarljivost konjugata, takođe je karakterisana dobijenim stepenom hidrolize nakon potpune *in vitro* digestije, hidrolize pepsinom i pankreatinom. Dobijene vrednosti DH za svaki konjugat prikazane su na Slici 25.

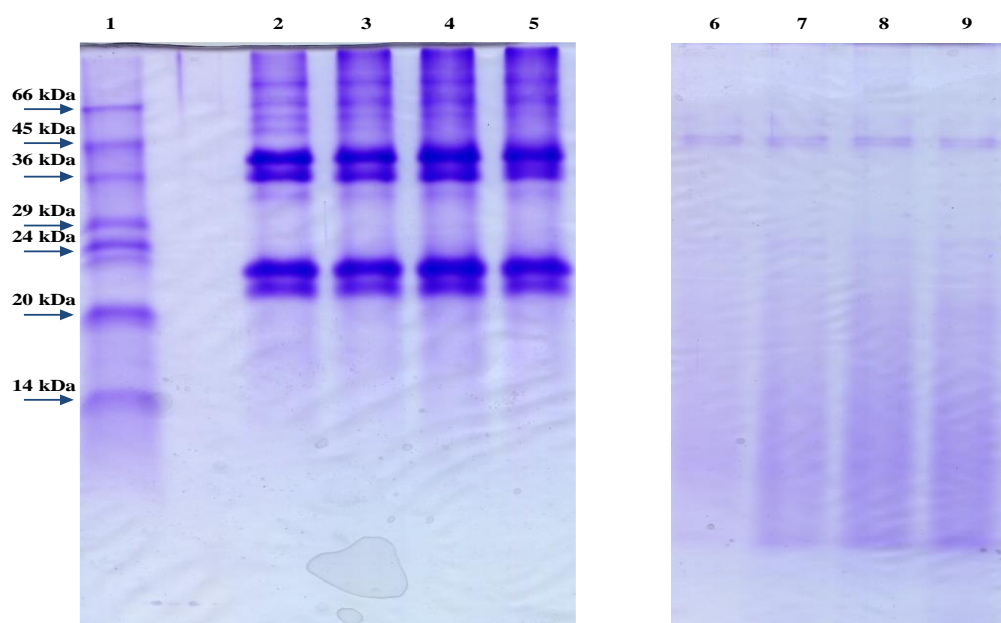


Slika 25. Stepen hidrolize konjugata proteinskog izolata šljive i kafene kiseline nakon *in vitro* digestije: proteinski izolat šljive (PI) i konjugati (K1, K2, K3)

Za razliku od proteinskih izolata konjugati su manje svarljivi što pokazuju i manje vrednosti DH u odnosu na PI. Nakon *in vitro* digestije, nativni PI ima vrednost DH od oko 39%, dok se kod konjugata ova vrednost smanjuje sa povećanjem koncentracije KK. Vrednosti DH za konjugate iznose oko 22% za K1, 21% za K2 i 18% za K3. Smanjena svarljivost konjugata

može biti posledica stvaranja većih struktura usled konjugacije PI sa polifenolima, pa su zbog toga peptidne veze na supstratu manje dostupne enzimima i na taj način je smanjen stepen hidrolize. Konjugati su prirodno prisutni u prehrambenim proizvodima koja se svakodnevno konzumiraju, najbolji primeri su kafa ili čaj sa mlekom. Česta je pojava otežanog varenja nakon konzumiranja ovakvih napitaka, što upravo može biti posledica prisustva strukturno velikih fragmenata koji nastaju konjugacijom proteina mleka i polifenola iz čaja ili kafe, čija digestija je otežana usled strukturnih promena i ograničenoj dostupnosti enzima mestima delovanja u supstratu.

Elektroforetski profil nativnog PI i konjugata (K1, K2, K3) pre i posle *in vitro* digestije određen SDS gel elektroferezom prikazan je na Slici 26. Molekulske mase standarda prikazane su na liniji 1, nativni PI na liniji 2, konjugata na linijama 3, 4, 5, a hidrolizati PI i konjugata na linijama 6, 7, 8, 9.



Slika 26. Elektroforetski profili konjugata i njihovih hidrolizata nakon *in vitro* digestije. Markeri molekulske mase 1; PI šljive 2; K1 konjugat 3; K2 konjugat 4; K3 konjugat 5; hidrolizat PI šljive 6; hidrolizat K1 konjugata 7; hidrolizat K2 konjugata 8; hidrolizat K3 konjugata 9

Raspored masa za nativni PI i konjugate je međusobno sličan i najveći tragovi vidljivi su između traka 20 – 24 kDa i 36 - 45 kDa. U poređenju sa prethodnim elektroforetskim profilom PICP šljive (Slika 24b) trake molekulske mase su pomerene na niže, što potvrđuje da je došlo do strukturnih promena PI nakon konjugacije sa KK. Na linijama 3, 4 i 5 uočavamo tamnije

tragove u opsegu iznad 66 kDa što ukazuje na prisustvo molekula većih molekulskih masa. U slučaju hidrolizata (linije 6 – 9) tragovi su skoro potpuno nestali, naročito kod PI (linija 6). Ovo ukazuje da je došlo do svarljivosti PI i konjugata. Međutim, hidrolizati konjugata imaju tamnije mrlje ispod 14 kDa ali i na oko 45 kDa što ukazuje da su konjugati delimično hidrolizovani. Takođe, slična zapažanja imali su *Morais i sar. (2020)* koji su potvrdili ograničenu svarljivost konjugata proteina surutke sa polifenolima u odnosu na sam protein surutke.

### 5.1.5. Biološke osobine proteinskih izolata nakon *in vitro* digestije

Osim svarljivosti jedinjenja bitno je da jedinjenje zadrži ili oslobodi neku biološku aktivnost koja neće biti narušena nakon prolaska kroz digestivni trakt. Enzimskom hidrolizom proteina dolazi do raskidanja peptidnih veza i cepanja proteina na manje peptidne fragmente koji mogu posedovati različite biološke aktivnosti sa pozitivnim efektom na ljudsko zdravlje, kao što su: smanjenje krvnog pritiska, regulisanje glukoze u krvi, hvatanje slobodnih radikala. U dobijenim hidrolizatima proteinskih izolata kajsije i šljive ispitane su antioksidativne, antihipertenzivne i antidijabetske aktivnosti, čije vrednosti su prikazane u Tabeli 8.

Tabela 8. Bioaktivne osobine hidrolizata proteinskih izolata kajsije i šljive nakon *in vitro* digestije

	DH (%)	AA (%)		ACE	$\alpha$ -glukozidaza
		ABTS	DPPH	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ L)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ L)
<i>Pepsin</i>					
Kajsija CP	55,71 $\pm$ 0,04	82,40 $\pm$ 0,37	35,70 $\pm$ 0,49	2,17 $\pm$ 0,03	15,46 $\pm$ 0,40
Kajsija SFE	68,79 $\pm$ 0,20	73,40 $\pm$ 0,35	29,10 $\pm$ 0,20	2,39 $\pm$ 0,03	13,60 $\pm$ 0,49
Šljiva CP	41,47 $\pm$ 0,40	24,96 $\pm$ 0,13	12,33 $\pm$ 0,26	3,78 $\pm$ 0,03	13,23 $\pm$ 0,22
Šljiva SFE	37,85 $\pm$ 0,20	27,82 $\pm$ 0,29	24,43 $\pm$ 0,51	2,30 $\pm$ 0,06	14,05 $\pm$ 0,09
<i>Pankreatin</i>					
Kajsija CP	60,48 $\pm$ 0,23	94,20 $\pm$ 0,35	65,20 $\pm$ 0,23	4,99 $\pm$ 0,01	-
Kajsija SFE	68,15 $\pm$ 0,16	92,15 $\pm$ 0,01	63,20 $\pm$ 0,01	3,86 $\pm$ 0,03	-
Šljiva CP	53,99 $\pm$ 0,22	31,81 $\pm$ 0,19	30,33 $\pm$ 0,13	2,70 $\pm$ 0,18	-
Šljiva SFE	55,04 $\pm$ 0,07	36,67 $\pm$ 0,40	23,38 $\pm$ 0,41	3,06 $\pm$ 0,07	-

Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ ).



### 5.1.5.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost (AA) hidrolizata dobijenih nakon *in vitro* digestije ispitana je testovima neutralizacije bioloških model radikala, ABTS+ katjona i DPPH• radikala. Dobijena aktivnost izražena je kao procenat (%). Ispitana je AA za hidrolizate iz oba tipa PI kajsije i šljive (CP i SFE), kao i nakon hidrolize pepsinom i pankreatinom.

Prema rezultatima, hidrolizati PICP i PISFE kajsije pokazuju isto ponašanje, da hidrolizati nakon oba koraka digestije imaju dobar antioksidativni kapacitet. Međutim, primetno je da rezultati dobijeni za ABTS test imaju nešto veće vrednosti u odnosu na DPPH, što zavisi od prirode uzorka i uslova metode. Nakon hidrolize pepsinom, aktivnost uklanjanja DPPH• radikala za PICP i PISFE hidrolizate iznosi oko 36%, odnosno 29%. Potom, nakon potpune digestije tj. hidrolize pankreatinom, AA se povećava na 65%, odnosno 63% respektivno. Aktivnost uklanjanja ABTS+ radikala za hidrolizate oba PI bila je izražena već nakon prve faze digestije, hidrolize pepsinom, i dostiže vrednosti od 82% za PICP i 73% PISFE. Posle hidrolize pankreatinom, vrednosti AA rastu do 94% za PICP i 92% za PISFE.

Za razliku od prethodno opisanih hidrolizata kajsije, PI šljive nakon *in vitro* digestije pokazuju manje vrednosti AA. Nakon hidrolize pepsinom, aktivnost uklanjanja DPPH• radikala za PICP i PISFE hidrolizate iznosi 12%, odnosno 24%. Potom, nakon potpune digestije, tj. hidrolize pankreatinom, AA se povećava na 30% za PICP, odnosno 23% za PISFE. Aktivnost uklanjanja ABTS+ radikala za hidrolizate pepsina dostiže vrednost od 25% za PICP i 28% za PISFE. Posle hidrolize pankreatinom, vrednosti AA rastu do 32% za PICP i 37% za PISFE.

### 5.1.5.2. Antihipertenzivna aktivnost

U literaturi je opisan veliki broj hidrolizata koji imaju sposobnost inhibicije ACE i potencijal primene u suplementima za regulaciju krvnog pritiska. Najčešće su to hidrolizati nastali iz proteina biljnih izvora, kao što su leblebija (*Pedroche i sar., 2002*), suncokret (*Megias i sar., 2009*). Poznato je da nativni proteini ne pokazuju ACE inhibitornu aktivnost, ona se oslobađa iz proteina enzimskom hidrolizom (*Vaštag i sar., 2011*). Stoga, očekivano je da prolaskom PI kroz digestivni trakt dolazi do oslobađanja hidrolizata koji imaju ovu inhibitornu aktivnost.

U radu je ispitana antihipertenzivna aktivnost hidrolizata PI kajsije i šljive dobijenih nakon *in vitro* digestije, zasebno nakon pepsin i pankreatin hidrolize. Antihipertenzivna aktivnost hidrolizata izražena je kao  $IC_{50}$  ( $\mu$ L) čije su vrednosti prikazane u Tabeli 8.

Prema rezultatima u Tabeli 8 vidi se da PI kajsije i šljive nakon *in vitro* digestije pokazuju ACE inhibitornu aktivnost. Najveću inhibitornu aktivnost pokazuje PICP šljive čija aktivnost tokom digestije raste jer vrednost  $IC_{50}$  od 3,78  $\mu$ L za hidrolizu pepsinom opada na 2,70  $\mu$ L za hidrolizu pankreatinom. Kod preostala tri PI inhibitorna aktivnost hidrolizata oslobođenih posle hidrolize pepsinom smanjuje se daljom hidrolizom pankreatinom. Ovo smanjenje ukazuje na manju inhibitornu aktivnost ali i dalje prisutnu, što je od velikog značaja jer PI ne samo da su svarljivi već poseduju bioaktivnost kao što je antihipertenzivna. Jača ACE inhibitorna aktivnosti pepsinskih hidrolizata u odnosu na pankreatin jeste što hidrolizati koji poseduju C-terminalni kraj u lancu imaju dominantnu ulogu u kompetitivnom vezivanju za aktivno mesto enzima. Hidrolizati koji nastaju iz aminokiselina koje na C-terminalnom lancu imaju hidrofobne i aromatične grupe imaju tendenciju jakog vezivanja za ACE. Pošto pepsin cepa peptidne veze na karboksilnom kraju hidrofobnih i aromatičnih aminokiselina (Phe, Tir, Trp i Leu) tako nastaju hidrolizati sa ovim aminokiselinama na C-terminalnom kraju lanca. Ovi hidrolizati se čvrsto vezuju za ACE na njegovom aktivnom mestu i sprečavaju njegovo vezivanje za angiotenzin I da bi se pretvorio u angiotenzin II (Lo i Chan, 2005).

### 5.1.5.3. Antidiabetska aktivnost

Dijabetes je globalni zdravstveni problem koji uzima sve veći zamah kako kod mlađe tako i starije populacije. Jedan od načina lečenja jeste primenom inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze enzima koji razlaže skrob do glukoznih jedinica i tako povećava nivo šećera u krvi. Na tržištu trenutno postoji veliki broj sintetskih inhibitora kao što su akarboza i maglitol koji se koriste u terapiji dijabetesa. Međutim, sve je veća potreba za adekvatnim zamenama sintetskih inhibitora. Poznato je polifenolne komponente imaju izraženi inhibitornu aktivnost, ali pored njih sve veću pažnju imaju proteini i njihovi peptide.

U radu je ispitana inhibitorna sposobnost enzima  $\alpha$ -glukozidaze hidrolizata PI kajsije i šljive nakon pepsina. Dobijeni rezultati izraženi su preko koncentracione zavisnosti od inhibitorne aktivnosti ( $IC_{50}$ ) i prikazani su u Tabeli 8.

Osim hidrolizata ispitana je i inhibitorna aktivnost PI kajsije i šljive. Dobijene su vrednosti IC50 PI šljive koje pokazuju veću inhibitornu sposobnost u odnosu na PI kajsije. Najmanju inhibitornu sposobnost pokazuje PICP kajsije sa 467,29 mg/mL, dok je najveća izražena kod PICP šljive sa 232,45 mg/mL. Ovo ukazuje na potencijal primene PI kajsije i šljive kao suplemenata i dodataka u raznim prehrambenim proizvodima koji mogu da se koriste u ishrani dijabetičara. Konzumiranjem ovih PI oslobodaju se peptide koji treba dalje da inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu prisutnu u tankom crevu. Stoga, prati se inhibitorna sposobnost PI nakon prolaska kroz želudac tj. posle pepsin faze. Prolaskom u creva nastali peptidi imaju sposobnost da inhibiraju prisutnu  $\alpha$ -glukozidazu. Prikazani rezultati u Tabeli 8, ukazuju da PI kajsije i šljive ispoljavaju svoje inhibitorno dejstvo nakon digestije pepsinom. Digesti pepsina za PI pokazuju identično ponašanje kao nativni PI, sa najmanjom inhibicijom za PICP kajsije sa 15,46  $\mu$ L i najvećom za PICP šljive sa 13,23  $\mu$ L. Opisani rezultati su uporedivi sa saznanjima *Lacroix i Li-Chan (2013)* koji navode da pepsinski hidrolizati surutke inhibiraju enzim  $\alpha$ -glukozidazu i tako omogućavaju regulaciju šećera u krvi.

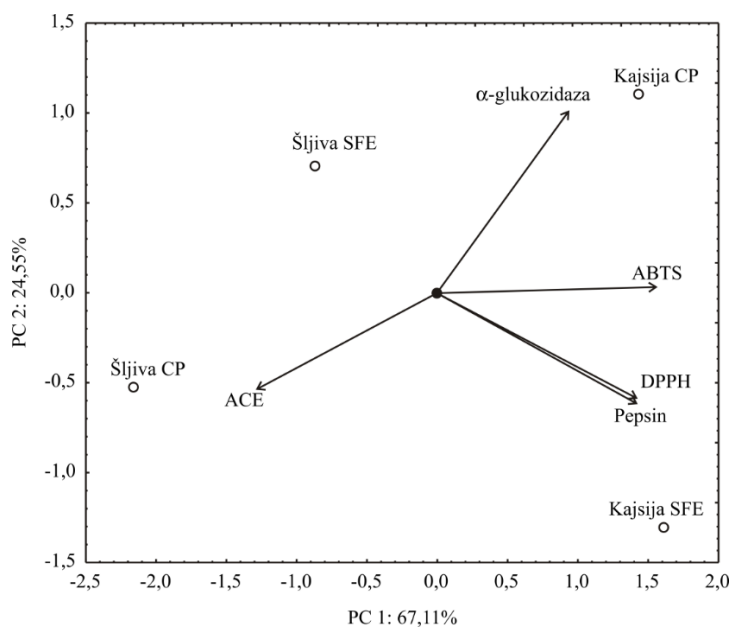
Ova saznanja sugerišu da proteinski izolati i njihovi hidrolizati sa inhibitornim aktivnostima  $\alpha$ -glukozidaze imaju potencijal da poboljšaju regulaciju glukoze u krvi zahvaljujući svojoj sposobnosti da usporavaju i inaktivaciju crevnu svarljivost ugljenih hidrata. Takođe, da bi se dokazalo dejstvo ovih peptide kod ljudi neophodne su kliničke studije koje ni potvrdile ova preliminarna istraživanja.

#### 5.1.5.4. Analiza glavnih komponenti

U ovom istraživanju, korišćena je analiza glavnih komponentata (PCA), za prikazivanje i grupisanje rezultata u faktorskoj ravni, na osnovu rezultata eksperimentalnih merenja. PCA je višeparameterska matematička metoda u kojoj se ispituju korelacija između promenljivih i na osnovu toga se broj promenljivih smanjuje, a određuju se nove, faktorske koordinate.

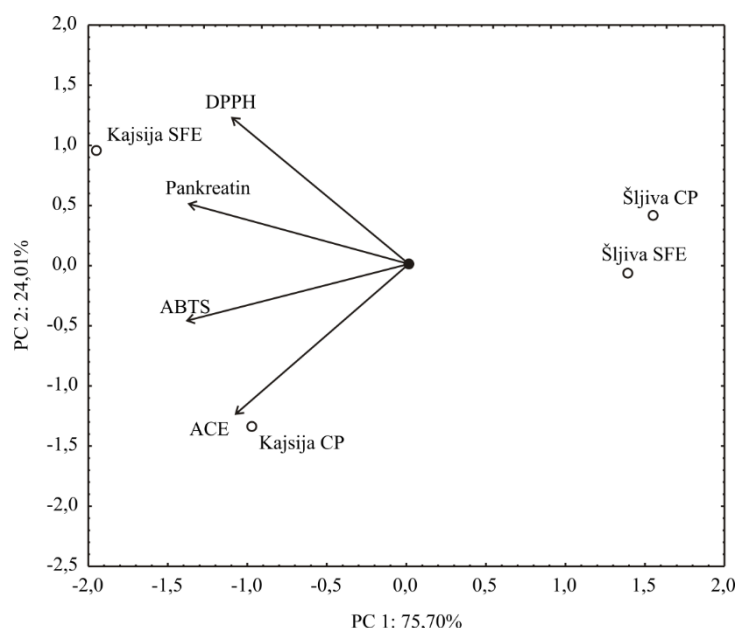
Grafičko prikazivanje trendova u procesu i uočavanje različitosti između uzoraka izvršeno je u prvoj faktorskoj ravni (faktorske koordinate 1 i 2), na osnovu sprovedene analize glavnih komponentata (Slika 27). Sa Slike 27 se uočava da prve dve faktorske koordinate prikazuju 91,66% ukupne varijabilnosti, što se smatra dovoljnim za prikaz celokupne varijabilnosti. U smeru rasta polova, rastu i merene vrednosti datih promenljivih, za određene uzorke. Tako, na primer, uzorak šljive CP ima povećanu vrednost ACE, a uzorak kajsija CP ima povećanu

vrednost  $\alpha$  - glukozidaza. Uzorak kajsija SFE i kajsija CF ima povećanu vrednost ABTS, DPPH.



Slika 27. Grafički prikaz trendova za uticaj pepsina na proteinske izolate kajsije i šljive (CP i SFE) i njihove biološke aktivnosti: ABTS i DPPH, inhibicija ACE i  $\alpha$ -glukozidaze

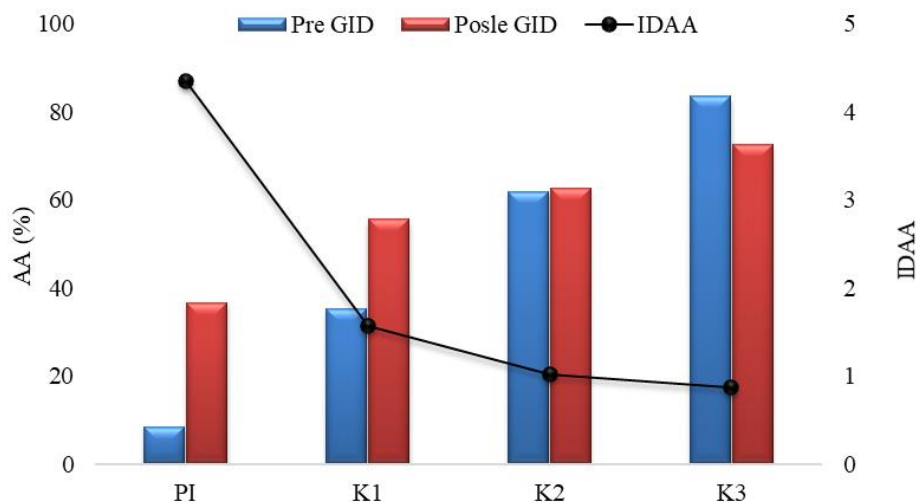
Grafičko prikazivanje trendova u procesu i uočavanje različitosti između uzoraka izvršeno je u prvoj faktorskoj ravni (faktorske koordinate 1 i 2), na osnovu sprovedene analize glavnih komponentata (Slika 28). Sa Slike 28 se uočava da prve dve faktorske koordinate prikazuju 99,71% ukupne varijabilnosti, što se smatra dovoljnim za prikaz celokupne varijabilnosti. Uzroci kajsije SFE i kajsije CP imaju najveće vrednosti DPPH, ABTS i ACE.



Slika 28. Grafički prikaz trendova za uticaj pankreatina na proteinske izolate kajsije i šljive (CP i SFE) i njihove biološke aktivnosti: ABTS i DPPH, inhibicija ACE i  $\alpha$ -glukozidaze

### 5.1.6. Biološke osobine konjugata nakon *in vitro* digestije

Antioksidativna aktivnost konjugata i nativnog PI ispitana je metodom uklanjanja ABTS+ radikal katjona, pre i posle *in vitro* digestije. Dobijeni rezultati prikazani su grafički na Slici 29. Prikazani rezultati, pokazuju da nativni PI ne poseduje značajnu AA (8,45%), za razliku od konjugata čija je AA značajno veća ( $p < 0,05$ ) u odnosu na PI. Konjugati pokazuju porast AA sa porastom koncentracije KK, koja je oko 10 puta veća u odnosu na nativni PI. Ovako formirani kompleksi pokazuju značaj jer mogu da se primenjuju kao značajni antioksidansi u nekim od sistema, prehrambenim ili kozmetičkim. Iako su konjugati pokazali slabiju svarljivost (Slika 25) u odnosu na proteinski izolat, njihovi hidrolizati dobijeni nakon *in vitro* digestije pokazuju dobru AA. Hidrolizat PI pokazuje porast od 20% u poređenju sa nativnim PI, što ukazuje na oslobađanje malih peptida tokom varenja koji pokazuju antioksidativnu aktivnost (de Morais i sar., 2020).



Slika 29. Antioksidativna aktivnost nativnog PI i konjugata (K1, K2, K3) pre i nakon *in vitro* digestije i indeks dostupnosti antioksidativne aktivnosti (IDAA)

Osim uticaja *in vitro* digestije na bioaktivnost (antioksidativnu aktivnost) konjugata ispitana je i biodostupnost bioaktivnih jedinjenja konjugatima. Biodostupnost je izražena kroz indeks dostupnosti antioksidativne aktivnosti (IDAA) koji predstavlja odnos antioksidativne aktivnosti nakon i pre *in vitro* digestije. Da bi bioaktivna jedinjenja bila dostupna nakon prolaska kroz digestivni trakt neophodno je da indeks dostupnosti ispitivanih jedinjenja ima vrednosti iznad 1. Sa slike 29 se vidi da PI ima veliki indeks dostupnosti sa vrednošću od 4,34, što se i očekuje jer tokom digestije dolazi do oslobađanja hidrolizata koji su nosioci AA. Za razliku od PI, konjugati imaju manje vrednosti IDAA, koja opada sa porastom koncentracije polifenola u konjugatima (K1 1,58; K2 1,01; K3 0,87). Smanjenje dostupnosti AA u konjugatima je posledica degradacije polifenola tokom procesa digestije koja se odražava na smanjenje AA. Na ukupnu vrednost AA proces digestije nema uticaj jer je njena vrednost porasla usred prisustva bioaktivnih hidrolizata koji nastaju iz proteina.

## 5.2. Proteini kao nosači bioaktivnih jedinjenja

Ovo poglavlje doktorske teze opisuje proteinski izolat kao nosač u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja. Opisana je potreba za inkapsulacijom i sve veće interesovanje za primenu proteina kao nosača. Dobijeni inkapsulati karakterisani su kroz razne funkcionalne osobine, a ispitana je i njihova svarljivost u slučaju njihove primene kao funkcionalnog dodatka ugradnjom u prehrambene proizvode. Hidrolizati dobijeni digestijom inkapsulata ispitani su kao antioksidansi i inhibitori enzima odgovornih za regulaciju krvnog pritiska i glukoze u krvi.

Inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja je tehnika koja omogućava očuvanje i stabilnost bioaktivnih jedinjenja tokom njihovog skladištenja, ali i primene u raznim formulacijama. Pored očuvanja stabilnosti ovih jedinjenja jako je bitna i njihova „sudbina“ tokom prolaska kroz digestivni trakt. Prolaskom kroz digestivni trakt mnoga jedinjenja gube na svojoj aktivnosti usled izloženosti enzimima i uslovima digestije. Stoga, nosači su tu da svojom strukturom zaštite i očuvaju stabilnost i dostupnost bioaktivnih jedinjenja.

Dosadašnja istraživanja ukazuju na sve češću primenu proteina kao nosača u procesu inkapsulacije. Pored svojih funkcionalnih osobina, proteini se sve više koriste zbog nutritivne vrednosti i mogućnosti oslobađanja bioaktivnih hidrolizata. S obzirom, na dobre funkcionalne osobine i njegovu svarljivost i nutritivni kvalitet, ispitana je mogućnost primene proteinskog izolata tikve (PI) kao nosača bioaktivnih jedinjenja. Aktivna komponenta čija bioaktivna jedinjenja su inkapsulirana radi osetljivosti na spoljašnje faktore i gubitka aktivnih komponenti jeste sok cvekle (SC). Cvekla je jedno od najmoćnijih povrtnih sorti sa visokim sadržajem bioaktivnih jedinjenja i izraženom antioksidativnom aktivnošću koje može da ima značajan uticaj na zdravlje čoveka (*Čanadanović-Brunet i sar., 2011*). Kao tehnike inkapsulacije primenjene su *freeze drying (FD)*, odnosno liofilizacija, i *spray drying (SD)*, odnosno sušenje u struji toplog vazduha. Proces inkapsulacije karakterisan je vrednošću efikasnosti inkapsulacije (EI), a dobijeni inkapsulati karakterisani su fizičko-hemijskim osobinama i ispitivanjem stabilnosti i dostupnosti nakon *in vitro* digestije.

### 5.2.1. Efikasnost inkapsulacije

Efikasnost inkapsulacije predstavlja odnos između ukupnih fenola i površinski vezanih fenola, aktivnih materija prisutnih u soku cvekle, u dobijenim inkapsulatima. Mnogi faktori kao što su vrsta nosača i aktivne komponente, tehnika i uslovi inkapsulacije imaju veliki uticaj na EI. Vrednosti EI za obe tehnike inkapsulacije prikazane u Tabeli 9. Izračunate vrednosti za

EI za inkapsulate su  $91.80 \pm 0.24\%$  za FD tehniku, i  $74.75 \pm 1.11\%$  za SD tehniku. Dobijeni rezultati ukazuju na efikasan proces inkapsulacije, sa izrazito visokim vrednostima ukupnih fenola u oba slučaja inkapsulacije. Navedene vrednosti značajno su veće za FD tehniku, što znači da tehnika sušenja ima veliki uticaj na EI. Razlog tome može biti to što se pripremljena suspenzija nosača i aktivne komponente suši direktno bez prethodne atomizacije i izlaganja visokim temperaturama. Tokom SD tehnike sušenja prilikom raspršivanja kapljica suspenzije u struji toplog vazduha može doći i do degradacije fenolnih komponenti što se odražava i na sam proces inkapsulacije (Saikia i sar., 2015).

Proteini u inkapsulaciji povećavaju bezbednost hrane jer se mogu koristiti kao dobra zamena za sintetičke nosače koji mogu izazvati mnoge neželjene efekte. Do sličnih zapažanja došli su Tumbas-Šaponjac i sar. (2016) u inkapsulaciji ekstrakta komine cvekle na proteinu soje. Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 9 zapaža se potencijal proteinskog izolata uljane pogače tikve kao dobrog nosača prirodnog porekla u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja.

Tabela 9. Efikasnost inkapsulacije dobijenih inkapsulata primenom freeze drying i spray drying tehnike

	<i>UF (mg/100 g)</i>	<i>PF (mg/100 g)</i>	<i>EI (%)</i>
<i>Freeze drying</i>	$491,30 \pm 0,98^b$	$37,71 \pm 0,72^a$	<b><math>91,80 \pm 0,24^b</math></b>
<i>Spray drying</i>	$354,30 \pm 0,23^a$	$87,10 \pm 0,54^b$	<b><math>74,75 \pm 1,11^a</math></b>

Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ ).

### 5.2.2. Boja inkapsulata

Boja je karakteristika od koje zavisi prihvatljivost proizvoda od strane potrošača pa time predstavlja i senzornu karakteristiku. Praćenje boje kao parametra je jako bitno i proverava se u svim fazama proizvoda, od proizvodnje do njegove stabilnosti i trajnosti. Boja u inkapsulatima uslovljena je bojom soka cvekle koji se inkapsulira na proteinskom izolatu uljane pogače tikve kao nosaču. Izražava se praćenjem vrednosti parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , koje su prikazane u Tabeli 10.



Tabela 10. CIE Lab hromatski parametri proteinskog izolata tikve i njegovog inkapsulata sa sokom cvekle dobijenih freeze drying i spray drying tehnikama

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>Freeze drying</b>			
<b>PI</b>	87,60 ± 0,04 <sup>c</sup>	-2,23 ± 0,01 <sup>a</sup>	11,02 ± 0,03 <sup>c</sup>
<b>PI-SC</b>	31,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	13,38 ± 0,01 <sup>d</sup>	5,96 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>Spray drying</b>			
<b>PI</b>	91,75 ± 0,00 <sup>d</sup>	-1,95 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,67 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>PI-SC</b>	72,40 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,03 <sup>c</sup>	23,91 ± 0,04 <sup>d</sup>

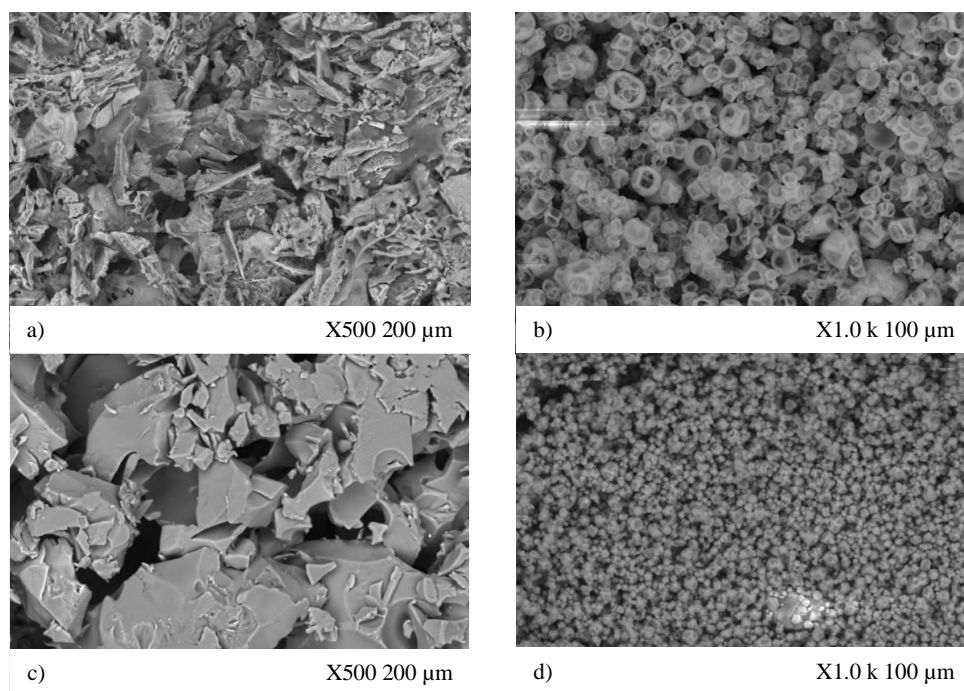
Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Proteinski izolat u slučaju SD sušenja ima izraženu visoku vrednost  $L^*$  parametra i niske vrednosti parametara  $a^*$  i  $b^*$  ( $L^*=91,75$ ;  $a^*=-1,95$ ;  $b^*=4,67$ ), dok proteinski izolat u slučaju FD sušenja ima nižu vrednost  $L^*$  parametra i višu vrednost parametara  $b^*$  ( $L^*=87,60$ ;  $a^*=-2,23$ ;  $b^*=11,02$ ). Na osnovu ovih vrednosti, zapaženo je da FD uzorak proteinskog izolata ima bledo žućkastu boju u odnosu na SD uzorak. U slučaju inkapsulata, parametri boje se potpuno razlikuju u odnosu na tehniku inkapsulacije, može se zaključiti to da uslovi u procesu inkapsulacije imaju veliki uticaj na boju finalnog proizvoda. FD inkapsulat ima veću vrednost parametra  $a^*$ , u odnosu na SD inkapsulat, što ukazuje na bolje očuvanje crvene boje koja potiče od pigmenata betalaina iz soka cvekle. Nasuprot tome, SD inkapsulati imaju izraženiju vrednost parametra  $b^*$  što ukazuje na pojavu žutih podtonova i razgradnju crvenog pigmenta tokom procesa sušenja. Ove razlike u boji mogu biti posledica visokih temperature kojima se uzorci izlažu tokom *spray drying* tehnike inkapsulacije. Slično ponašanje inkapsulata zapaženo je od strane drugih autora koji ukazuju da tehnika inkapsulacije ima veliki uticaj na boju finalnog inkapsulata, npr. *Ogrodowska i sar. (2017)* koji su istraživali inkapsulaciju ulja semena bundeve, kao i *Sharma i sar. (2013)* koji su istraživali inkapsulaciju ekstrakta pulpe manga.

### 5.2.3. Karakterizacija inkapsulata

#### 5.2.3.1. Morfološke osobine inkapsulata

Morfološke karakteristike dobijenih inkapsulata analizirane su skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM), a dobijeni rezultati prikazani su na Slici 30. Analizirajući SEM mikrografije, uočavamo da inkapsulati, imaju potpuno drugačiju morfologiju u zavisnosti od primenjene tehnike sušenja. Inkapsulati dobijeni SD tehnikom (Slika 30b, 30d) imaju sferne, uniformne čestice, različitog prečnika i udubljenja. Prah dobijen na ovaj način mnogo je rastresitiji, a udubljenja koja se nalaze na pojedinim površinama čestica nastala su usled skupljanja čestica nakon drastičnog gubitka vlage. Sa druge strane, inkapsulati dobijeni FD tehnikom (Slika 30a, 30c) imaju čestice nepravilnog oblika i veličine, koje podsećaju na slomljeno staklo ili pahuljice. Ovakve čestice nastaju usled jako niskih temperatura tokom procesa zamrzavanja i sušenja. Slične morfološke osobine raznih inkapsulata soka borovnice na maltodekstrinu i proteinu surutke kao nosačima opisane su od strane *Darndiadi i sar. (2018)*.



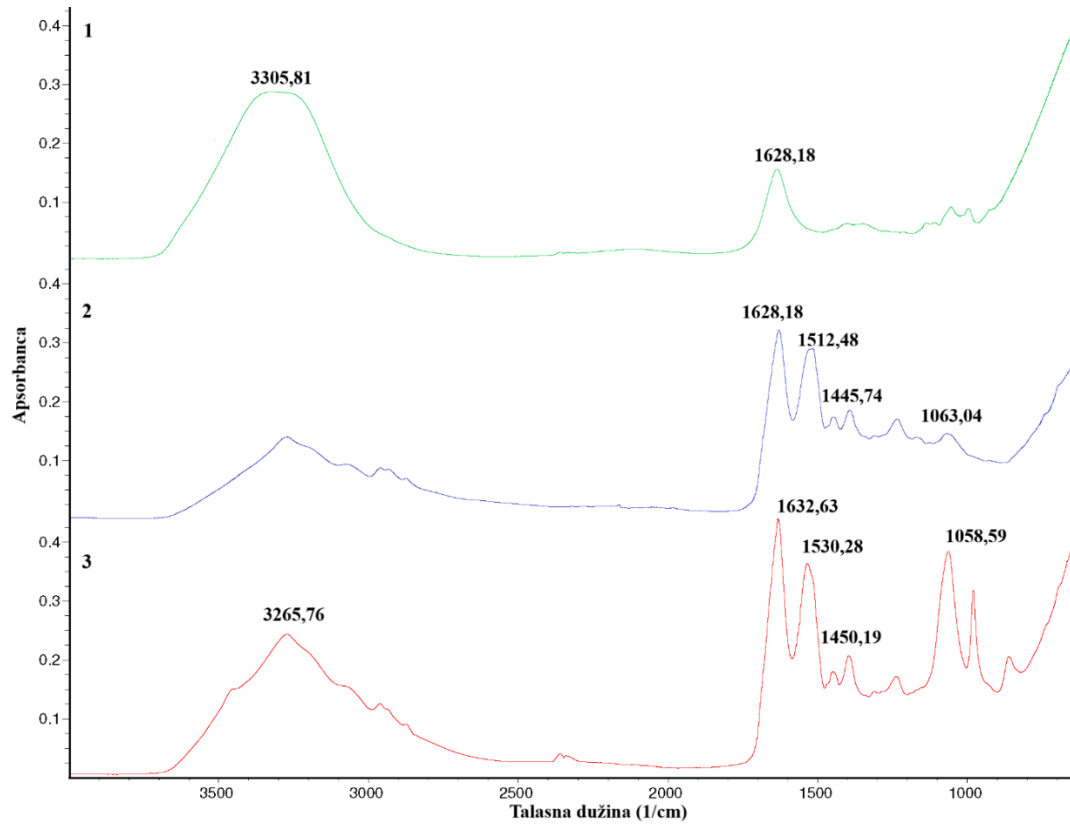
Slika 30: SEM mikrografije: (a) FD PI sa uvećanjem od 500; (b) SD PI sa uvećanjem od 1000; (c) FD inkapsulat sa uvećanjem od 500; (d) SD inkapsulat sa uvećanjem od 1000

### 5.2.3.2. FTIR spektrometrija inkapsulata

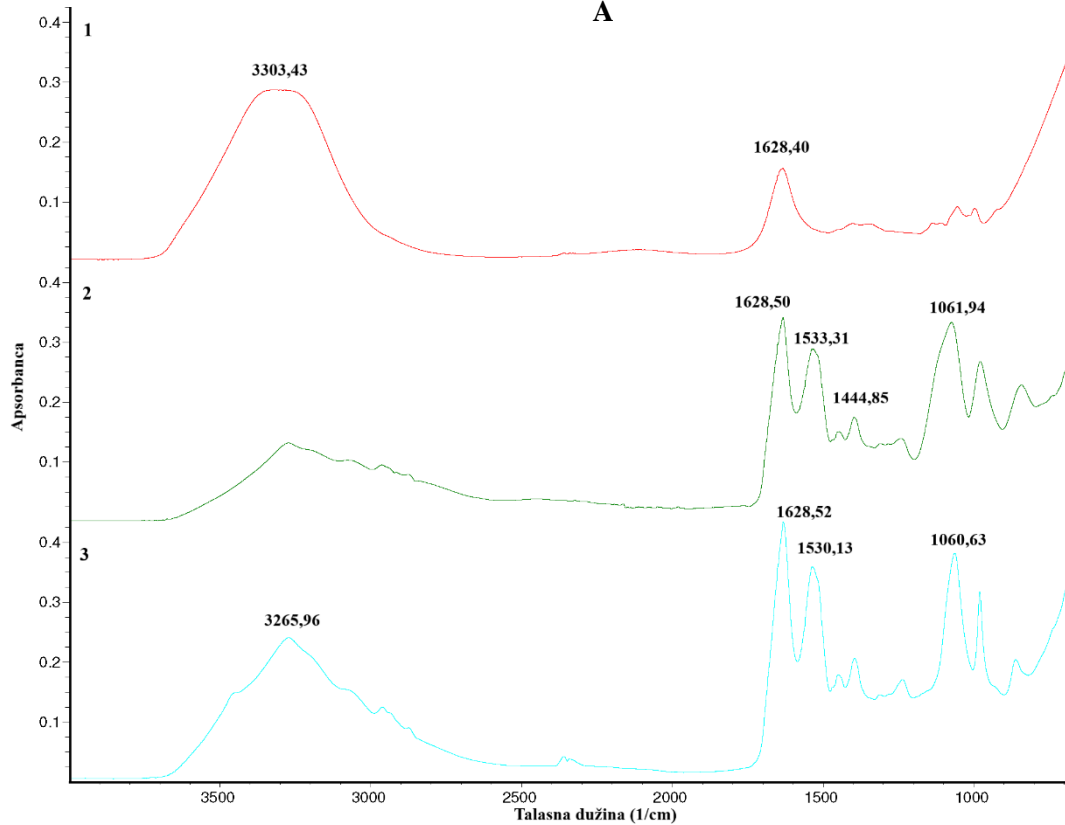
Infracrvena spektrometrija sa Furieovom transformacijom (FTIR) primenjena je za analizu interakcija između nosača i aktivne komponente tokom procesa inkapsulacije. Slika 31 prikazuje FTIR spektre uzoraka dobijene *freeze* (Slika 31a) i *spray* (Slika 31b) *drying* tehnikom, gde su 1-spektar soka cvekle, 2-spektar proteinskog izolata uljane tikve i 3-spektar inkapsulata.

Sa Slika se uočava da spektri bez obzira na tehniku sušenja imaju skoro identičan profil. Na spektar 1 može se uočiti izražen pik na  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  koji potiče od betalaina pigmenta karakterističnih za cveklju, dok se trake između  $3500$  i  $3000\text{ cm}^{-1}$  mogu pripisati prisustvu OH grupa. Spektri 2 imaju identične profile sa pikovima na talasnim dužinama koje su karakteristične za proteinske strukture. Tako pik u regiji od  $2800$ - $3000\text{ cm}^{-1}$  potiču od adsorpcije C-H veze, pik na  $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$  odgovara Amid I strukturi (istezanju veza C=O, vodoničnim vezama i prisustvu COO- grupa), pikovi na  $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$  i  $\sim 1440\text{ cm}^{-1}$  pripadaju Amid II strukturi (istezanje C-N i savijanje N-H veza), i pik  $\sim 1060\text{ cm}^{-1}$  (odgovara istezanju C-O veze). Spektri 3 su sličnih profila sa dodatno pojačanom apsorbcijom na istim talasnim dužinama koje su prisutne u profilima spektra 1 i spektra 2. U spektru inkapsulata uočavamo da je došlo do preklapanja traka koje pripadaju betalainima sa trakama nosača, što znači da je došlo do formiranja fizičke smeše unutar inkapsulata bez dodatnih hemijskih interakcija. Najveća promena koja se uočava u spektru smeše inkapsulata jeste intenzivna apsorbcija na  $1060\text{ cm}^{-1}$  koja može ukazivati na potencijalne interakcije koje nastaju između nosača i aktivne komponente ili do konformacijskih promena u samom nosaču. Međutim, pojava intenzivnijih pikova ne ukazuje na pojavu novih interakcija. Prema istraživanju *He i sar. (2016)* dokazano je da u interakciji fenolnih ekstrakata sa proteinima može doći do pomeranja traka Amid I i Amid II koje dovode do promena proteinske structure tj.  $\alpha$ -helix.

Analizirani rezultati ukazuju na dobar odnos nosača i aktivne komponente kod obe tehnike inkapsulacije. Ovo ukazuje da je primena PI kao nosača dobra i zadovoljavajuća zaštita oko aktivne komponente, čime se povećava njena dostupnost i da se formira stabilnost.



## A

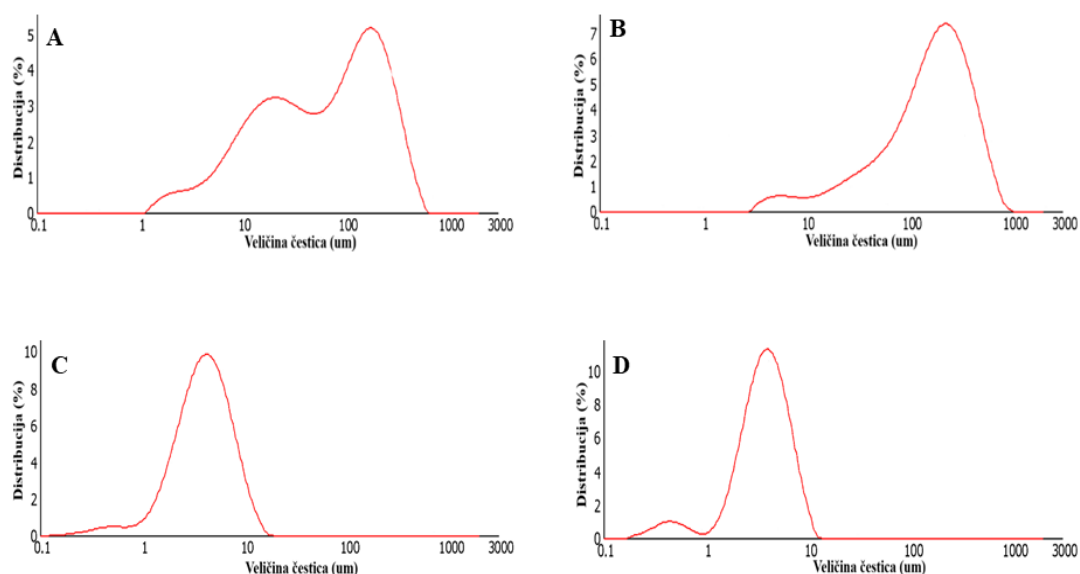


## B

Slika 31: FTIR spektri nakon freeze drying (A) i spray drying (B) inkapsulacije: (1) sok cvekle. (2) proteinski izolat uljane pogače tikve. (3) inkapsulat soka cvekle na na proteinu uljane pogače tikve

### 5.2.3.3. Veličina i raspodela veličina čestica inkapsulata

Raspodela veličina čestica predstavlja bitne karakteristike inkapsulata, jer utiče na druga svojstva i dalju primenu dobijenih inkapsulata kao funkcionalnih proizvoda. Od veličine čestica zavisi način i dalja iskorišćenost inkapsulata jer svojim prisustvom utiču na finalni izgled i strukturu proizvoda. Velike čestice mogu da imaju negativan uticaj jer svojim prisustvom mogu da izazovu naprijatan osećaj prilikom konzumacije ovakvih proizvoda. Nasuprot tome, manje čestice su poželjnije jer je veća njihova dostupnost i distribucija pa je time i veća dostupnost inkapsuliranih bioaktivnih jedinjenja. Raspodela veličine čestica inkapsulata i proteinskih izolata određena je uz pomoć uređaja Mastersizer 2000 metodom laserske difrakcije. Rezultati raspodele i veličina čestica prikazane su na Slici 32, dok je veličina čestica uzoraka prikazana u Tabeli 11 kao zapreminski srednji prečnik kapi (D[4,3]).



Slika 32: Veličina i raspodela veličina čestica inkapsulata i proteinskih izolata dobijenih (A, B) freeze drying i (C, D) spray drying tehnikama

Prikazani rezultati pokazuju da je raspodela i veličina čestica drugačija za različite tehnike inkapsulacije. Na slikama 3a i 3b prikazana je distribucija čestica FD PI i inkapsulata, dok slike 3c i 3d prikazuju distribuciju čestica SD PI i inkapsulata. Sa Slika se vidi da uzorci dobijeni SD tehnikom imaju unimodalnu distribuciju čestica sa ujednačenom veličinom čestica, dok uzorci dobijeni FD tehnikom imaju bimodalnu distribuciju čestica sa različitim veličinama čestica. Razlog tome, jeste to što uzorci koji se dobijaju *spray drying* tehnikom pre ulasku u

komoru za sušenje prolaze kroz mlaznicu pa se na taj način formiraju čestice relativno ujednačenog oblika i veličine (Correia i sar., 2017). Stoga, ova tehnika je pogodna za proizvodnju prahova malih i uniformnih čestica. Nasuprot tome, liofilizirani uzorci imaju neujednačenu raspodelu čestica zbog niskih temperature i nedovoljne energije za razbijanje smrznutih kapljica. Međutim, uniformnost liofiliziranih uzoraka moguće je postići naknadnim mehaničkim tretmanima kao što su usitnjavanje ili mlevenje.

Na osnovu Tabele 11, može se videti da su čestice SD uzoraka znatno manje u odnosu na FD uzorke. Srednji prečnik čestica FD uzoraka je 107,49  $\mu\text{m}$  za PI i 201,37  $\mu\text{m}$  za PI-SC. Na osnovu merenja, pokazano je da uzorak PI ima 10% čestica čiji je prečnik manji od 7,88  $\mu\text{m}$ , 50% čiji je prečnik manji od 66,29  $\mu\text{m}$ , a 90% čiji prečnik manji od 269,44  $\mu\text{m}$ . Uzorak FD inkapsulata ima 10% čestica čiji je prečnik manji od 28,33  $\mu\text{m}$ , 50% čiji je prečnik manji od 167,86  $\mu\text{m}$ , a 90% čiji prečnik manji od 421,18  $\mu\text{m}$ . Srednji prečnik čestica SD uzoraka iznosi 4,48  $\mu\text{m}$  za PI i 4,02  $\mu\text{m}$  za PI-SC. Na osnovu merenja, pokazano je da uzorak PI ima 10% čestica čiji je prečnik manji od 1,62  $\mu\text{m}$ , 50% čiji je prečnik manji od 3,93  $\mu\text{m}$ , a 90% čiji prečnik manji od 8,17  $\mu\text{m}$ . Uzorak SD inkapsulata ima 10% čestica čiji je prečnik manji od 1,62  $\mu\text{m}$ , 50% čiji je prečnik manji od 3,76  $\mu\text{m}$ , a 90% čiji prečnik manji od 6,96  $\mu\text{m}$ .

Tabela 11. Srednji zapreminski prečnik proteinskog izolata tikve i njegovog inkapsulata sa sokom cvekle dobijenih freeze drying i spray drying tehnikama

$\mu\text{m}$	<i>Freeze drying</i>		<i>Spray drying</i>	
	PI	PI-SC	PI	PI-SC
<i>D [4,3]</i>	107,49	201,37	4,48	4,02
<i>d (0,1)</i>	7,88	28,33	1,62	1,62
<i>d (0,5)</i>	66,29	167,86	3,93	3,76
<i>d (0,9)</i>	269,44	421,18	8,17	6,96

### 5.2.4. Fizičke karakteristike inkapsulata

Fizičke osobine inkapsulata okarakterisane su različitim parametrima koji su bitni pokazatelji kvaliteta inkapsulata prilikom njihove primene kao praškastih funkcionalnih proizvoda. Tu spadaju parametri kao što su: aktivnost vode, sadržaj vlage i higroskopnost koji su pokazatelji stabilnosti i mikrobiološke aktivnosti inkapsulata. Pored toga rastvorljivost inkapsulata u vodi je veoma značajan parametar za karakterizaciju praškastih formi jer od toga zavisi mogućnost primene ovakvih proizvoda u prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji. Nasipna gustina je fizička karakteristika praškastih proizvoda od koje zavisi način skladištenja, pakovanja i transporta. U slučaju proizvodnje i primene inkapsulata poželjne su visoke vrednosti navedenih parametara da bi se takav proizvod smatrao poželjnim za industrijsku primenu. Vrednosti navedenih parametara za ispitivane uzorke inkapsulata prikazane su u Tabeli 12.

Tabela 12. Fizičke karakteristike inkapsulata i proteinskih izolata nakon freeze i spray tehnike

<i>Uzorak</i>	<i>a<sub>w</sub></i>	<i>Sadržaj vlage (%)</i>	<i>Higroskopnost (g<sub>vode</sub>/100 g)</i>	<i>Rastvorljivost (%)</i>	<i>Nasipna gustina (g/mL)</i>
<i>Freeze drying</i>					
<b>PI</b>	0,02 ± 0,005 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,026 <sup>a</sup>	27,33 ± 0,015 <sup>c</sup>	61,40 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,015 <sup>a</sup>
<b>PI-SC</b>	0,05 ± 0,003 <sup>b</sup>	6,42 ± 0,170 <sup>d</sup>	16,29 ± 0,010 <sup>a</sup>	58,75 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,015 <sup>c</sup>
<i>Spray drying</i>					
<b>PI</b>	0,14 ± 0,006 <sup>c</sup>	4,80 ± 0,015 <sup>b</sup>	28,65 ± 0,015 <sup>d</sup>	79,25 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,31 ± 0,010 <sup>b</sup>
<b>PI-SC</b>	0,19 ± 0,006 <sup>d</sup>	5,57 ± 0,020 <sup>c</sup>	18,32 ± 0,010 <sup>b</sup>	83,15 ± 0,05 <sup>d</sup>	0,52 ± 0,010 <sup>d</sup>

Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Aktivnost vode ( $a_w$ ) je vrednost količine slobodne vode koja može da uzrokuje biohemijske reakcije u proizvodima i tako utiče na rast i razvoj mikroorganizama. Proizvod čija je  $a_w$  vrednost niža od 0,3 smatra se mikrobiološki i hemijski stabilnim. Visoke vrednosti  $a_w$  ukazuju na dostupnu slobodnu vodu koja skraćuje rok trajanja praha ili proizvoda (Yoshie-Stark i sar., 2004). Prema Tabeli X, inkapsulati imaju  $a_w$  vrednosti niže od 0,2 pa se smatraju bezbednim proizvodom sa potencijalom primene u različitim proizvodima. Takođe, nakon statističke analize prikazanih rezultata, i ovde se može zaključiti da su metode inkapsulacije značajno

uticale na  $a_w$  vrednost dobijenih inkapsulata ( $p < 0,05$ ). Dalje, jako bitan parametar koji figuriše u stabilnosti i dugotrajnosti proizvoda jeste sadržaj vlage, koji predstavlja sadržaj vode u sistemu. Svaki praškasti proizvod se smatra mikrobiološki stabilnim i bezbednim ako ima sadržaj vlage manji od 5%. Na osnovu dobijenih rezultata, vidi se da proteinski izolati imaju sadržaj vlage koji ispunjavaju kriterijume kvaliteta praškastih proizvoda. Za SD PI sadržaj vlage iznosi 4,80%, dok za FD PI 1,73%. Međutim, inkapsulati imaju veći sadržaj vlage. Za SD inkapsulat on iznosi 5,57%, a za FD inkapsulate je 6,42%. Slične rezultate dobili su *Bhusari i sar. (2014)* i *Bazaria i Kumar (2016)* za protein surutke. Razlog tome, jeste sposobnost proteina za zadržavanjem vlage što utiče na prisustvo većeg sadržaja vlage u odnosu na druge nosače (*Correia i sar., 2017*).

Higroskopnost se definiše kao sposobnost materijala da apsorbuje vlagu iz okoline. S obzirom da apsorbovana voda pokreće mnoge enzimske i hemijske reakcije u proizvodu, higroskopnost je parametar koji ukazuje na stabilnost proizvoda. Uzorci sa manjim vrednostima higroskopnosti (ispod 20  $g_{vode}/100$  g uzorka) su lakši za skladištenje i rukovanje. Higroskopnost inkapsulata i proteinskih izolata praćena je tokom sedam dana na sobnoj temperaturi od 25 °C pri relativnoj vlažnosti od 75,29% i prikazana je u Tabeli 12. Prema dobijenim rezultatima vidi se da inkapsulati imaju niže vrednosti higroskopnosti u odnosu na sam PI. Takođe inkapsulati dobijeni FD tehnikom imaju manju higroskopnost (16,29  $g_{vode}/100$  g) od inkapsulata dobijenih SD tehnikom (18,32  $g_{vode}/100$  g).

Rastvorljivost praškastih proizvoda kao što je već rečeno od velikog je značaja za njihovu implementaciju u različite sisteme. Rastvorljivost se definiše kao količina rastvorljive materije u određenoj zapremini vode. Prema rezultatima iz Tabele 12, utvrđena je dobra rastvorljivost za obe vrste inkapsulata. Rastvorljivost inkapsulata u vodi na 25 °C, kreće se u rasponu od 58% do 83%. Morfologija inkapsulata i veličina čestica imaju veliki uticaj na rastvorljivost, kao i tehnika inkapsulacije. Prema tome, evidentno je da inkapsulati pripremljeni SD tehnikom inkapsulacije imaju veću rastvorljivost u poređenju sa inkapsulatima pripremljenim FD tehnikom inkapsuliranja zbog činjenice da SD inkapsulati imaju čestice manjih veličina i uniformne raspodele veličine čestica. Do sličnih saznanja došli su *Hu i sar. (2010)* za proteinski izolat soje kao nosača i *Joshi i sar. (2011)* za proteinski izolat sočiva kao nosača.

Nasipna gustina se definiše kao određena masa praškastog uzorka koja zauzima određenu zapreminu. Iz Tabele 12 se uočava da FD uzorci imaju nižu nasipnu gustinu u odnosu na iste uzorke dobijene SD tehnikom. Ova pojava može biti povezana sa manjim sadržajem vlage kod

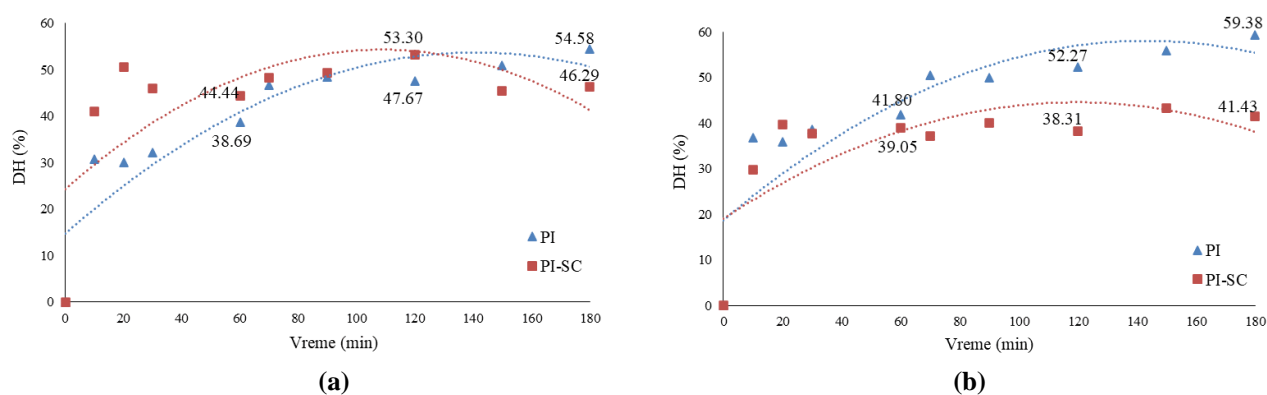


FD uzoraka, pa je samim tim i nasipna gustina manja. Takođe niske nasipne gustine za liofilizirane uzorke zabeležili su *Darniadi i sar. (2018)* i *Joshi i sar. (2011)* u svojim studijama.

### 5.2.5. *In vitro* digestija inkapsulata

Pored ispitanih fizičkih osobina, jako je važno da inkapsulati budu svarljivi, što je jedna od bitnih karakteristika kao funkcionalnih proizvoda koji mogu da budu dodatak u raznim prehrambenih formulacijama. Osim što je inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja način njihove zaštite od degradacije pod uticajem spoljnih faktora, bitno je da omogući siguran transport i oslobađanje aktivne komponente nakon prolaska kroz digestivni trakt. Tokom digestije inkapsulata, pod dejstvom digestivnih sokova, pH i enzima dolazi do oslobađanja aktivne komponente iz nosača i njenog oslobađanja na ciljano mesto delovanja. Prolaskom inkapsulata kroz digestivni trakt osim oslobađanja aktivne komponente dolazi do hidrolize proteinskih nosača i oslobađanja njihovih hidrolizata koji mogu imati razne zdravstvene efekte. Sve ovo, u poslednjih nekoliko godina, istraživanje usmerava na ispitivanje svarljivosti inkapsulata i njihove “sudbine” nakon prolaska kroz digestivni trakt.

Svarljivost dobijenih inkapsulata određivana je metodom *in vitro* digestije. Kao što je već opisano u teorijskom delu (Poglavlje 3.1), *in vitro* digestija je simulacija digestivnog trakta čoveka. Predstavlja simultani enzimski proces delovanja dva uzastopna enzima pepsina i pankreatina, pri određenim uslovima pH i temperature. *In vitro* digestija PI i njihovih inkapsulata opisana je praćenjem stepena hidrolize (DH) proteina tokom vremena (Slika 33).



Slika 33. Vremenski tok *in vitro* digestije proteinskih izolata i inkapsulata nakon (a) freeze i (b) spray tehnike primenom proteaza, pepsin i pankreatin

Sa Slike 33 vidimo da tokom prve faze digestije, sa pepsinom (nakon 60 min), se postižu velike vrednosti DH. Vrednosti DH za FD uzorke su 39% za PI i 44% za PI-SC, dok za SD uzorke su 42% za PI i 39% za PI-SC. Ovako visoke vrednosti DH ukazuju da je pepsinom hidrolizovan najveći deo proteina, jer već nakon 10 min digestije PI i inkapsulati dostižu vrednost DH od oko 30%. Dalja digestija uzoraka, sa pankreatinom (nakon 120 min), dovodi do manjeg porasta DH. Vrednosti DH za FD uzorke su 55% za PI i 46% za PI-SC, dok za SD uzorke su 59% za PI i 41% za PI-SC. Prema dobijenim rezultatima, porast DH tokom 120 min *in vitro* digestije ukazuje na dobru svarljivost uzoraka. Svarljivost PI je očekivana i u skladu sa prethodnim istraživanjima (Popović i sar., 2017) koja dokazuju svarljivost PI tikve jer se dostižu visoke vrednosti DH tokom *in vitro* digestije. Nakon potpune digestije inkapsulati vidi se da inkapsulati imaju manji DH u odnosu na njihove PI. Ovo može biti posledica interakcije proteina sa polifenolima iz soka cvekle, jer prisustvo grupa iz fenola mogu da blokiraju aktivne centre proteina i tako smanje pristup supstrata enzimu pa su i vrednosti DH inkapsulata manje u odnosu na same supstrate (Tailor i sar., 2009; Visentini i sar., 2019). Prikazani rezultati, pokazuju da su dobijeni inkapsulati svarljivi, i da kao takvi mogu naći primenu kao funkcionalni dodaci hrani ili kao suplementi. Pored toga, ovako dobijeni hidrolizati mogu pokazati niz biološki aktivnih osobina koje mogu imati blagotvoran uticaj na zdravlje čoveka. Stoga je ispitivanje dostupnosti i raspoloživosti potencijalnih bioaktivnih osobina nastalih hidrolizata bila sledeća faza u karakterizaciji proteinskih izolata kao nosača bioaktivnih jedinjenja.

#### **5.2.6. Biološke osobine inkapsulata nakon *in vitro* digestije**

Hidrolizati dobijeni *in vitro* digestijom, nakon enzimske hidrolize pepsinom i pankreatinom, mogu da poseduju različite biološke aktivnosti. Stoga, ispitan je sadržaj aktivnih komponenti (ukupni fenoli i betalaini) i njihova dostupnost u inkapsulatima, kao i antioksidativna, antidijabetska i antihipertenzivna aktivnost.

##### **5.2.6.1. Sadržaj i dostupnost aktivnih komponenti u hidrolizatima inkapsulata**

Cilj inkapsulacije jeste da zaštiti aktivne komponente od spoljnih uticaja kao što su svetlost, toplota, vlaga i tako spreči njihovu degradaciju. Osim toga, inkapsulacijom je moguće obezbediti transport i prolazak aktivnih komponenti kroz digestivni trakt čoveka i omogućiti

njihovu dostupnost na ciljanim mestima delovanja. U dobijenim inkapsulatima prisutne polifenolne komponente i betalaini skloni su degradaciji prilikom izloženosti enzimima pri čemu gube svoju aktivnost i nutritivnu vrednost. S obzirom, da su ove komponente sadržane u SC koji je inkapsuliran u proteinskom nosaču, praćen je njihov sadržaj i dostupnost u hidrolizatima inkapsulata. Sadržaj polifenola i betalaina izražena je u mg GAE/betalaina po g inkapsulata, dok je dostupnost izražena u procentima (Tabela 13).

Sadržaj ukupnih fenola se značajno razlikuje ( $p < 0,05$ ) u zavisnosti od tehnike inkapsulacije koja je primenjena u ovom radu. Inkapsulati pre prolaska kroz GIT imaju značajan sadržaj ukupnih fenola (59 mg GAE/g za FD inkapsulat i 51 mg GAE/g za SD inkapsulat). Nakon *in vitro* digestije sadržaj ukupnih fenola je smanjen (13 mg GAE/g za FD inkapsulat i 19 mg GAE/g za SD inkapsulat). Dostupnost fenolnih komponenti nakon prolaska inkapsulata kroz GIT iznosi oko 22% za FD hidrolizat, dok je kod SD hidrolizata još izraženija sa 37%. Ovakvi rezultati pokazuju da PI korišćen kao nosač u inkapsulaciji SC može da zaštiti u velikoj meri fenolne komponente od degradacije prilikom izloženosti uslovima GIT-a. Dostupne fenolne komponente imaju potencijal da budu apsorbovane u krvotok odakle se dalje transportuju na ciljana mesta delovanja. Poznato je da su polifenoli jako dobri antioksidanti pa svojim prisustvom mogu da doprinesu antioksidativnoj aktivnosti inkapsulata i tako unaprede njihovu potencijalnu primenu u ishrani čoveka (*de Morais i sar., 2020*).

Tabela 13. Dostupnost ukupnih fenola i betalaina pre i nakon *in vitro* digestije u inkapsulatima dobijenim tehnikama freeze i spray drying

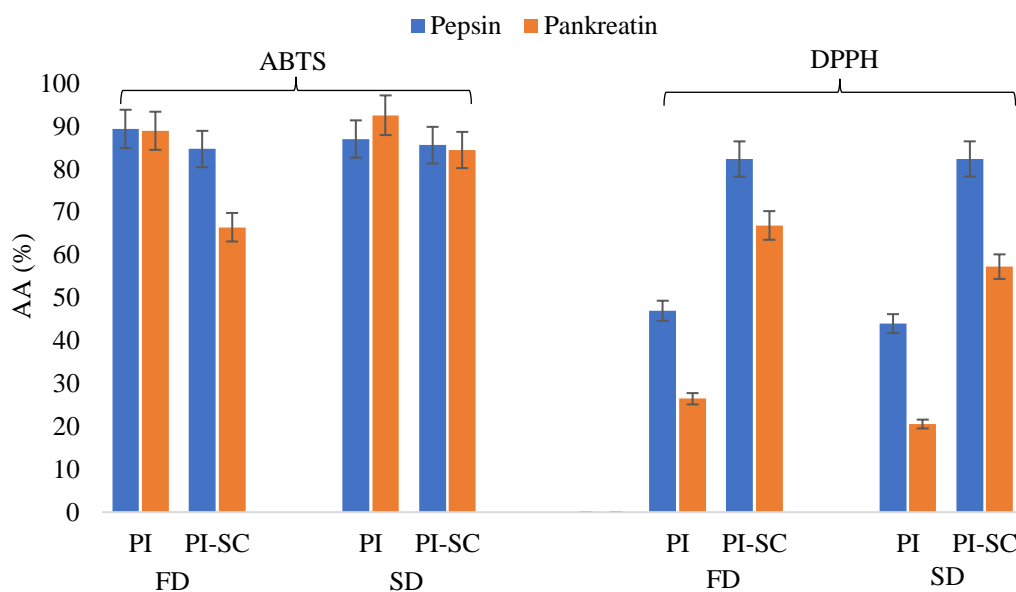
	<i>PI-SC</i>	
	<i>Freeze drying</i>	<i>Spray drying</i>
<b><i>UF (mg GAE/g inkapsulata)</i></b>		
<b><i>Pre GIT</i></b>	59,43 ± 0,49 <sup>b</sup>	50,77 ± 0,25 <sup>a</sup>
<b><i>Posle GIT</i></b>	13,24 ± 0,26 <sup>a</sup>	18,94 ± 0,14 <sup>b</sup>
<b><i>Dostupnost (%)</i></b>	<b>22,28 ± 0,41<sup>a</sup></b>	<b>37,30 ± 0,13<sup>b</sup></b>
<b><i>Betalaini (mg/g inkapsulata)</i></b>		
<b><i>Pre GIT</i></b>	2,27 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,09 <sup>a</sup>
<b><i>Posle GIT</i></b>	0,30 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b><i>Dostupnost (%)</i></b>	<b>13,22 ± 0,25<sup>b</sup></b>	<b>9,84 ± 0,25<sup>a</sup></b>

Vrednosti u istim redovima statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Betalaini imaju isti sadržaj u inkapsulatima pre digestije bez obzira na tehniku inkapsulacije i on iznosi oko 2 mg/g inkapsulata. Nakon *in vitro* digestije, sadržaj betalaina je smanjen na 0,30 mg/g inkapsulata za FD i 0,25 mg/g inkapsulata za SD. U odnosu na fenolne komponente dostupnost betalaina u inkapsulatima nakon *in vitro* digestije je mnogo manja, svega 13% za FD i 9% za SD inkapsulate. Manja dostupnost kod SD inkapsulata je povezana i sa gubitkom dela crvenih pigmenata tokom inkapsulacije zbog izloženosti visokim temperaturama u struji toplog vazduha. Tokom digestije betalaini se u velikoj meri razgrađuju jer predstavljaju jako osetljive pigmente naročito na promene pH, što prati proces digestije.

### 5.2.6.2. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost (AA) digesta praćena je metodama neutralizacije DPPH• radikala i ABTS+ katjon radikala. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 34. Prema rezultatima svi uzorci poseduju antioksidativnu aktivnost posle obe faze digestije. sa različitim vrednostima za primenjene testove. U slučaju PIe antioksidativna aktivnost potiče od peptida (ili hidrolizata) koji nastaju delovanjem enzima.



Slika 34. Antioksidativna aktivnost hidrolizata proteinskog izolata tikve i inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu nakon *in vitro* digestije

Kod ABTS metode vrednosti antioksidativne aktivnosti za oba PI su oko 90% posle svake faze (pepsin i pankreatin) digestije. Visoke vrednosti AA su u korelaciji sa DH koji ukazuje na velike peptidne frakcije tj. veliku koncentraciju peptida koji poseduju antioksidativnu

aktivnost. Digesti SD inkapsulata imaju izraženu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala sa visokom AA vrednosti od oko 85%. Aktivnost dobijenih digesta se ne narušava tokom digestije jer je aktivnost oslobođena tokom pepsinske digestije zadržana i nakon digestije sa pankreatinom. Digesti FD inkapsulata pokazuju drugačije ponašanje u odnosu na prethodno opisan uzorak. Posle prve faze digestije (pepsin) AA iznosi 85%. dok posle druge faze (pankreatin) digestije dolazi do blagog pada aktivnosti na 66%. Uzrok pada aktivnosti može biti promena pH tokom digestije koja utiče na merenje aktivnosti i degradacije fenolnih komponenti koje potiču od soka cvekle koje nose deo AA aktivnosti pored oslobođenih peptide iz nosača.

Kod DPPH metode uzorci pokazuju drugačije ponašanje u odnosu na prethodno opisane uzorke. Svi uzorci dobijeni posle *in vitro* digestije pokazuju određeni nivo AA ali sa padom aktivnosti posle druge faze tj. digestije sa pankreatinom. Ovakav obrazac ponašanja može biti iz više razloga. Jedan od njih jeste rastvarač koji se koristi u testu i afinitet između reaktivnih grupa uzorka i antioksidansa. DPPH reagens je rastvorljiv u organskim rastvaračima pa samim tim metoda ima veći afinitet prema hidrofobnim uzorcima. pa je manje efektivan prema hidrofilnim antioksidansima kao što su digesti (Popović i sar., 2017). Pored toga, dobijeni digesti pokazuju sposobnost za neutralizaciju DPPH• radikala. Vrednosti AA za oba PI su oko 45 % posle prve faze digestije, a oko 25 % posle druge faze digestije. Digesti FD i SD inkapsulata pokazuju isto ponašanje, aktivnost posle digestije pepsinom je oko 82 % nakon čega opada na 60 % posle digestije sa pankreatinom. U odnosu na njihove PIe digesti inkapsulata pokazuju veću AA koja potiče od oslobođenih peptida iz proteinskog nosača i fenolnih jedinjenja iz aktivne komponente.

Prema opisanim rezultatima pokazano je da proteinski izolat uljane pogače tikve može biti dobar nosač bioaktivnih jedinjenja i omogućiti njihov transport kroz gastrointestinalni trakt sa sposobnošću postepenog oslobađanja aktivnih jedinjenja i mogućnošću da ih zaštite od reakcija oksidacije. Osim toga, proizvodi kao što su inkapsulati mogu biti potencijal za funkcionalnu hranu jer prolaskom kroz GI trakt pokazuju dobre antioksidativne osobine. Slično zapaženje opisao je Liu i sar. (2016) za protein surutke kao nosača u inkapsulaciji kurkumina.

### 5.2.6.3. Antihipertenzivna aktivnost

Antihipertenzivna aktivnost ispitana je kao sposobnost aktivne komponente da inhibira enzim *angiotenzin I konvertaza (ACE)*. Sposobnost jedinjenja da inhibira ACE enzim pruža mogućnost potencijalne primene ovih jedinjenja u terapijske svrhe kao što je sprečavanje hipertenzije. Prema literaturi poznato je da proteinskih hidrolizata deluju kao ACE inhibitori za razliku od njihovih nativnih proteina i najčešće su to peptidi malih molekulskih masa, sa manje od 20 aminokiselina u svojim sekvencama (*Vaštag i sar., 2013*). Na osnovu toga, očekivano je uzorci koji prođu digestivni trakt u nekoj meri poseduju ACE inhibitornu aktivnost jer ovako nastali hidrolizati su predstavljaju male peptide koji su dostupni da se apsorbuju u krvotok i ispolje svoje delovanje. Antihipertenzivna aktivnost uzoraka određivana je nakon potpune *in vitro* digestije, hidrolize pepsinom i pankreatinom. Izražena je preko  $IC_{50}$  ( $\mu$ L) vrednosti digesta i prikazana je u Tabeli 14.

Tabela 14. ACE inhibitorna vrednost hidrolizata proteinskih izolata tikve i inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu tikve nakon *in vitro* digestije, izražena kao  $IC_{50}$

	$IC_{50}$ ( $\mu$ L)	
	PI	PI-SC
<i>Freeze drying</i>	14,85 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	23,98 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
<i>Spray drying</i>	16,63 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	22,45 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>

Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija ( $n = 3$ ).

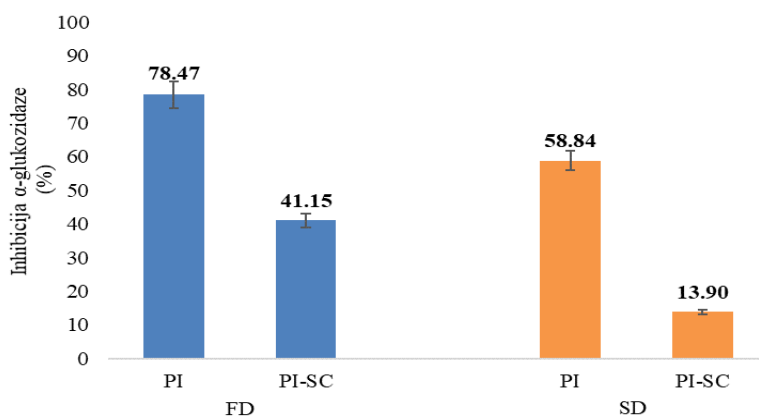
Dobijeni rezultati pokazuju da PI nakon *in vitro* digestije tj. dobijeni hidrolizati poseduju značajnu ACE inhibitornu aktivnost sa  $IC_{50}$  vrednostima od 14,85  $\mu$ L za FD i 16,63  $\mu$ L za SD. Oslobođanje hidrolizata iz PI tikve koji pokazuju ovu inhibitornu aktivnost je očekivano jer je u prethodnim istraživanjima dokazana ACE inhibitorna aktivnost proteina tikve nakon hidrolize pojedinih proteaza (*Popović i sar., 2017; Vaštag i sar., 2013*). Na osnovu ovih rezultata moglo se očekivati da i hidrolizati inkapsulata mogu da prolaskom kroz GIT poseduju sposobnost inhibicije ACE zbog prisustva PI tikve. Prikazane vrednosti  $IC_{50}$  ACE inhibitornog potencijala hidrolizata inkapsulata su za FD 23,98  $\mu$ L i 22,45  $\mu$ L za SD. Ove vrednosti pokazuju da dobijeni hidrolizati inkapsulata imaju slabiju ACE inhibitornu aktivnost u odnosu na sam PI koji se koristi kao nosač u inkapsulaciji. Jedan od razloga može biti manja

koncentracija proteina u odnosu na čist PI pa samim tim i manja zastupljenost hidrolizata koji nose ovu aktivnost. Takođe je moguće da prisustvo aktivnih komponenti iz SC umanjuje dostupnost enzima aktivnim centrima supstrata i tako ispoljavaju manju aktivnost. Međutim, ipak prisutna ACE inhibitorna aktivnost u inkapsulatima nakon njihovog prolaska GIT-a govori u prilog potencijalu ovih proizvoda u lečenju ili prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, dokazan je i potencijal primene proteina kao nosača u procesu inkapsulacije jer se na taj način dobijaju visoko nutritivni i biološki aktivni proizvodi koji mogu da imaju značajan potencijal u ljudskoj primeni. Obe tehnike inkapsulacije daju slične rezultate pa možemo reći da tehnika inkapsulacije nema značajnog uticaja ( $p > 0,05$ ) na ACE inhibitornu aktivnost finalnog proizvoda.

U prilog tome, govori i istraživanje *Vidović i sar. (2014)* gde ekstrakti *Satureje* na proteinskom nosaču imaju bolju aktivnost nego na nekom šećeru.

#### 5.2.6.4. Antidijabetska aktivnost

Antidijabetska aktivnost hidrolizata inkapsulata ispitana je kao sposobnost aktivne komponente da inhibira enzim  $\alpha$ -glukozidazu. Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze imaju mogućnost primene u terapiji i ishrani ljudi koji boluju od dijabetesa jer inhibicijom ovog enzima sprečavaju razgradnju skroba do glukoznih jedinica koje tako povećavaju nivo šećera u krvi. S obzirom, da je  $\alpha$ -glukozidaza prisutna u tankom crevu sposobnost inhibicije ovog enzima praćena je nakon prve faze digestije tj. *in vitro* digestije pepsinom. Inhibitorna sposobnost inkapsulata nakon pepsina izražena je procentom inhibicije (%) i prikazana na Slici 35.



Slika 35. Inhibitorna aktivnost hidrolizata proteinskih izolata tikve i inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu tikve nakon *in vitro* digestije

Sintetički inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze koji se koriste u terapijske svrhe su najčešće šećeri ili derivati šećerne komponente, koje svojim delovanjem ostavljaju veliki broj neželjenih efekata po zdravlje čoveka. Stoga, potreba za inhibitorima prirodnog porekla je sve izraženija. Veliki broj jedinjenja prirodnog porekla kao što su polifenoli, flavonoidi, tanini dokazano deluju kao dobri inhibitori (Gonçalves i sar. 2011; You i sar. 2012). Međutim, najnovija istraživanja pažnju usmeravaju na peptide kao inhibitore  $\alpha$ -glukozidaze, naročito peptida iz hrane (Lacroix i Li-Chan 2013; Ren i sar. 2016).

Prikazani rezultati (Slika 35) ukazuju na sposobnost oslobađanja peptida koji imaju izraženu inhibitornu sposobnost nakon delovanja enzima gastro faze tj. pepsina. Inhibitorna aktivnost PI nakon pepsina je izražena sa velikim procentom inhibicije, od 78% za FD i 59% za SD. Bez obzira na tehniku sušenja izolata. njegovom digestijom sa pepsinom dobijaju se peptidne frakcije koje izražavaju aktivnost sa preko 50% inhibicije. Sa druge strane, inkapsulati nakon digestije sa pepsinom imaju manju inhibitornu aktivnost u odnosu na njihov PI. Procenat inhibicije za PI-SC hidrolizata iznosi 41% za FD i 14% za SD. Delimično visoka inhibitorna sposobnost digesta FD inkapsulata potiče od peptida koji se oslobađaju iz proteinskog nosača prisutnog u inkapsulatu, ali i polifenolnih komponenti iz soka cvekle. U slučaju hidrolizata SD inkapsulata postignuta je značajno manja aktivnost, što može biti i od delimične degradacije fenolnih komponenti iz soka cvekle. Ovakvi rezultati sugerišu da peptidi koji se oslobode nakon prolaska kroz želudac imaju potencijal da regulišu nivo glukoze u krvi zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibiraju enzim  $\alpha$ -glukozidazu i spreče dalju razgradnju ugljenih hidrata u crevima.

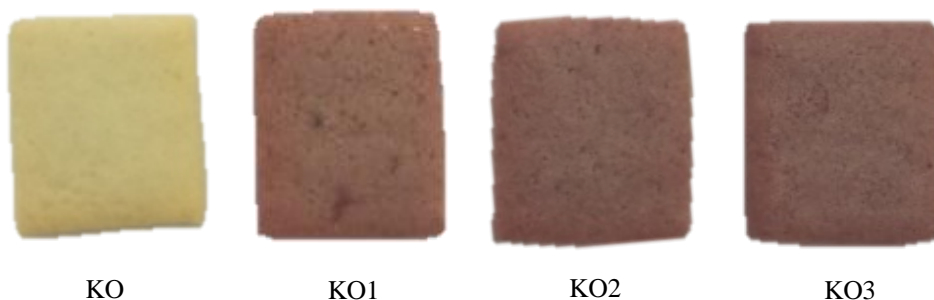


### 5.3. Ugradnja proteinskih formulacija u matriks

U ovom poglavlju disertacije akcenat je na implementaciji inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu tikve u matriks. Kao matriks izabrano je čajno pecivo u koje je ugradnja inkapsulata rađena na tri nivoa koncentracije. Dobijenim keksima ispitivane su fizičko-hemijske osobine, kao i senzorska ocena i stabilnost tokom skladištenja imitirajući realne uslove. Takođe, ispitana je svarljivost primenom metode *in vitro* digestije. U dobijenim hidrolizatima ispitana je dostupnost bioaktivnih jedinjenja, kao i bioaktivnosti koje nastaju prolaskom keksića kroz uslove digestivnog trakta.

Na osnovu obrađenih fizičkih i bioloških karakteristika inkapsulata dobijenih FD i SD tehnikom izabran je FD inkapsulat, soka cvekle na proteinskom izolatu uljane pogače tikve dobijenog *freeze drying* tehnikom, kao način fortifikacije prehrambenog matriksa, a u cilju kreiranja proizvoda unapređenih bioloških, nutritivnih i teksturnih osobina. Za matriks je odabrano čajno pecivo (keks) kao jedan od proizvoda koji se koriste u svakodnevnoj ishrani i konzumaciji.

Čajno pecivo je formulisano sa određenim nivoom supstitucije pšeničnog brašna inkapsulatom u cilju dobijanja proizvoda koji zadovoljava senzorske i fizičko-hemijske karakteristike ovakvih proizvoda. Supstitucija je izvršena na tri nivoa: sa 10 % (KO1), 15 % (KO2) i 20 % (KO3) FD inkapsulata (Slika 36). Obogaćeni keksi upoređivani su sa kontrolnim keksom sa pšeničnim brašnom (KO) u cilju ispitivanja potencijala dobijanja keksa kao funkcionalnog proizvoda koji bi ugrađeni inkapsulat unapredio svojim biološkim osobinama.



Slika 36. Čajno pecivo na keksa obogaćenog sa 10% (KO1), 15% (KO2) i 20% (KO3) inkapsulata soka cvekle na proteinskom izolatu tikve dobijenih *freeze drying* tehnikom

### 5.3.1. Fizičke karakteristike

Sva čajna peciva su pripravljena oblikovanjem testa u četvrtastim modlama (dužine 40,20 mm i širine 30,10 mm) približno jednake debljine i težine i pri istim uslovima pečenja, standardnim za ovakav tip proizvoda. Tokom pečenja kao i kod svakog brašeno-konditorskog proizvoda dolazi do promena u dimenzijama, kao i narastanja i širenja ili skupljanja samog testa. Dimenzione karakteristike i procenat kontrakcije i širenja testa nakon pečenja prikazane su Tabeli 15.

Iz Tabele 15 se vidi da su svi uzorci približno istih dimenzija bez značajnih statističkih razlika ( $p > 0,05$ ). Najveće promene uočene su u procentu širenja i kontrakcija keksića, gde je uočena značajna statistička razlika ( $p < 0,05$ ) kod keksa sa inkapsulatom (KO1, KO2, KO3) u odnosu na kontrolni uzorak (KO). Procenat širenja testa je jedna od najvažnijih karakteristika za određivanje kvaliteta brašna za proizvodnju keksića. Veći procenat širenja proizvoda je posledica malog kapaciteta zadržavanja vode, pa su samim tim proizvodi sa većim vrednostima procenta širenja poželjniji od onih sa nižim vrednostima. Obogaćeni keksovi imaju veći procenat širenja u odnosu na kontrolni uzorak što ukazuje da inkapsulati imaju niži kapacitet zadržavanja vode od pšeničnog brašna, što je poželjno svojstvo u konditorskoj industriji.

Tabela 15. Fizičke karakteristike čajnog peciva obogaćenog inkapsulatima soka cvekle na proteinskom izolatu tikve

Uzorak	Težina (g)	Dužina (mm)	Širina (mm)	Visina (mm)	Širenje (%)	Kontrakcija (%)
KO	4,85 ± 0,14 <sup>a</sup>	41,80 ± 0,90 <sup>a</sup>	32,40 ± 0,30 <sup>a</sup>	11,50 ± 0,30 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,08 <sup>a</sup>	-7,57 ± 1,01 <sup>a</sup>
KO1	4,70 ± 0,09 <sup>a</sup>	43,50 ± 0,90 <sup>a</sup>	33,60 ± 0,70 <sup>a</sup>	10,50 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,08 <sup>a</sup>	-11,56 ± 2,39 <sup>b</sup>
KO2	4,84 ± 0,07 <sup>a</sup>	44,80 ± 0,80 <sup>a</sup>	33,70 ± 0,40 <sup>a</sup>	10,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,14 ± 0,02 <sup>a</sup>	-12,03 ± 1,25 <sup>b</sup>
KO3	4,56 ± 0,07 <sup>a</sup>	44,60 ± 0,50 <sup>a</sup>	34,10 ± 0,30 <sup>a</sup>	10,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	3,22 ± 0,06 <sup>a</sup>	-13,36 ± 0,98 <sup>b</sup>

Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Još jedna od osobina koja je važna prilikom karakterisanja proizvoda kao što je keks, kao potencijalnog funkcionalnog proizvoda koji može da obogati i unapredi postojeće tržište, jeste boja. To je jedna od najbitnijih fizičkih karakteristika prehrambenih proizvoda jer od nje jednim delom zavisi senzorska ocena proizvoda. Boja čajnog peciva okarakterisana je kroz parametre  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  koji su prikazani u Tabeli 16.

Tabela 16. CIE Lab hromatski parametri čajnog peciva obogaćenog inkapsulatima soka cvekle na proteinskom izolatu tikve

Uzorak	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Tvrdoća keksa (g)	
<b>KO</b>	76,70 ± 0,31 <sup>a</sup>	-0,51 ± 0,13 <sup>d</sup>	28,36 ± 0,18 <sup>a</sup>	8063 ± 275 <sup>Ab</sup>	6237 ± 764 <sup>Bb</sup>
<b>KO1</b>	44,68 ± 0,96 <sup>b</sup>	14,32 ± 1,04 <sup>c</sup>	22,65 ± 0,84 <sup>b</sup>	6829 ± 515 <sup>Ab</sup>	5288 ± 2046 <sup>Ab</sup>
<b>KO2</b>	38,93 ± 0,19 <sup>c</sup>	16,97 ± 0,44 <sup>b</sup>	18,37 ± 0,68 <sup>c</sup>	7650 ± 1202 <sup>Ab</sup>	7045 ± 397 <sup>Ab</sup>
<b>KO3</b>	37,02 ± 0,21 <sup>d</sup>	17,82 ± 0,83 <sup>a</sup>	17,51 ± 0,31 <sup>d</sup>	9187 ± 190 <sup>Aa</sup>	8963 ± 462 <sup>Aa</sup>

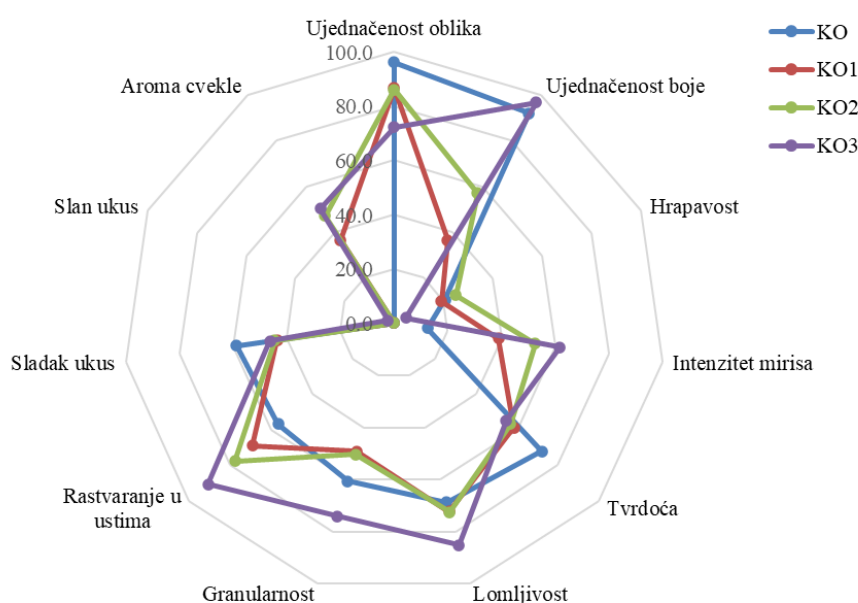
Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Obogaćeni keksi imaju izraženu crvenu do braon boju koja potiče od betalaina- pigmenata iz soka cvekle. U prilog tome ukazuje i povećanje parametra  $a^*$  sa povećanjem udela inkapsulata u proizvodu. Vrednost parametra  $a^*$  za KO iznosi  $-0,51 \pm 0,13$ , dok je za obogaćene kekse povećanje linearno zavisno od povećanja nivoa supstitucije. Takođe, braon boja keksa može biti i proizvod Maillard-ove reakcije koja nastaje između proteina iz inkapsulata i pšeničnog brašna i prisutnih šećera tokom pečenja. Nasuprot tome, vrednost parametara  $L^*$  i  $b^*$  značajno opada ( $p < 0,05$ ) sa povećanjem udela inkapsulata u proizvodu. Isti trend u vrednostima parametara  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  pokazali su sami inkapsulati, opisani u prethodnom poglavlju, kod kojih je takođe zapaženo povećanje parametra  $a^*$  sa smanjenjem parametara  $L^*$  i  $b^*$  (Čakarević i sar., 2020).

Tvrdoća je još jedan važan fizički parametar koji ukazuje na kvalitet proizvoda. Određuje se kao vršna sila koja dovodi do pucanja keksa tokom merenja i treba da bude dovoljno visoka da keks ne pukne tokom transporta i dovoljno mala da keks lako pukne tokom konzumiranja (Dapčević-Hadnađev i sar., 2013). Rezultati ispitivanja tvrdoće dobijenih čajnih proizvoda prikazani su u Tabeli 16. Kod obogaćenog keksa se zapaža da se tvrdoća keksa povećava sa povećanjem udela inkapsulata. Kontrolni uzorak ima tvrdoću veću od KO1 i KO2, dok je manja od KO3 ( $p < 0,05$ ). Dosadašnja istraživanja pokazala su da je tvrdoća keksa povezana sa interakcijom vode sa skrobom i proteinima i međusobnog dejstva sastojaka brašna u formulaciji (Giuberti i sar., 2018). Visoke vrednosti tvrdoće izmerene za KO3 u poređenju sa KO mogu biti povezane sa sadržajem proteina, a veći sadržaj proteina doprinosi stvaranju tvrde strukture. Tvrdoća keksa merena je i nakon perioda skladištenja, što će biti opisano u nastavku.

### 5.3.2. Senzorska ocena

Senzorska ocena čajnih peciva okarakterisana je ispitivanjem definisanih svojstava od strane ispitivača. Ispitivanjem senzorskih osobina dolazi se do podataka o celokupnom utisku i dopadljivosti proizvoda od strane potrošača. Uvođenje novih sastojaka u formulaciju hrane moglo bi imati negativan uticaj na prihvatanje proizvoda od strane potrošača, pa je senzorska ocena neophodna pri formulaciji novih proizvoda. Ocenjivanje je sprovedeno od strane treniranih panelista uz primenu hedonske skale sa 6 kategorija (od 0 do 100), sa skalom ocenjivanja od 0= izuzetno mi se ne dopada, 50= niti mi se dopada. niti mi se ne dopada, 100= izuzetno mi se dopada. Rezultati senzorske ocene čajnih peciva prikazani su dijagramom “pauk” (Slika 37).



Slika 37. Senzorska ocena čajnog peciva primenom testa dopadljivosti

Na osnovu prikazanog grafika senzorskih karakteristika možemo uočiti značajnu razliku u pojedinim parametrima obogaćenog keksa u odnosu na kontrolni keks. Izgled “paukove mreže” za KO se najviše razlikuje u odnosu na “paukovu mrežu” obogaćenog keksa u sledećim karakteristikama: aroma cvekle i intenzitet mirisa koji prevladavaju zbog prisustva inkapsulata. Svojstva kao što su rastvaranje u ustima, tvrdoća i lomljivost keksa izraženija su kod obogaćenih keksova u odnosu na KO, što je prednost jer prilikom konzumiranja keksa se brzo usitnjava, rastvara i oslobađa svoje arome i potencijalne biološke aktivnosti. Nasuprot

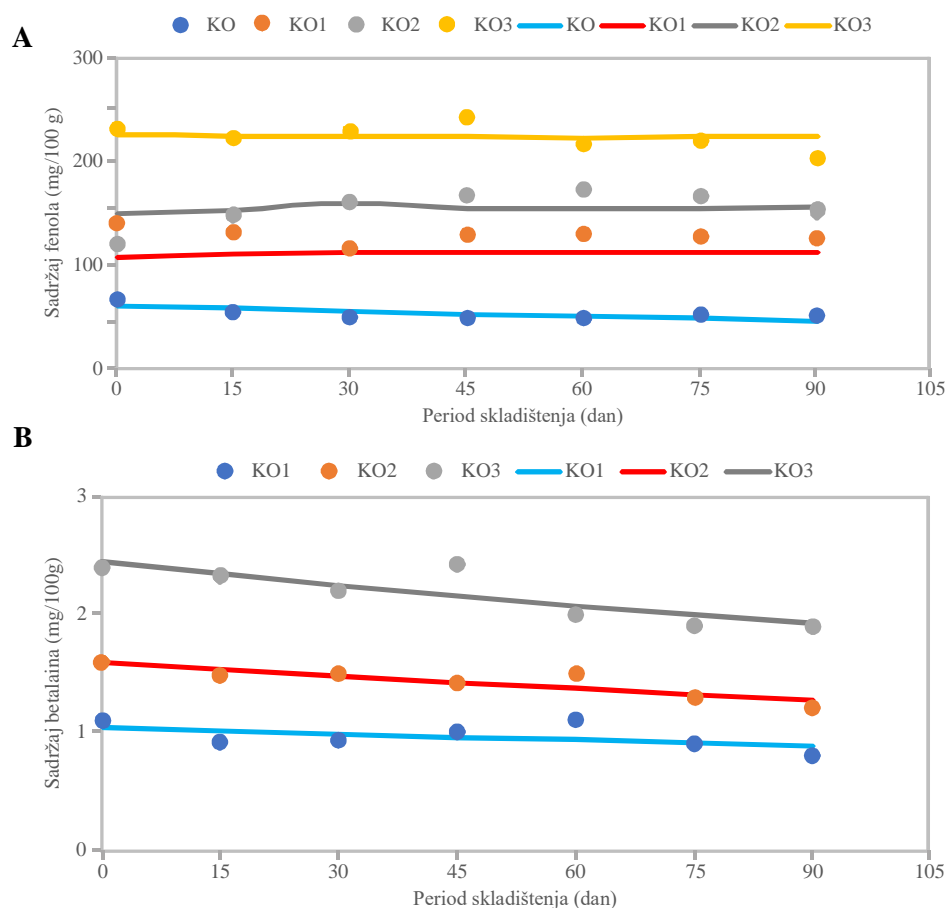
tome, slatkoća obogaćenog keksa je manje izražena u odnosu na KO što je nedostatak ovakvog proizvoda kao funkcionalnog sa potencijalnom primenom u prilagođenoj ishrani ljudi kao što su dijabetičari zbog povećane potreba za dodatkom šećera da bi se dostigla potrebna slatkoća. Granularnost je najviše izražena kod KO3 keksa što je posledica veličine čestica inkapsulata, čiji je volumetrijski srednji prečnik 201,37  $\mu\text{m}$ , dok čestice pšeničnog brašna imaju približni prečnik oko 50  $\mu\text{m}$  (Bian i sar., 2015). Takođe, granulometrijska svojstva inkapsulata tj. neujednačenost veličine čestica, utiču na hrapavost proizvoda koja se potpuno razlikuje za svaku formulu obogaćenih keksa, što znači da prilikom zamesa dolazi do nejednake umešanosti čestica. Jedan od načina rešenja ovog problema jeste prethodno prosejavanje i ujednačavanje veličine čestica inkapsulata. Svi keksovi imaju slabo izražen slan ukus koji i treba da bude najmanje izražen u ovakvoj formuli proizvoda. Ujednačenost oblika je najviše izražena kod KO keksa, KO1 i KO2 imaju isti nivo izraženosti ovog svojstva, dok ta ujednačenost najviše odstupa kod KO3. Ujednačenost boje je najviše izražena kod KO3 za koju možemo reći da je potpuna, potom sledi KO2 koji zadovoljava, dok je najmanja ujednačenost boje kod KO1, što je u skladu sa udelom dodatih inkapsulata u formuli. Prema opisanim rezultatima KO3 je najbliži kontrolnom keksu, što odgovara standardima formuli čajnih peciva, i kao takav ima potencijal da bude novi funkcionalni prehrambeni proizvod, a senzorska ocena govori u prilog tome.

### 5.3.3. Promene tokom skladištenje

Spoljni faktori kao što su svetlost, temperature, kiseonik, vlaga, itd. mogu u potpunosti da promene proizvod tokom nekog vremenskog perioda. S tim u vezi, svaki proizvod mora da ima određene uslove skladištenja i čuvanja. Stoga je važno pratiti promene koje mogu nastati tokom nekog perioda skladištenja i koje mogu da utiču na kvalitet proizvoda.

U okviru ovih istraživanja, ispitivanje skladištenja čajnih peciva praćeno je ispitivanjem različitih svojstava koja mogu da utiču na kvalitet proizvoda tokom 3 meseca. Nakon pečenja svaki keks je pakovan u polipropilenske folije i čuvan u papirnim kutijama bez uticaja svetlosti, na sobnoj temperaturi tokom 90 dana. U keksovima su određivane prisutne aktivne komponente betalaini i ukupni fenoli, na svakih 15 dana. Dok su tvrdoća i senzorska ocena analizirane, odmah nakon pečenja, i na kraju ukupnog perioda skladištenja, 90 dana.

Na Slici 38 su prikazani sadržaj aktivnih komponenti: ukupni fenoli i betalaini u keksićima tokom perioda skladištenja. Obzirom da uzorak bez inkapsulata (KO) ne sadrži betalaine, sadržaj betalaina je određivan samo u obogaćenim uzorcima. Može se videti da je i ukupan sadržaj fenola i sadržaj betalaina linearno zavisano sa udelom inkapsulata u keksu. S tim da sadržaj betalaina nije prisutan u KO jer potiče od soka cvekle. Tokom perioda skladištenja, sadržaj fenola u keksu bio je gotovo isti bez značajne degradacije ( $p > 0,05$ ). S druge strane, sadržaj betalaina je bio u blagom opadanju tokom perioda skladištenja i na kraju ispitivanog perioda skladištenja bio je za oko 20% manji do početnog. Betalaini su jako osetljivi pigmenti koji lako podležu degradaciji usled izloženosti spoljnim faktorima, kao što su svetlost i kiseonik. Promene vrednosti parametra ukupni fenoli i betalaini tokom procesa skladištenja prikazane su na Slici 38, eksperimentalno dobijene vrednosti su prikazane tačkama, a vrednosti dobijene kinetičkim modelom (jednačina 3.15) su prikazane punom linijom.



Slika 38. Kinetička studija promene vrednosti parametra (A) ukupni fenoli i (B) betalaini u toku procesa skladištenja

Koeficijenti regresije kinetičkih modela sumirani su u Tabeli 17 na osnovu trendova (brzina i intenzitet) procesa. U Tabeli 17 su prikazani stepeni prilagođavanja eksperimentalnih i

prediktivnih rezultata (dobijenih prema jednačinama 3.16 i 3.17), koji pokazuju kvaliteta uklapanja modela. Relativno niske vrednosti testova prilagođavanja  $\chi^2$ , RMSE, MBE, MPE, SSE i AARD, kao i to da je vrednost  $r^2$  bliska 1, ukazuju na to da predloženi modeli predstavljaju proces na zadovoljavajući način.

Tabela 17. Numerička verifikacija kinetičkih modela

	$\chi^2$	RMSE	MBE	MPE	SSE	AARD	$r^2$
	Ukupni sadržaj fenola						
<b>KO1</b>	30,563	4,179	0,040	7,395	122,240	30,332	0,537
<b>KO2</b>	642,479	19,161	17,191	12,997	501,216	103,199	0,540
<b>KO3</b>	398,892	15,098	-0,103	8,313	1595,492	86,245	0,317
	Ukupni sadržaj betalaina						
<b>KO1</b>	0,013	0,087	0,000	7,685	0,053	17,138	0,271
<b>KO2</b>	0,007	0,063	0,000	3,198	0,028	17,139	0,748
<b>KO3</b>	0,024	0,117	0,000	3,615	0,096	17,140	0,701

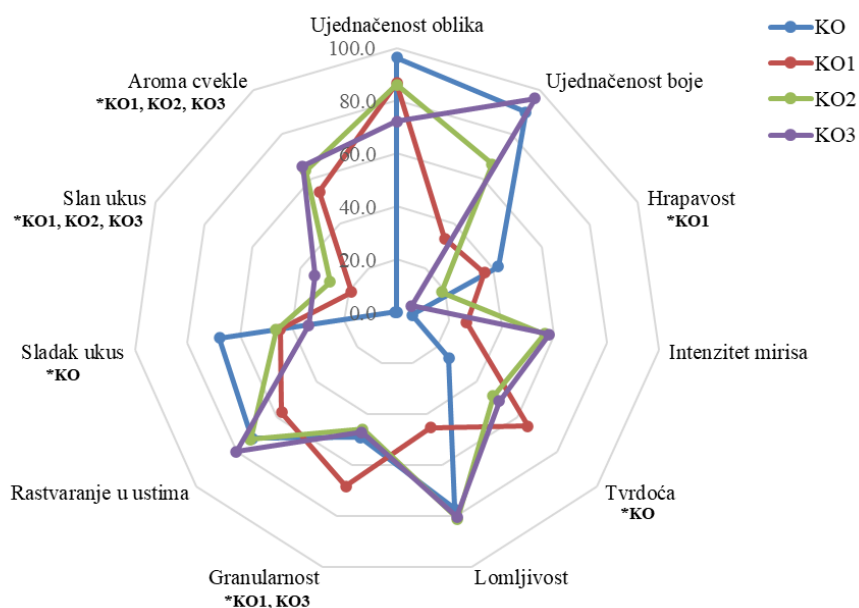
$\chi^2$  - redukovani hi-kvadrat, RMSE - koren kvadrata srednje greške, MBE - srednja greška odstupanja, MPE - srednja procentualna greška, SSE - suma kvadrata grešaka, AARD - prosečna apsolutna relativna devijacija,  $r^2$  - koeficijent determinacije,

Pošto tokom skladištenja nije došlo do značajne degradacije betalaina možemo reći da proces inkapsulacije na PI značajno utiče na stabilnost betalaina i da ih štiti od potpune degradacije. *Amjadija i sar. (2018)* su došli do istog zaključka tokom svojih istraživanja, u kojima su pokazali da je smanjena degradacija betalaina prilikom ugrađivanja u gumene bombone.

Tvrdoća kao jedna od najznačajnijih fizičkih karakteristika u ocenjivanju kvaliteta samog proizvoda merena je nakon ukupnog perioda skladištenja. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 16 tvrdoća keksa menja na isti način kao i kod svežeg keksa. tj. povećava se sa povećanjem udela inkapsulata. Međutim, kada se porede vrednosti tvrdoće svežeg keksa i nakon 3 meseca skladištenja vidi se da tvrdoća opada tokom vremena. Svi keksovi sa inkapsulatima pokazuju smanjenje tvrdoće tokom skladištenja, a kod KO keksa ovo smanjenje je statistički značajno ( $p < 0,05$ ). Ovo smanjenje u KO keksu je povezano sa raspodelom vode koja je dodavan u višku u formulaciju testa da bi se postiglo 23% vlage u testu. Optimalna vlaga za ovu vrstu testa, za čajna peciva je 18%. Testu za KO3 keks je jedino imalo sadržaj vlage 18%, pa se smatra kao najrelevantniji uzorak za procenu stabilnosti inkapsulata i konačnog proizvoda tokom skladištenja. Budući da smanjenje tvrdoće nije statistički značajno za ovaj uzorak tokom

skladištenja, može se reći da su inkapsulati uneti u keks potpuno stabilni i mogu omogućiti dobar kvalitet keksa.

Senzorska ocena keksa nakon perioda skladištenja ispitana je na isti način kao i za sveže uzorke. Takođe je prikazana dijagramom “paukova mreža” (Slika 39). Izgled “paukove mreže” za sve uzorke se razlikuje od one prikazane na Slici 37, što znači da je tokom skladištenja došlo do promene određenih svojstava keksa, što je naglašeno i na slici.



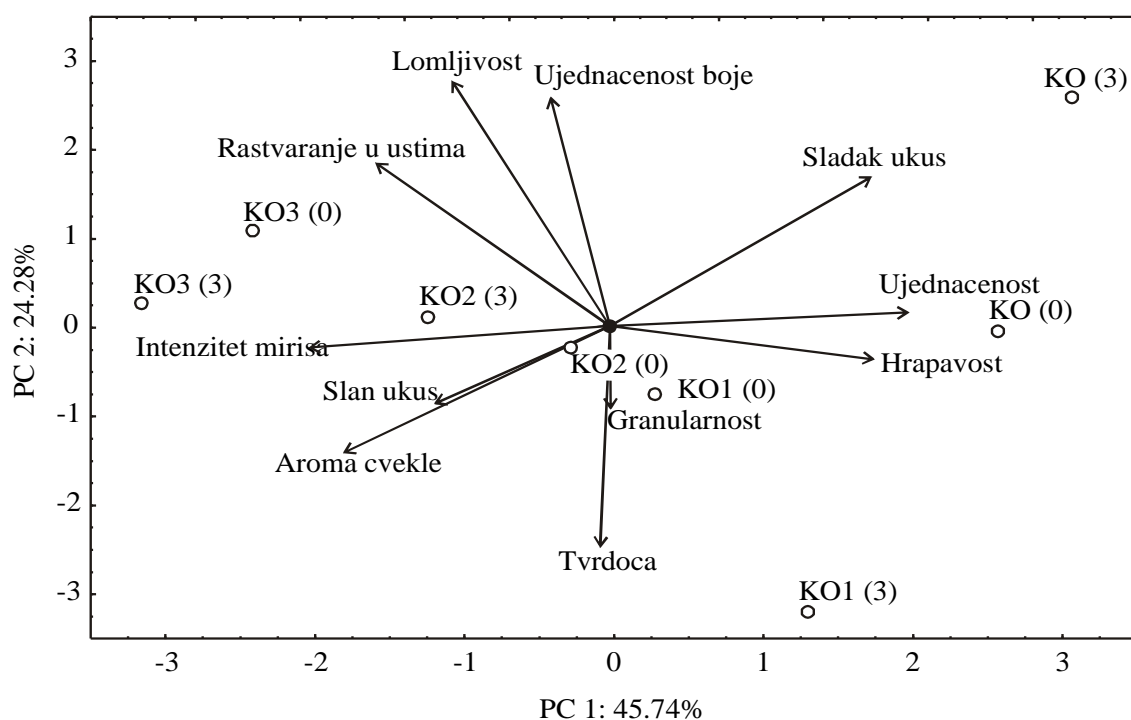
Slika 39. Senzorska ocena čajnog peciva nakon perioda skladištenja (3 meseca) primenom testa dopadljivosti

Najveća promena izražena je kod obogaćenih keksova za svojstva kao što su aroma cvekle i slan ukus. Prisustvo inkapsulata u formulacijama keksova uticala je tokom perioda skladištenja na pomenuta svojstva ( $p < 0,05$ ). Poznato je da je SC bogat mineralima, posebno jonima natrijuma i kalijuma (Wruss i sar., 2015), koji su odgovorni za slan ukus hrane. Prema tome, možemo tvrditi da promena u slanoći keksa obogaćenog inkapsulatima nastaje usled difuzije natrijumovih i kalijumovih jona iz SC u slobodnu vodu u testu. Promena je uočena i kod slatkoće uzoraka, kod KO se povećala, dok je kod KO3 uzorka u manjoj meri i smanjena, što može biti posledica izraženijeg slanijeg ukusa. Ujednačenost oblika i boje potpuno je nepromenjena u svim uzorcima tokom perioda skladištenja, što potvrđuje stabilnost betalaina



u inkapsulatima. Na osnovu opisanih rezultata, pokazano je da su dobijeni inkapsulati stabilni i da imaju veliki potencijal za obogaćivanje postojećih komercijalnih proizvoda u cilju poboljšanja njihovih svojstava koja mogu pozitivno uticati na zdravlje čoveka.

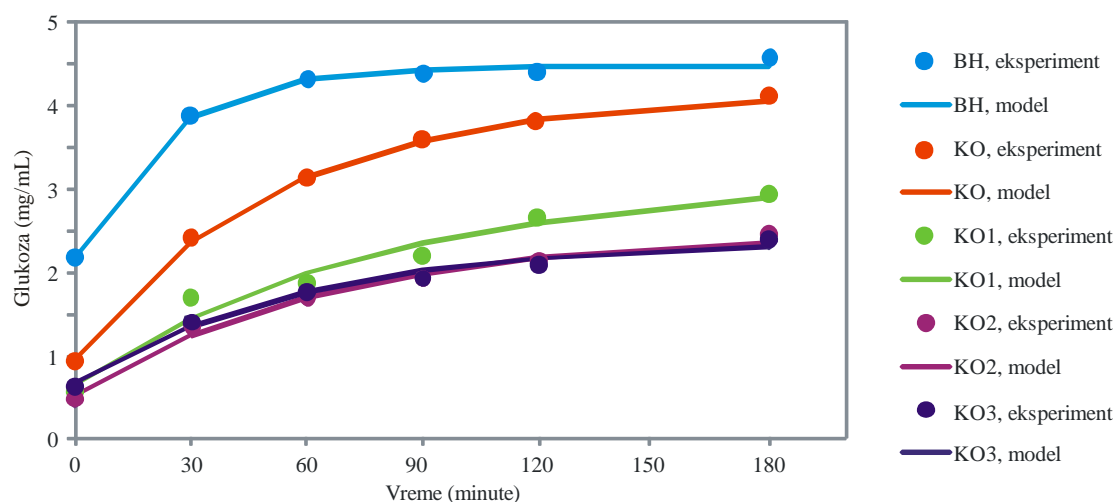
Grafičko prikazivanje trendova u senzorskoj oceni i uočavanje različitosti između uzoraka izvršeno je u prvoj faktorskoj ravni (faktorske koordinate 1 i 2), na osnovu sprovedene analize glavnih komponenta (Slika 40). Sa slike se uočava da prve dve faktorske koordinate prikazuju 70,02% ukupne varijabilnosti, što se smatra dovoljnim za prikaz celokupne varijabilnosti. Uzorci KO (početna vrednost i nakon 3 meseca) su pokazali povećanu vrednost slatkog ukusa, ujednačenosti i hrapavosti. Uzorci KO1 imaju povećanu tvrdoću i granularnost, dok uzorci KO3 imaju povećane vrednosti intenziteta mirisa, slanog ukusa, arome cvekle i rastvaranja u ustima. Nešto veće vrednosti lomljivosti, ujednačenosti i boje imaju uzorak KO nakon 3 meseca skladištenja i uzorak KO3 na početku procesa.



Slika 40. Grafički prikaz trendova za senzornu ocenu svežih čajnih keksića (označeno sa 0) i nakon perioda skladištenja od 3 meseca (označeno sa 3)

### 5.3.4. Glikemijski indeks

Glikemijski indeks hrane predstavlja broj koji ukazuje na vreme koje je potrebno da organizam hranu bogatu ugljenim hidratima pretvori u glukozu i time da poveća nivo šećera u krvi, nakon konzumiranja hrane. Određivan je praćenjem vremenskog toka hidrolize skroba, odnosno praćenjem koncentracije oslobođene glukoze, u uzorcima (Slika 41). Kao referentni uzorak korišćen je beli hleb (BH).



Slika 41. Kinetička studija promene vrednosti glukoze u toku procesa vremena

Krive hidrolize skroba uzoraka pokazuju da u prvom satu hidrolize (0-60 min) dolazi do naglog povećanja glukoze, koje se usporava u naredna dva sata (60-180 min). Ovo usporavanje oslobađanja glukoze vidi se zaravnavanjem krive koje je kod BH već nakon 60 min, dok kod obogaćenih keksova ono dolazi tek nakon 120 min. Nakon 60 min hidrolize najveća koncentracija glukoze oslobođena je iz BH, 4,3 mg/mL, a potom iz KO keksova, 3,14 mg/mL. Obogaćeni keksovi tokom hidrolize imaju manji stepen hidrolizovanog skroba, tj. mnogo je manja koncentracija nastale glukoze u odnosu na BH i KO. Koncentracija glukoze, oslobođene tokom hidrolize obogaćenih keksova, iznosi: 1,88 mg/mL za KO1, 1,70 mg/mL za KO2, 1,76 mg/mL za KO3. Prema ovim rezultatima, nivo inkapsulata u keksu nema značajnog uticaja na hidrolizu skroba jer je koncentracija nastale glukoze skoro ista u sve tri formulacije.

Numerička verifikacija modela koja pokazuje kvalitet uklapanja modela prikazana je u Tabeli 18, gde su prikazani stepeni prilagođavanja eksperimentalnih i prediktivnih rezultata (dobijenih prema jednačinama 3.16 i 3.17). Relativno niske vrednosti testova prilagođavanja  $\chi^2$ , RMSE,

MBE, MPE, SSE i AARD, kao i to da je vrednost  $r^2$  bliska 1, ukazuju na to da predloženi modeli predstavljaju proces na zadovoljavajući način.

Tabela 18. Numerička verifikacija kinetičkih modela

	$\chi^2$	RMSE	MBE	MPE	SSE	AARD	$r^2$
<b>BH</b>	0,014	0,049	0,000	0,846	0,014	0,221	0,996
<b>KO</b>	0,009	0,038	0,000	1,283	0,009	0,205	0,999
<b>KO1</b>	0,110	0,135	0,000	7,704	0,110	0,695	0,968
<b>KO2</b>	0,028	0,068	0,000	4,558	0,028	0,366	0,988
<b>KO3</b>	0,017	0,054	0,000	3,183	0,017	0,290	0,991

$\chi^2$  - redukovani hi-kvadrat, RMSE - koren kvadrata srednje greške, MBE - srednja greška odstupanja, MPE - srednja procentualna greška, SSE - suma kvadrata grešaka, AARD - prosečna apsolutna relativna devijacija,  $r^2$  - koeficijent determinacije,

Nakon fitovanja i izračunavanja površine ispod svake krive (AUC), određen je indeks hidrolize (HI) i očekivani glikemijski indeks (GI). Vrednosti HI nakon 180 min hidrolize i GI za svaki uzorak prikazane su u Tabeli 19. Vrednosti HI za obogaćene keksove kreću se u rasponu od 44 do 52, dok je HI kod uzorka sa belim brašnom dosta veći i iznosi 79. To znači da obogaćeni proizvodi imaju niži stepen hidrolize skroba u odnosu na kontrolni keks. Pretpostavlja se da do manjeg stepena hidrolize skroba dolazi usled inhibicije enzima  $\alpha$ -amilaze, koja razgrađuje skrob do maltoze i dalje na glukozne podjedinice. Osim toga, niži stepen hidrolize može biti i usled smanjenog sadržaja pšeničnog brašna u keksu u odnosu na BH jer je izvršena supstitucija brašna sa inkapsulatom. Na osnovu rezultata možemo pretpostaviti da su prisutni inkapsulati u keksovima izvor inhibitora  $\alpha$ -amilaze i utiču na smanjenje stepena hidrolize što se i odražava nižim indeksom hidrolize (Molinari i sar., 2018). Niže vrednosti HI ukazuju na niži GI, što svrstava ovaj proizvod u nutritivno poboljšanu hranu. Hrana se prema glikemijskom indeksu može klasifikovati kao hrana sa visokim GI ( $GI > 70$ ), sa srednjim ( $56 < GI < 69$ ) i sa niskim glikemijskim indeksom ( $GI < 55$ ) u odnosu na glukozu kao referentnu vrednost (Foster-Powell i sar., 2002). Prekomerno konzumiranje namirnica sa visokim GI može u velikoj meri narušiti zdravlje čoveka i dovesti do poremećaja kao što je gojaznost i time dovesti do fatalnih posledica. Rezultati pokazuju da čajna peciva obogaćena inkapsulatima mogu biti dobar izbor hrane zbog srednjeg GI, dok se KO keks smatra nutritivno lošim izborom hrane zbog visoke vrednosti GI. Inkorporiranje bioaktivnih jedinjenja kao što su fenoli, proteini, i korišćenjem brašna od celog zrna može značajno uticati na biodostupnost skroba i inhibiciju enzima odgovornih za hidrolizu skroba (Goh i sar., 2015; Sęczyk i sar.,

2015; Świeca i sar., 2014). Sve ovo predstavlja veliki potencijal proizvoda ovog tipa u ishrani ljudi kao konditorskog proizvoda jer ne dovodi do naglog porasta nivoa glukoze u krvi što ujedno smanjuje rizik od pojave dijabetesa.

Tabela 19. Indeks hidrolize i glikemijski indeks čajnog peciva obogaćenog inkapsulatima soka cvekle na proteinskom izolatu tikve

	<i>HI</i>	<i>GI</i>
<b>KO</b>	78.39 ± 0.53	82.75 ± 0.23
<b>KO1</b>	52.01 ± 0.05	68.26 ± 0.21
<b>KO2</b>	43.64 ± 0.05	63.67 ± 0.18
<b>KO3</b>	44.37 ± 0.25	64.07 ± 0.15

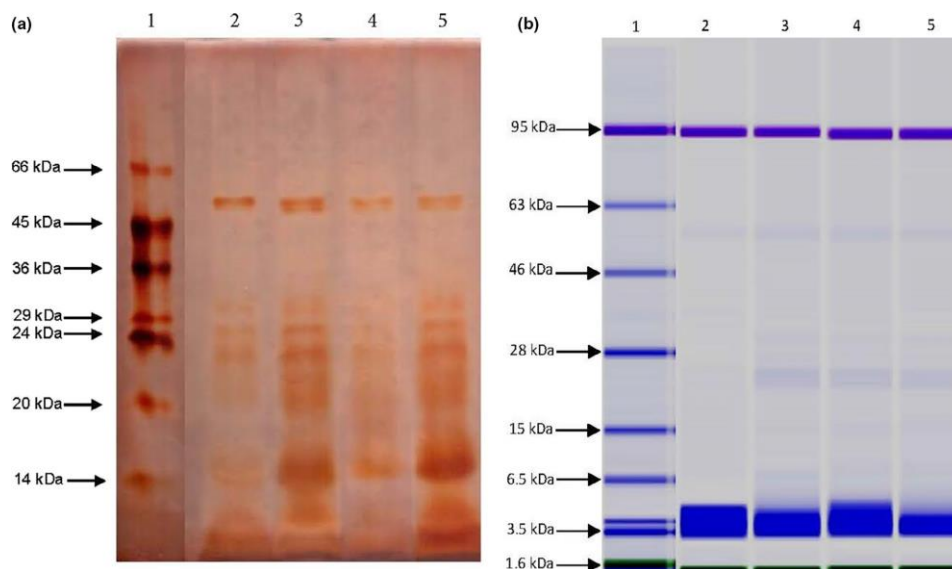
Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

### 5.3.5. *In vitro* digestija

Ispitivanje potencijalne primene obogaćenog keksa u ljudskoj ishrani nije potpuno bez određivanja njegove svarljivosti. Stoga, svarljivost keksa je određena metodom *in vitro* digestije, koja simulira uslove GIT-a čoveka, kojom je praćeno ponašanje keksića prilikom njegovog prolaska kroz GIT. U slučaju keksova, proces digestije je potpuno simuliran obuhvaćajući faze od usta do tankog creva, radi procene bioaktivnih efekata i dostupnosti aktivnih jedinjenja kada se bi keksić konzumirao direktno. Tokom digestije neophodno je razumeti kako proces varenja utiče na bioaktivnost uzorka, kada su aktivna jedinjenja izložena različitim uslovima sredine (pH i jonska jačina), prisustvu želudačnih i crevnih sokova kao i enzima.

U prethodno delu ovih istraživanja, pokazana je dobra svarljivost inkapsulata kojima je obogaćeno čajno pecivo, kao i otpornost bioaktivnih jedinjenja u inkapsulatima na uslove digestivnog trakta (Čakarević i sar. 2020). Slično ponašanje inkapsulata se očekuje i u realnom matriksu kao što je prehrambeni proizvod, pa je sa tim ciljem i ispitana svarljivost obogaćenih keksova.

*In vitro* digestija keksa praćena je elektroforezom i distribucija molekulskih masa dobijenih hidrolizata prikazana na Slici 42.



Slika 42. Elektroforetski profili čajnog peciva nakon *in vitro* digestije: (a) SDS gel; (b) Lab-on-a-Chip. Markeri molekulskih masa 1; KO 2; KO1 3; KO2 4; KO3 5

Slika 42a prikazuje elektroforetski profil hidrolizata *in vitro* digestije keksića dobijenih SDS gel elektroforezom sa distribucijom molekulskih masa od 14 do 66 kDa. Hidrolizati obogaćenih keksova (linije 3, 4, 5) pokazuju intenzivniju boju u odnosu na hidrolizat KO keksa (linija 2), što ukazuje na prisustvo proteinskih frakcija i peptida oslobođenih iz proteinskog nosača dejstvom digestivnih proteaza. Trake su raspoređene između 45 i 66 kDa što odgovara albuminskim podjedinicama, i između 20 i 36 kDa koje odgovaraju baznim podjedinicama heksamera 11S globulina, glavnog proteina (kukurbitina) u PI. Najintenzivnije trake su raspoređene ispod 14 kDa koje odgovaraju albuminskoj frakciji, drugoj najzastupljenijoj klasi proteina u PI (Vaštag, 2011). Takođe, trake ispod 14 kDa ukazuju na prisustvo peptida manjih molekulskih masa, naročito se vidi njihovo prisustvo u hidrolizatima obogaćenih keksića (trake 3 i 5).

Slika 42b prikazuje elektroforetski profil hidrolizata *in vitro* digestije keksića dobijenih Lab-on-a-Chip kapilarnom gel elektroforezom sa distribucijom molekulskih masa od 1,6 do 95 kDa. Prednost ovog tipa elektroforeze jeste mogućnost detekcije manjih peptidnih frakcija <14 kDa. Elektroforetski profili pokazuje najintenzivnije trake ispod 6,5 kDa što ukazuje na potpunu svarljivost keksića. Takođe, trake su vidljive i za opseg molekulskih masa između 46

i 63 kDa i između 15 i 28 kDa. U odnosu na prethodnu sliku (Slika 42a) pokazano je da je KO keksić (linija 2) potpuno svarljiv, zbog intenzivne trake ispod 6,5 kDa, što znači da su veliki molekuli proteina pšenice hidrolizovani u male peptidne fragmente. Slični rezultati su objavljeni za svarljivost pšeničnog hleba obogaćenog polifenolnim ekstraktima (*Świeca i sar., 2017*).

Ovakav rezultat ukazuje na to da čajno pecivo direktno konzumirano može biti svarljivo, ali i adekvatnost metode *in vitro* digestije koja to pokazuje. Osim toga, ukazuje i na potencijalnu bioaktivnost zbog prisustva peptide malih molekulskih masa.

### 5.3.6. Dostupnost bioaktivnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije

Jedinjenja koja prođu kroz GIT čoveka da bi ispoljila svoja aktivna svojstva moraju da budu dostupna i apsorbovana u krvotok sa ciljem daljeg transporta u organizmu. Stoga, jedan od načina ispitivanja dostupnosti i raspoloživosti bioaktivnih jedinjenja nakon *in vitro* digestije jeste dijaliza. Određuje se sposobnost fitonutrijenata da prođu kroz polupropusnu membranu i simulira pasivnu difuziju ovih jedinjenja kroz crevni epitel (*Thakur i sar., 2020*). Iz hidrolizata čajnog peciva nakon *in vitro* digestije praćena je dostupnost polifenolnih jedinjenja i peptidnih frakcija tj. frakcije TCA proteina. Dostupnost bioaktivnih jedinjenja iz hidrolizata čajnog peciva prikazana je u Tabeli 20.

Tabela 20. Dostupnost ukupnih fenola i TCA proteina iz hidrolizata čajnog peciva dobijenih *in vitro* digestijom

	UF (mg/mL)			TCA proteini (mg/mL)		
	Posle GID	Posle Dijalize	Dostupnost (%)	Posle GID	Posle Dijalize	Dostupnost (%)
<b>KO</b>	0,43 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	16,57 ± 0,98 <sup>d</sup>	0,27 ± 0,05 <sup>a</sup>	-	
<b>KO1</b>	0,52 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,55 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	39,34 ± 0,08 <sup>a</sup>
<b>KO2</b>	0,61 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	15,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,50 ± 0,03 <sup>b</sup>	45,27 ± 6,01 <sup>c</sup>
<b>KO3</b>	0,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	13,52 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,06 <sup>d</sup>	0,62 ± 0,02 <sup>c</sup>	44,70 ± 0,89 <sup>b</sup>

Vrednosti u istim kolonama statistički se značajno ( $p < 0,05$ ) razlikuju. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ( $n = 3$ ).

Vrednosti dostupnosti za polifenolna jedinjenja iz hidrolizata keksa nakon digestije i dijalize ukazuju na njihovu dostupnost. Prema rezultatima iz Tabele 20, vidi se da je sadržaj polifenola u najveći u hidrolizatima i dijalizatima obogaćenih keksova, što se i očekuje zbog prisustva inkapsulata. Međutim, relativno veliki sadržaj polifenola ima i kontrolni uzorak usled hidrolizata koji se oslobađaju iz brašna. Prema procentu dostupnosti najveća bioraspoloživost je utvrđena kod KO hidrolizata (16,8%), dok je najniža vrednost utvrđena za KO3 hidrolizate (13,52%). Niske vrednosti ukazuju na smanjenu potencijalnu bioraspoloživost polifenola, koja može da bude posledica njihove delimične razgradnje u početnom inkapsulatu (Poglavlje 5.3.3) ali i vezivanja polifenolnih komponenti za prisutne proteine, masti ili šećere i time smanjiti njihovu dostupnost. Tako ugradnjom inkapsulata u keks može doći do konformacijskih promena koje mogu otkriti “nova” mesta vezivanja polifenola i time smanjiti njihovu biodostupnost (*Sęczyk i sar., 2021*). Ovakve promene mogu biti posledica smanjene dostupnosti fenolnih jedinjenja u hidrolizatima obogaćenih keksova u odnosu na kontrolni uzorak.

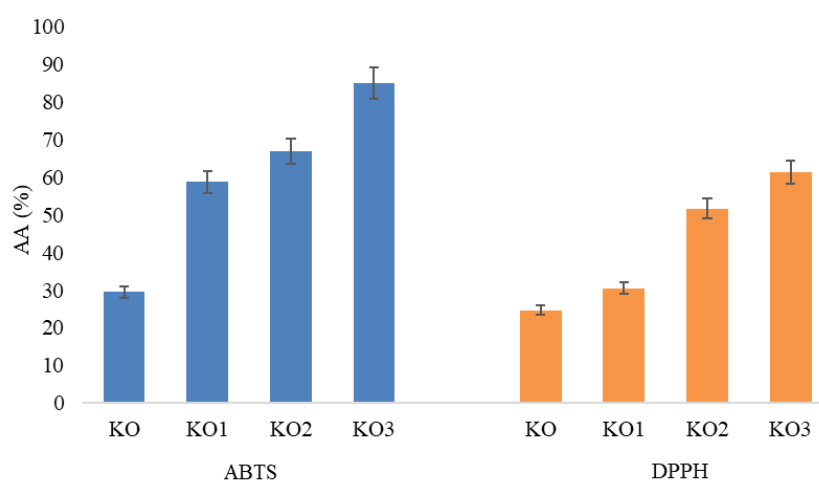
Vrednosti dostupnosti TCA proteina (peptida) ukazuju na njihovu dostupnost oslobođenih u hidrolizatima keksa nakon digestije i dijalize. Vrednosti bioraspoloživosti peptida su značajno veće u odnosu na polifenole. Najveća bioraspoloživost utvrđena je za KO2 i KO3 hidrolizate sa oko 45%, dok je nešto niža vrednost utvrđena za KO1 hidrolizat sa od 39%. Kod KO keksa peptidna frakcija nije detektovana. Peptidi su jedinjenja izrazito malih molekulskih masa koja lako prolaze kroz polupropustljivu membranu pa otuda i velika bioraspoloživost ovih jedinjenja. Ovo ukazuje na njihovu dostupnost u krvotok odakle se transportuju u organizam i ispoljavaju svoje aktivno dejstvo na ciljanim mestima. Takođe, velika vrednost implicira na dobre biološke osobine hidrolizata keksića jer peptidi su nosioci značajnih bioaktivnosti kao što su antioksidativna i antihipertenzivna aktivnost (*Tkaczewska, 2020*).

### **5.3.7. Bioaktivnost nakon *in vitro* digestije**

Kao i kod ispitivanja biološke aktivnosti inkapsulata nakon *in vitro* digestije, ispitane su i bioaktivne osobine keksića koji prođu kroz uslove GIT-a. S obzirom da je pokazana dobra svarljivost i bioraspoloživost keksa nakon *in vitro* digestije, očekuje se da dobijeni hidrolizati poseduju određene biološke aktivnosti. Ispitivane su antioksidativna i antihipertenzivna aktivnost.

### 5.3.7.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost (AA) hidrolizata keksova, dobijenih *in vitro* digestijom, ispitana je metodama neutralizacije DPPH radikala i ABTS katjon radikala (Slika 43). Za razliku od prethodno opisanih inkapsulata gde je praćena AA nakon svake faze digestije, kod keksića AA je praćena nakon potpune digestije tj. posle sve tri faze digestije. Svi keksići nakon *in vitro* digestije poseduju antioksidativnu aktivnost i oba antioksidativna testa pokazuju isto ponašanje dobijenih hidrolizata.



Slika 43. Antioksidativna aktivnost hidrolizata čajnog peciva dobijenih *in vitro* digestijom

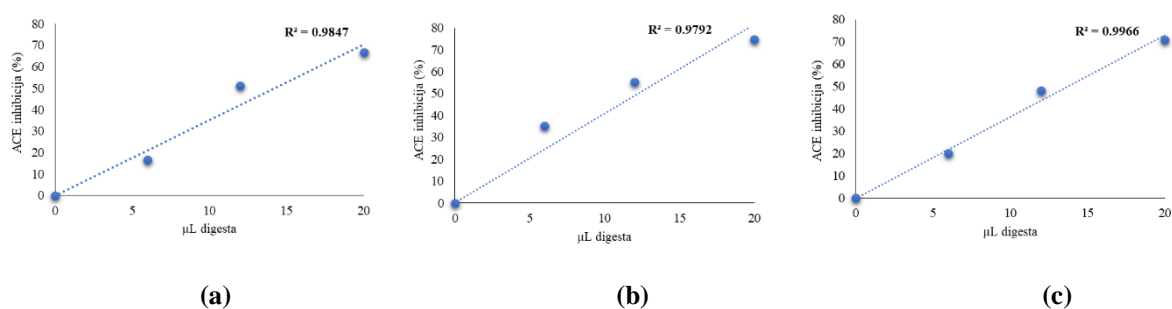
Prema prikazanim rezultatima najmanja AA je zabeležena kod KO hidrolizata, sa 30% za ABTS i 25% za DPPH test. Hidrolizati obogaćenih keksova imaju značajno veću AA ( $p < 0,05$ ) u odnosu na KO hidrolizat. Povećanje aktivnosti je linearno u odnosu na povećanje udela inkapsulata u keksu. Tako je najmanja aktivnost izmerena za KO1 hidrolizat (59% za ABTS i 31% za DPPH), a najveća za KO3 hidrolizat (84% za ABTS i 61% za DPPH). Do povećanja aktivnosti dolazi usled prisustva polifenolnih komponenti iz SC ali najvećim delom iz peptida koji se oslobađaju iz unetog proteina preko inkapsulata (Zlotek, 2018). To potvrđuju i visoke vrednosti dostupnosti peptide (Tabela 20) za hidrolizate obogaćenih keksova. Kao što je već opisano i pokazano peptidi oslobođeni u enzimskim procesima poseduju veliku antioksidativnu aktivnost u odnosu na nativni protein. Ovakvi rezultati ukazuju sposobnost keksova da deluju kao hvatači slobodnih radikala nakon njihovog poslaska kroz GIT tj. nakon direktnog konzumiranja. Prema tome, brašna koja su delom izvor proteina kao što su uljane pogače, proteinski izolati ili inkapsulati mogu povećati AA proizvoda prilikom njegovog



konzumiranja. To potvrđuju studije *Jakubczik (2018)* gde su vafli obogaćeni sa brašnom od semena pasulja i *Giuberti i sar. (2018)* koja je opisala obogaćivanje kolača sa brašnom od semena lucerke.

### 5.3.7.2. Antihipertenzivna aktivnost

Prehrambeni proizvodi od pšeničnog brašna ne pokazuju izraženi inhibitorni potencijal pa se i ne očekuje ACE inhibitorna aktivnost u kontrolnom uzorku. Međutim, sve veći trend u poslednje vreme jeste poboljšanje svojstava jedinjenja proizvoda u cilju dobijanja proizvoda boljih bioloških i nutritivnih vrednosti. Jedan od načina jeste obogaćivanje sa potencijalnim inhibitorima metaboličkih enzima, kao što su proteini ili inkapsulati kojima je već dokazana sposobnost inhibiranja ACE enzima (*Popović i sar. 2017; Čakarević i sar. 2020*). Prema tome, u obogaćenim keksovima koji prođu uslove GID-a očekuje se izražena ACE inhibitorna aktivnost.



Slika 44. ACE inhibitornom aktivnost hidrolizata čajnog peciva (a) KO1, (b) KO2, (c) KO3 dobijenih nakon *in vitro* digestije

Ispitivanje antihipertenzivne aktivnosti izvršeno je merenjem ACE inhibitorne sposobnosti čajnog peciva nakon *in vitro* digestije. Merenje je izraženo koncentracionom zavisnosti (tzv. *dose response* efekat) inhibicije ACE enzima u prisustvu hidrolizata i prikazano na Slici 44.

Prikazani rezultati se odnose na KO1, KO2 i KO3 hidrolizate koji su pokazali dobru ACE inhibitornu aktivnost, dok KO hidrolizat ne pokazuje ACE inhibitornu aktivnost tj. nije detektovana. Na osnovu dobijenih rezultata zaključuje se da obogaćeni keksi nakon *in vitro* digestije pokazuju izuzetnu ACE inhibitornu aktivnost. Sva tri hidrolizata već sa 12 μL pokazuju inhibitornu aktivnost od 50%, dok sa 20 μL ona ide do 80%. Prema prikazanim

krivama na Slici 43, izražene su vrednosti ACE inhibitorne aktivnosti hidrolizata obogaćenih keksića preko  $IC_{50}$  ( $\mu$ L). Najmanja vrednost  $IC_{50}$  od 12,25  $\mu$ L određena je kod hidrolizata KO2 sa najvećom ACE inhibitornom aktivnošću, potom sledi hidrolizat KO3 sa  $IC_{50}$  od 13,73  $\mu$ L i hidrolizat KO1 sa  $IC_{50}$  od 14,18  $\mu$ L sa najmanjom ACE inhibitornom aktivnošću. Udeo inkapsulata ne utiče na vrednost ACE inhibitorne aktivnosti što znači da i keksovi sa najmanjim udelom inkapsulata, u ovom slučaju od 10%, mogu postići izvanrednu ACE inhibitornu aktivnost u finalnom proizvodu. Ove razlike u aktivnosti mogu biti posledica nejednake umešanosti uzorka u svežem testu pa je moguće da dođe do razlika u rasporedu čestica inkapsulata u uzorku. S obzirom, da je ACE inhibitorna aktivnost dokazana i za hidrolizate inkapsulata (Tabela 14) ovi rezultati pokazuju da se aktivnost održava njihovom ugradnjom u neki matriks. Takođe, kao i u inkapsulatima aktivnost potiče od peptida koji se oslobađaju tokom procesa digestije, a koji su generisani u proteinskom nosaču inkapsulata. Ovakav tip proizvoda ima veliki potencijal da nađe primenu kao funkcionalna hrana jer može da zadovolji potrebu čoveka za konditorskim proizvodom, a svojim fiziološkim delovanjem doprinosi zdravlju čoveka kao što je moguće smanjenje hipertenzije. Slične zaključke u svom istraživanju potvrdio je *Jakubczik (2018)* koji je komercijalni proizvod vafl obogatio fermentisanim brašnom semena pasulja, i koje nakon *in vitro* digestije pokazuju ACE inhibitornu aktivnost.

## **6. *Zaključak***

U okviru ove doktorske disertacije izvedena istraživanja su bazirana na primeni metode *in vitro* digestije u cilju ispitivanja svarljivosti i dostupnosti biološki aktivnih jedinjenja proteinskog porekla iz hrane i njenih komponenti. Akcenat je stavljen na valorizaciju nusproizvoda industrije ulja u cilju dobijanja proteinskih izolata koji predstavljaju novi izvor proteina.

Istraživanja su sprovedena na uljanim pogačama dobijenim nakon ceđenja ulja iz semena tikve, kajsije i šljive. Primenom alkalne ekstrakcije iz uljanih pogača dobijeni su proteinski izolati koji su ispitivani kroz tri aspekta: (I) proteini kao izvori biološki aktivnih jedinjenja, (II) proteini kao nosači u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja i (III) ugradnja proteinskih formulacija u različite matrikse u cilju kreiranja prehrambenih proizvoda unapređenih bioloških, nutritivnih i teksturnih osobina.

Na osnovu rezultata istraživanja u primeni proteina kao izvora biološki aktivnih jedinjenja izvedeni su sledeću zaključci:

- Iz uljanih pogača zaostalih nakon hladnog ceđenja ulja i superkritične ekstrakcije dobijeni su proteinski izolati sa visokim sadržajem proteina. Sadržaj proteina za CP proteinske izolate je 95% za PI tikve, 98% za PI šljive i 84% za PI kajsije. Dok SFE proteinski izolati imaju približno isti sadržaj proteina: 71% za kajsiju i 99% za šljivu. Dobijeni rezultati ukazuju da vrsta uljane pogače nema veliki uticaj na dobijanje PI.
- Prema rezultatima PI imaju prihvatljiv aminokiselinski sastav sa sadržajem esencijalnih masnih kiselina od oko 13%, što ukazuje na dobar potencijal u zamenu za proteine životinjskog porekla. Na osnovu rezultata svi PI su bezbedni sa jako malim sadržajem amigdalina ili ispod granice detekcije, što je u skladu sa pravilnicima o bezbednosti hrane.
- Rastvorljivost kao najznačajnija osobina koja utiče na druge osobine ispitana je pod uticajem jonske jačine na određenim vrednostima pH. PI šljive ima karakterističan profil rastvorljivosti oblika U, sa povećanom rastvorljivošću u alkalnim vrednostima pH. Dok PI kajsije ima nešto drugačiji profil rastvorljivosti sa širokim opsegom izoelektrične tačke (pH 2-8) i tek sa porastom rastvorljivosti na pH 9. Prema rezultatima nema značajne razlike između izolata dobijenih iz sve različite uljane pogače CP i SFE.
- Modifikovani protein pokazao je unapređene funkcionalne osobine u odnosu na nativni protein. Nastali konjugati imaju povećanu rastvorljivost u kiselim i alkalnim vrednostima pH. Izrazito su unapređene emulzione osobine koje su praćene i tokom perioda skladištenja nastalih emulzija, i osobine sposobnosti stvaranja i održavanja

pene. Kriming indeks konjugata je tokom perioda skladištenja se kreće od 50 do 63%, dok je kod nativnog proteina ide do 70%. Takođe, konjugati lakše dovode so stvaranja pene koje su značajno stabilnije u odnosu na pene dobijene nativnim proteinom. Vrednosti parametara FC i FS za pene sa konjugatima su statistični značajne ( $p < 0,05$ ) u odnosu na pene sa nativnim proteinom šljive.

- Svarljivost PI kajsije i šljive ispitana je metodom *in vitro* digestije, hidrolizom pepsinom i pankreatinom pri određenim uslovima koji simuliraju GIT čoveka. Oba PI pokazuju značajnu svarljivost već nakon hidrolize pepsinom, sa vrednosti DH oko 42% za PI šljive i 56% za PI kajsije. Slično ponašanje pokazali su PI istih sirovina dobijenih iz SFE uljanih pogača, što pokazuje da vrsta pogače nema značajan uticaj na svarljivost PI.
- Osim poboljšanih funkcionalnih osobina konjugati su pokazali da su svarljivi, ali u značajno manjem stepenu u odnosu na nativni protein. Vrednost DH konjugata je oko 20%, dok kod nativnog proteina šljive ide do 39%. Smanjena svarljivost konjugata može biti posledica stvaranja većih struktura usled vezivanja proteina i polifenola i time su peptidne veze manje dostupne enzimima.
- Dobijenim hidrolizatima nakon *in vitro* digestije PI kajsije i šljive pokazuju određene biološke aktivnosti: antioksidativnu aktivnost, inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze i ACE. Hidrolizati PI kajsije i šljive imaju značajnu antioksidativnu aktivnost sa visokim procentom aktivnosti već nakon pepsina, koja se dalje povećava hidrolizom pankreatina. ACE inhibitorna aktivnost hidrolizata PI se oslobađa nakon hidrolize pepsina, dok je nakon pankreatina ova aktivnost manje izražena. Razlog tome je što hidrolizati koji se oslobađaju dejstvom pepsina imaju C-terminalni kraj lanca koji se čvrsto vezuje za ACE na njegovo aktivno mesto i tako sprečava njegovo delovanje. Hidrolizati pepsina imaju značajno inhibitorno delovanje enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Slične vrednosti dobijene su za obe vrste pogača CP i SFE. Ovakvi rezultati pokazuju da su dobijeni PI pogodni izvori biološki aktivnih hidrolizata. Prema PC analizi dokazana je korelacija između stepena hidrolize PI i njihovih izlaznih vrednosti tj. bioloških osobina nastalih hidrolizata.
- Nakon *in vitro* digestije konjugata pokazana je dostupnost bioaktivnih jedinjenja koja pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost koja potiče od peptida koji se oslobađaju iz prisutnog proteina i polifenola. AA aktivnost nativnog proteina pre *in vitro* digestije iznosi 8%, a nakon digestije 37% koja potiče od oslobođenih bioaktivnih peptida.

Konjugati pre digestije imaju povećanu AA koja poteče od prisutva polifenola sa od 35 do 83 %, koja se nakon digestije zadržava. Biodostupnost AA u hidrolizatima konjugata iznosi oko 1 što ukazuje na dobru dostupnost bioaktivnih jedinjenja koji imaju sposobnost neutralizacije antioksidativnih radikala.

Na osnovu rezultata istraživanja u primeni proteina kao nosača u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Rađena je inkapsulacija soka cvekle na PI tikve primenom metoda *freeze* i *spray drying*. Za *freeze drying* tehniku efikasnost inkapsulacije iznosi 92%, dok je za *spray drying* 75%. Rezultati pokazuju da PI može da bude nosač u inkapsulaciji bioaktivnih jedinjenja radi njihove zaštite od uticaja sredine.
- Boja dobijenih inkapsulata u zavisnosti od primenjen tehnike se u potpunosti razlikuje. Inkapsulati dobijeni FD tehnikom zadržavaju crvenu boju ( $a^*=13,38$ ) koja potiče od betalaina pigmenta cvekle. SD inkapsulati imaju manju vrednost parametra  $a^*=1,47$  što potvrđuje da je došlo do gubitka crvenih pigmenta u inkapsulatu, a izraženiju pojavu žutih podtonova ( $b^*=23,91$ ). To toga dolazi usled izlaganja uzorka visokim temperaturama prilikom prolaska kroz kroz struju toplog vazduha prilikom *spray drying* tehnike sušenja.
- Ispitivanje morfoloških struktura inkapsulata pokazano je da se FD i SD inkapsulati potpuno razlikuju. Prema SEM mikroskopiji pokazano je da SD uzorci se sastoje od sfernih, uniformnih čestica različitog prečnika, dok FD uzorci imaju čestice nepravilnog oblika koji izgledaju kao razbijeno staklo. FTIR analiza oba inkapsulata potvrđuje da nije došlo do hemijskih veza između nosača i aktivne komponente jer nema pojave novih pikova. Raspodela i veličina čestica inkapsulata je potpuno različita, u zavisnosti od primenjene tehnike. *Spray drying* tehnika daje čestice manjih dimenzija sa srednjim prečnikom od 4  $\mu\text{m}$ , dok *freeze drying* tehnika daje čestice većih dimenzija sa srednjim prečnikom od 200  $\mu\text{m}$ .
- Aktivnost vode za oba inkapsulata je manja od 0,2 što potvrđuje mikrobiološku stabilnost ovih proizvoda. Sadržaj vlage iznosi oko 6% što je u okviru vrednosti koje potvrđuju kvalitet ove vrste proizvoda. Velika rastvorljivost je takođe jedan od dokaza da ovakav proizvod može da se koristi kao funkcionalni proizvod.
- *In vitro* digestija inkapsulata pokazuju njihovu svarljivost nakon prolaska kroz GIT ali u manjem stepenu u odnosu na sam PI tikve. Već nakon hidrolize pepsinom inkapsulati su značajno hidrolizovani sa vrednosti DH od 44% za FD i 39% za SD uzorak. Daljom

hidrolizom pankreatinom ne dolazi značajnog povećanja vrednosti DH, 46% za FD i 41% za SD uzorak. Dobijeni rezultati pokazuju da su ovako pripremljeni inkapsulati svarljivi i kao takvi pogodni za primenu kao dodaci hrani ili suplementi. To dokazuje i dostupnost biološki aktivnih komponenti nakon *in vitro* digestije inkapsulata. Dostupnost fenola iznosi 22% za FD i 37% za SD uzorak, dok je dostupnost betalaina manja u SD uzorku (10%) u odnosu na FD (13%) uzorak.

- Na osnovu rezultata, pokazano je da ovi hidrolizati pokazuju antioksidativnu aktivnost, kao i inhibiciju enzima  $\alpha$ -glukozidaze i ACE. Nastali hidrolizati poseduju značajnu AA sa visokim procentom aktivnosti od oko 85% za oba inkapsulata. ACE inhibitorna sposobnost hidrolizata oslobođenih iz inkapsulata je nešto manja u odnosu na njegov nativni PI. Uzrok tome može biti manja koncentracija prisutnog proteina iz koga se oslobađaju ACE inhibitori, kao i prisustvo aktivnih jedinjenja iz soka cvekle koja umanjuju dostupnost enzima aktivnim centrima supstrata. Antidiabetska aktivnost oslobođenih hidrolizata dokazana je procentom inhibicije enzima  $\alpha$ -glukozidaze. Hidrolizati FD inkapsulata pokazuju procenat inhibicije oko 40%, dok je kod hidrolizata SD inkapsulata značajno manja sa oko 14%.

Na osnovu rezultata istraživanja u primeni proteinskih formulaciji kao funkcionalnog dodatka u matriks sa ciljem kreiranja produkta unapređenih bioloških, senzornih i teksturnih osobina mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U kreiranju novog funkcionalnog proizvoda poboljšanih bioloških osobina izvršena je supstitucija brašna sa inkapsulatima na tri nivoa. Obogaćivanje keksića odrazilo se na bolji procenat širenja testa što je poželjno svojstvo u industriji pečenja, dok se po fizičkim parametrima ne razlikuju značajno u odnosu na kontrolni keks.
- Keksići sa inkapsulatima imaju izraženu crvenkastu boju koja potiče od crvenih pigmentata soka cvekle, što pokazuju visoke vrednosti parametra  $a^* = 14-18$ .
- Prema rezultatima senzorne ocene obogaćenih keksića, značajno dominiraju osobine arome cvekle i intenzitet mirisa zbog prisutnih inkapsulata. Ali u značajnoj meri se razlikuju ( $p < 0,05$ ) osobine rastvaranja u ustima, tvrdoća i lomljivost keksa, što je prednost prilikom konzumiranja ovakvih proizvoda. Parametri senzorne ocene potvrđuju da keksić sa najvećim sadržajem inkapsulata odgovara standardima formulacije čajnih peciva.
- Na osnovu rezultata praćenih tokom skladištenja keksića zaključuje se da nije došlo do značajnih promena ( $p > 0,05$ ) u samim keksićima, što potvrđuje stabilnost inkapsulata.

Nema značajne degradacije aktivnih jedinjenja soka cvekle fenola i betalaina, što ukazuje na dobre osobine PI tikve kao nosača u inkapsulaciji. Takođe, nije došlo do promene u tvrdoći keksića čime se ne gubi kvalitet proizvoda. Senzorna svojstva keksića su u maloj meri izmenjena, pojačan je slan ukus u keksićima, dok su ostala svojstva u velikoj meri ostala ista.

- Obogaćenim keksićima dokazan je manji glikemijski indeks (GI~ 65) u odnosu na kontrolni uzorak sa belim brašnom (GI=83). Proizvodi sa ovakvim vrednostima GI smatra se da imaju srednji GI, i kao takvi imaju potencijal proizvoda kao zdrave hrane jer ne dovode do naglog porasta nivoa glukoze u krvi. Sve ovo doprinosi primeni ovog proizvod jer smanjuje rizik od potencijalne pojave dijabetesa.
- Elektroforetski profil uzoraka keksića nakon *in vitro* digestije dokazuje njihovu svarljivost prilikom direktnog konzumiranja. Na slikama uočavaju se trake ispod 14 kDa, što znači da je došlo do hidrolize uzoraka. Prisustvo PI kao nosača ukazuje na potencijalnu bioaktivnost zbog prisustva peptida koji se oslobađaju iz native strukture proteina.
- Dijalizom uzoraka nakon *in vitro* digestije ispitana je dostupnost fitonutrijenata i mogućnost njihove apsorpcije u krvotok. Visoke vrednosti indeksa bioraspoloživosti ukazuju na veliku dostupnost fenolnih jedinjenja (~14%) i peptida (~45%) oslobođenih iz inkapsulata.
- Hidrolizati oslobođeni iz keksića pokazuju antioksidativnu i ACE inhibitornu aktivnost. AA aktivnost raste sa porastom udela inkapsulata u keksu i ona potiče od bioaktivnih peptide iz proteina i delom iz fenolnih komponenti iz soka cvekle. Na isti način deluju i kao ACE inhibitori, u kojima aktivnost isključivo potiče od peptide iz proteina jer oni u svojim sekvencama nose ovu aktivnost.



## **7. *Literatura***

Abd El-Maksoud, A. A., Abd El-Ghany, I. H., El-Beltagi, H. S., Anankanbil, S., Banerjee, C., Petersen, S. V., Pérez, B., Guo, Z., (2018). Adding functionality to milk-based protein: Preparation, and physico-chemical characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-phenolic conjugates. *Food Chemistry*, 241, 281–289.

Acquah, C., Stefano, E. D., Udenigwe, C. C. (2018). Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *Journal of Food Bioactives*, 4, 88–98.

Actis-Goretta, L., Lévêques, A., Rein, M., Teml, A., Schäfer, C., Hofmann, U., et al. (2013). Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *American Journal of Clinical Nutrition*, 98(4), 924–933.

Adenekan, M. K., Fadimu, G. J., Odunmbaku, L. A., & Oke, E. K. (2018). Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates. *Food Science and Nutrition*, 6(1), 146–152.

Aguilar-Toalá, J.; Santiago-López, L.; Peres, C.; Peres, C.; Garcia, H.; Vallejo-Cordoba, B.; González-Córdova, A.; Hernández-Mendoza, A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *J. Dairy Sci.* 2017, 100, 65–75.

Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685–6702.

Alemayehu, F. R., Bendevis, M. A., Jacobsen, S. E. (2015). The potential for utilizing the seed crop amaranth (*Amaranthus* spp.) in East Africa as an alternative crop to support food security and climate change mitigation. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(5), 321-329.

Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, 256, 156-162.

Amrita, K., Dabur, R.S., Kapoor, C.M. (1999). Application of microencapsulation technology in dairy industry. *Indian Food Industry*, 18, 57–64.

Ancuța, P., Sonia, A. (2020). Oil Press-Cakes and Meals Valorization through Circular Economy Approaches: A Review. *Applied Sciences and fiction. Phytochemistry*.

AOAC International (2000). Method 935.38 – Fat in Bread. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, (17th ed.). Arlington, Virginia, USA.

AOAC International (2000). Method 950.36 – Protein in Bread. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, (17th ed.). Arlington, Virginia, USA.

AOAC International (2000). Method 984.25 – Moisture (Loss of Mass on Drying) in Frozen French-Fried Potatoes. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, (17th ed.). Arlington, Virginia, USA.

AOAC International (2000). Method 985.29 – Total Dietary Fiber in Foods. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, (17th ed.). Arlington, Virginia, USA.

Aremu, M. O., Olaofe, O., Akintayo, E. (2007). Functional properties of some Nigerian varieties of legume seed flour concentration effect on foaming and gelation properties. *Journal of Food Technology*, 5(2), 109–115.

Aryee, A. N. A., Agyei, D., Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. *Proteins in food processing* (pp. 27–45).

Awad, S., El-Sayed, M., Wahba, A., El Attar, A., Yousef, M., Zedan, M. (2016). Antioxidant activity of milk protein hydrolysate in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8499–8510.

Banan-Mwine Daliri, E., Oh, D. H., Byong H. Lee, B. H. (2017). Bioactive peptides. *Foods*, 6, 32.

Bandyopadhyay, P., Ghosh, A. K., & Ghosh, C. (2012). Recent developments on polyphenol–protein interactions: Effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system. *Food and Function*, 3(6), 592–605.

Barrett, M. L., & Udani, J. K. (2011). A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutrition Journal*, 10(1).

Bazaria, B., Kumar, P. (2016). Effect of whey protein concentrate as drying aid and drying parameters on physicochemical and functional properties of spray dried beetroot juice concentrate. *Food bioscience*, 14, 21–27.

Belitz, H.D., Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*, second ed. Springer-Verlag, Berlin.

- Benito-Román, O., Sanz, T., Beltrán, S. (2020). Microencapsulation of rice bran oil using pea protein and maltodextrin mixtures as wall material. *Heliyon*, 6.
- Bhat, A. N., Wani, A. I., & Hamdani, M. A. (2020). Tomato powder and crude lycopene as a source of natural antioxidants in whole wheat flour cookies. *Heliyon*, 6.
- Bhat, Z. F., Kumar, S., Bhat, H. F. (2017). Antihypertensive peptides of animal origin: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (3), 566–578.
- Bhusari, S.N., Muzaffar, K., Kumar, P. (2014). Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder technology*, 266, 354–364.
- Bian, Q., Sittipod, S., Garg, A., Ambrose, R. K. (2015). Bulk flow properties of hard and soft wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 63, 88-94.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., Dupont, D. (2017): Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 2239-2261.
- Boisen, S., Eggum, B. O. (1991): Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple- stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 4, 141-162.
- Bolarinwa, F. I., Orfilaa, C., Morgana, M. R. A. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK. *Food Chemistry*, 152, 133-139.
- Borja Velázquez-Martí, Orlando W. Meneses-Quelal, Juan Gaibor-Chavez and Zulay Niño-Ruiz
- Bornhorst, G. M., Singh, R. P. (2014). Gastric digestion *In vivo* and *In vitro*: How the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 111–132.
- Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R., Burlingame, B. (2012). Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*, 108, S183–S211.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brown, E. M., Nitecki, S., Pereira-Caro, G., McDougall, G. J., Stewart, D., Rowland, I., Gill, C. I. (2014): Comparison of in vivo and in vitro digestion on polyphenol composition in lingonberries: Potential impact on colonic health. *BioFactors*, 40, 611-623.

Bučko, S. (2020). Adsorpciona i emulgujuća svojstva proteinskog izolata i hidrolizata semena tikve (*Cucurbita pepo*). Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.

Bučko, S., Katona, J., Popović, Lj., Vaštag, Ž., Petrović, L., Vučinić, M. (2015). Investigation on solubility, interfacial and emulsifying properties of pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed protein isolate. *LWT—Food Science and Technology*, 64, 609–615.

Buitimea-Cantúa, N. E., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2018). Phenolic–protein interactions: Effects on food properties and health benefits. *Journal of Medicinal Food*, 21(2), 188–198.

Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., Schluter, O. K. (2016). Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon*, 2(12), e00218.

Cai, Y. Z., Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. *Journal of Food Science*, 65, 1248-1252.

Čakarević, C.J., Vidović, S.S., Vladić, Z.J., Jokić, D.S., Pavlović, S.N., Popović, M. L. (2019). Plum oil cake protein isolate: a potential source of bioactive peptides. *Food and Feed Research*, 46, 171–178.

Čakarević, J., Šregelj, V., Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Čanadanović Brunet, G., Popović, S., Hadnadev Kostić, M., Popović, Lj. (2020). Encapsulation of beetroot juice: a study on the application of pumpkin oil cake protein as new carrier agent. *Journal of Microencapsulation*, 37 (2), 121-133.

Campbell, J., Berry, J., Liang, Y. (2019). Anatomy and physiology of the small intestine. *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, 1, 817–841.

Čanadanović-Brunet, J. M., Savatović, S. S., Četković, G. S., Vulić, J. J., Đilas, S. M., Markov, S. L., Cvetković, D. D. (2011). Antioxidant and antimicrobial activities of beet root pomace extracts. *Czech journal of Food Sciences and Technology*, 29 (6), 575–585.

- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of rapeseed hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42, 1419-1428.
- Chan, H.H., Sun, H.D., Reddy, M. V. B., Wu, T.S. (2010). Potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the roots of *Panax japonicus* C. A. Meyer var. major. *Phytochemistry*, 71, 1360–1364.
- Chen, M.-J., Lin, C.-W. (2002). Factors affecting the water-holding capacity of fibrinogen/plasma protein gels optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science*, 67(7), 2579–2582.
- Chen, Y., Jiang, S., Chen, Q., Liu, Q., & Kong, B. (2019). Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid. *Process Biochemistry*, 79, 105–113.
- Cirkovic Velickovic, T. D., Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The role of dietary phenolic compounds in protein digestion and processing technologies to improve their antinutritive properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82–103.
- Coda, R., Varis, J., Verni, M., Rizzello, C. G., Katina, K. (2017). Improvement of the protein quality of wheat bread through faba bean sourdough addition. *Lebensmittel- Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 82, 296–302.
- Conde, J. M., Escobar, M. Y., Jiménez, J. J. P., Rodríguez, F. M., & Patino, J. M. R. (2005). Effect of enzymatic treatment of extracted sunflower proteins on solubility, amino acid composition, and surface activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8038-8045.
- Correia, R., Grace, M. H., Esposito, D., Lila, M. A. (2017). Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food chemistry*, 235, 76–85.
- Coultate, T.P. (1984). *Alimentos – Química de sus componentes*. Editorial Acribia SA, Zaragoza.
- Damodaran, S. (2000). Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: Fennema, O.R. (Dir), *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia SA, Zaragoza, 381–511.
- Darniadi, S., Ho, P., Murray, B.S. (2018). Comparison of blueberry powder produced via foam-mat freeze-drying versus spray-drying: evaluation of foam and powder properties. *Journal of the science of food and agriculture*, 98, 2002–2010.

de Moraisa, F. P. R., Pessatoa, T. B., Rodriguesb, E., Mallmannb, L. P., Mariuttia, L. R. B., Nettoa, F. M. (2020). Whey protein and phenolic compound complexation: Effects on antioxidant capacity before and after in vitro digestion. *Food Research International*, 133.

Dhakal, S. P., He, J. (2020). Microencapsulation of vitamins in food applications to prevent losses in processing and storage: A review. *Food Research International*, 137.

Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296–1307.

Dubeau, S., Samson, G., Tajmir-Riahi, H.-A. (2010). Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, 122(3): 539-545.

Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F. (2004). Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects*, 232, 239–247.

Duong-Ly, K. C., Gabelli, S. B. (2014). Chapter seven - salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In J. Lorsch (Vol. Ed.), *Methods in enzymology*. Vol. 541. *Methods in enzymology* (pp. 85–94). Academic Press.

EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J.* 2016. 14. 4424.

Elflein, J. (2019). *Diabetes - Statistics & Facts*. Health & Pharmaceuticals.

Esfandi, R., Walters, M. E., Tsopmo, A. (2019). Antioxidant properties and potential mechanisms of hydrolyzed proteins and peptides from cereals. *Heliyon*.

Espín, J. C., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A. (2007). *Nutraceuticals: Facts*

Etcheverry P, Grusak MA, Fleige LE (2012) Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Front Physiol* 3:1–21

Fathollahy, I., Farmani, J., Reza Kasaai, M., Hamishehkar, H. (2021). Characteristics and functional properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *LWT- Food Science and Technology*, 140.

Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., Pintado, M. (2019). Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules*, 24.

Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*.

Fidantsi, A., Doxastakis, G. (2001). Emulsifying and foaming properties of amaranth seed protein isolates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 21, 119–124

Foster-Powell, K., Holt, S.H.A., Brand-Miller, J.C. (2002). International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76, 5-56.

Garcia, M.C., González-Garcia, E., Vásquez-Villanueva, R., Marina, M.L. (2016). Apricot and other seed stones: Amygdalin content and the potential to obtain antioxidant, angiotensin I converting enzyme inhibitor and hypocholesterolemic peptides. *Food and Function*, 7, 4693–4701.

Garcia, M.C.; Endermann, J.; González-Garcia, E.; Marina, M.L. (2015). HPLC-Q-TOF-MS Identification of antioxidant and antihypertensive peptides recovered from cherry (*Prunus cerasus* L.) subproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 1514–1520.

Gavelle, E., Huneau, J., Bianchi, C. M., Verger, E. O., Mariotti, F. (2017). Protein adequacy is primarily a matter of protein quantity, not quality: Modeling an increase in plant: Animal protein ratio in French adults. *Nutrients*, 9(12), 1333–1346.

Giuberti, G., Rocchetti, G., Sigolo, S., Fortunati, P., Lucini, L., Gallo, A. (2018). Exploitation of alfalfa seed (*Medicago sativa* L.) flour into gluten-free rice cookies: Nutritional, antioxidant and quality characteristics. *Food Chemistry*, 239, 679-687.

Giuberti, G., Rocchetti, G., Sigolo, S., Fortunati, P., Lucini, L., Gallo, A. (2018). Exploitation of alfalfa seed (*Medicago sativa* L.) flour into gluten-free rice cookies: Nutritional, antioxidant and quality characteristics. *Food Chemistry*, 239, 679-687.

Goh, R., Gao, J., Ananingsih, V. K., Ranawana, V., Henry, C. J., Zhou, W. (2015). Green tea catechins reduced the glycaemic potential of bread: An *in vitro* digestibility study. *Food Chemistry*, 180, 203–210.

Gonçalves, R., Mateus, N., de Freitas, V. (2011). Inhibition of  $\alpha$ -amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, 125, 665–672.

González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Mora-Escobedo, R., Martínez-Villaluenga, C. (2018). Bioactive Peptides from Germinated Soybean with Anti-Diabetic Potential by



Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-IV,  $\alpha$ -Amylase, and  $\alpha$ -Glucosidase Enzymes. *Molecular Sciences*, 19, 2883.

Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. M. (2020). Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments – A review. *Food Research International*, 136.

Gorska-Warsewicz, H., Laskowski, W., Kulykovets, O., Kudlińska-Chylak, A., Czeczotko, M., Rejman, K. (2018). Food products as sources of protein and amino acids- The case of Poland. *Nutrients*, 10(12).

Gould, J., Wolf, B. (2018). Interfacial and emulsifying properties of mealworm protein at the oil/water interface. *Food Hydrocolloids*, 77, 57–65.

Gravel, A., Doyen, A. (2020). The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 59, 102272.

Grimble, R. F. (2006). The effects of sulfur amino acid intake on immune function in humans. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1660S–1665S.

Gu, L., Su, Y., Zhang, M., Chang, C., Li, J., McClements, D. J. (2017). Protection of  $\beta$ -carotene from chemical degradation in emulsion-based delivery systems using antioxidant interfacial complexes: Catechin-egg white protein conjugates. *Food Research International*, 96: 84-93.

Guerra A, Etienne-Mesmin L, Livrelli V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M. (2012) Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends Biotechnol* 30:591–600

Guo, S., Ai, M., Liu, J., Luo, Z., Yu, J., Li, Z., & Jiang, A. (2019). Physicochemical, conformational properties and ACE-inhibitory activity of peanut protein marinated by aged vinegar. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 469–475.

Guo, Y., Bao, Y., Sun, K., Chang, C., Liu, W. (2021). Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions. *Food Hydrocolloids*, 112.

Hadnađev-Dapčević, T., Torbica, A., Hadnađev, M. (2013). Influence of buckwheat flour and carboxymethyl cellulose on rheological behavior and baking performance of gluten-free cookie dough. *Food and Bioprocess technology*, 6, 1770-1781.

- Han, R., Alvarez, H. A. J., Maycock, J., Murray, B. S., Boesch, C. (2021). Comparison of alcalase- and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates – Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. *Current Research in Food Science*, 4, 141-149.
- Han, S., Chee, K., & Cho, S. (2015). Nutritional quality of rice bran protein in comparison to animal and vegetable protein. *Food Chemistry*, 172, 766–769.
- He, Z., Xu, M., Zeng, M., Qin, F., Chen, J. (2016). Interactions of milk  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. *Food Chemistry*, 199, 314-322
- Hu, X. Z., Cheng, Y. Q., Fan, J. F., Lu, Z. H., Yamaki, K., Li, L. T. (2010). Effects of drying method on physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Journal of food processing and preservation*, 34, 520–540.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.
- Jadhav, S. B., Gaonkar, T., Rathi, A. (2021). *In vitro* gastrointestinal digestion of proteins in the presence of enzyme supplements: Details of antioxidant and antidiabetic properties. *LWT-Food Science and Technology*, 147, 111650.
- Jakubczyk, A. (2018). Effect of addition of fermented bean seed flour on the content of bioactive components and nutraceutical potential of wheat wafers. *LWT-Food Science and Technology*, 98, 245-251.
- Jamróz, E., Kopel, P. (2020). Polysaccharide and protein films with antimicrobial/ antioxidant activity in the food industry: A review. *Polymers*, 12(6), 1289.
- Jara, A. M. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A. (2018). Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Maclura pomifera* fruits. *Food Chemistry*, 264, 326–333.
- Jia, Z., Zheng, M., Tao, F., Chen, W., Huang, G., Jiang, J. (2016). Effect of covalent modification by (-)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate. *LWT- Food Science and Technology*, 66, 305-310.
- Jiang, J., Zhang, Z., Zhao, J., Liu, Y. (2018). The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical scavenging activity of *in vitro* protein digests. *Food Chemistry*, 268, 334–341.

- Jiang, L., Liu, Y., Li, L., Qi, B., Ju, M., Xu, Y., Zhang, Y., Sui, X. (2019). Covalent conjugates of anthocyanins to soy protein: Unravelling their structure features and in vitro gastrointestinal digestion fate. *Food Research International*, 120, 603-609.
- Jiang, S., Yildiz, G., J. Ding, Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeatyc, M. M., Feng, H. (2019). Pea protein nanoemulsion and nanocomplex as carriers for protection of cholecalciferol (vitamin D3). *Food and Bioprocess Technology*, 12 (2019) 1031–1040.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S. (2011). Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. *Food chemistry*, 129, 1513–1522.
- Kaderides, K., Mourtzinou, I., & Goula, M. A. (2020). Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 310.
- Kaiser HF, Rice J., (1974). Little Jiffy, mark IV. *Educ Psychol Meas*, 111-117.
- Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046–1055.
- Karaś, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Złotek, U., Zielińska, E. (2017): Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 291-305.
- Kim, K.-T., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2014). Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98, 27–33.
- Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of food proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219–280.
- Kinsella, J. E. (1981). Functional properties of proteins: Possible relationships between structure and function in foams. *Food Chemistry*, 7(4), 273–288.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, S. M., Moore, M. C., Renner, S., Woods, S. C., Tschöp, M. H. (2018): Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 1-23.

- Kolawole, L. F., Akinwande, A. B., Ade-Omowaye, I. O. B. (2020). Physicochemical properties of novel cookies produced from orange-fleshed sweet potato cookies enriched with sclerotium of edible mushroom (*Pleurotus tuberregium*). *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19, 174-178.
- Kontani, N., Omae, R., Kagebayashi, T., Kaneko, K., Yamada, Y., Mizushige, T., Kanamoto, R., Ohinata, K. (2014). Characterization of Ile-His-Arg-Phe, a novel rice-derived vasorelaxing peptide with hypotensive and anorexigenic activities. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(2), 359–364.
- Kramer, R. M., Shende, V. R., Motl, N., Pace, C. N., Scholtz, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of protein solubility: Increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical Journal*, 102(8), 1907–1915.
- Kumar, A., Chauhan, S. (2021). Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. *Life Sciences*, 271.
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Verma, R., Punia, S., Mahapatra, A., Belwal, T., Dahuja, A., Joshi, S., Berwal, K. M., Satankar, V., Bhoite, A. G., Amarowicz, R., Kaur, C., Kennedy, J. F. (2021). Advances in the plant protein extraction: Mechanism and recommendations. *Food Hydrocolloids*, 115.
- Kyriakopoulou, K., Dekkers, B., & van der Goot, A. J. (2019). Plant-based meat analogues. *Sustainable meat production and processing* (pp. 103–126). Elsevier Inc.
- Lacroix, I. M. E., Li-Chan, E. C. Y. (2013). Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)- IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 7500–7506.
- Laemmli, U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Laleg, K., Cassan, D., Barron, C., Prabhasankar, P., Micard, V. (2016). Structural, Culinary, Nutritional and Anti-Nutritional Properties of High Protein, Gluten Free, 100% Legume Pasta. *PLOS ONE*, 1-19.
- Lam, R. S., Nickerson, M. T. (2013). Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. *Food Chemistry*, 141(2), 975–984.

- Le Bourvellec, C., Renard, C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(3): 213-248.
- Lee, S. Y., Hur, S. J. (2017). Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506–517.
- Li, C., Yu, W., Wu, P., Dong Chen, X. (2020). Current *in vitro* digestion systems for understanding food digestion in human upper gastrointestinal tract. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 114-126.
- Li, H., Aluko, R. E. (2010). Identification and inhibitory properties of multifunctional peptides from pea protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11471–11476.
- Li, X.-R., Tang, C.-H. (2013). Influence of glycation on microencapsulating properties of soy protein isolate-lactose blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2715–2722.
- Liu, F., Ma, C., Gao, Y., McClements, D.J. (2017). Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1): 76-95.
- Liu, W., Chen, X. D., Cheng, Z., Selomulya, C. (2016). On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via spray drying. *Journal of food engineering*, 169, 189–195.
- Liu, X., Song, Q., Li, X., Chen, Y., Liu, C., Zhu, X., Liu, J., Granato, D., Wang, Y., Huang, J. (2021). Effects of different dietary polyphenols on conformational changes and functional properties of protein–polyphenol covalent complexes. *Food Chemistry*, 361.
- Liu, Y., Cai, Y., Ying, D., Fu, Y., Xiong, Y., Le, X. (2018). Ovalbumin as a carrier to significantly enhance the aqueous solubility and photostability of curcumin: interaction and binding mechanism study, *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 893–900.
- Lo, W. M. Y., Li-Chan, E. C. Y. (2005). Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from In Vitro Pepsin–Pancreatin Digestion of Soy Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3369-3376.

- López, D. N., Galante, M., Robson, M., Boeris, V., Spelzini, D. (2018). Amaranth, quinoa and chia protein isolates: Physicochemical and structural properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 152–159.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez- Santaescolástica, C., Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136–147.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Fair, A., Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lqari, H., Vioque, J., Pedroche, J., & Millán, F. (2002). *Lupinus angustifolius* protein isolates: Chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, 76(3), 349–356.
- Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., Fernández-López, J. (2018). In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436.
- Lucini, M. A., Brigante, I. F., Salvucci, E., Pigni, B. N., Martinez, L. M., Ribotta, P., Wunderlin, A. D., & Baroni V. M. (2020). Defatted chia flour as functional ingredient in sweet cookies. How do processing, simulated gastrointestinal digestion and colonic fermentation affect its antioxidant properties? *Food Chemistry*, 316.
- Ma, M.; Ren, Y.; Xie, W.; Zhou, D.; Tang, S.; Kuang, M.; Wang, S.; Du, S. (2018). Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal. *Food Chemistry*, 240, 856–862.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology* 2006, 41, 1–21
- Mahloko, M. L., Silungwe, H., Mashau, E. M., & Kgatla, E. T. (2019). Bioactive compounds, antioxidant activity and physical characteristics of wheat-prickly pear and banana biscuits. *Heliyon*, 5.
- Mattila, P., Mäkinen, S., Eurola, M., Jalava, T., Pihlava, J. M., Hellström, J., Pihlanto, A. (2018). Nutritional value of commercial protein-rich plant products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 108-115.
- McClements, D. J. (2010). Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic

- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., et al. (2009). Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification. *Food Science and Technology*, 42, 228–232.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakava, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Recio, I., Santos, N.C., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food and Function*, 5, 1113-1124.
- Molinari, R., Costantini, L., Timperio, A. M., Lelli, V., Bonafaccia, F., Bonafaccia, G., Merendino, N. (2018). Tartary buckwheat malt as ingredient of gluten-free cookies. *Journal of Cereal Science*, 80, 37-43.
- Montinaro, V., Cicardi, M. (2020). ACE inhibitor-mediated angioedema. *International Immunopharmacology*, 78.
- Morales, F. J., Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119-125.
- Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006): Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. *Process Biochemistry*, 41, 447-456.
- Neeland, I. J., & Patel, K. V. (2019). Chapter 4 - Diabetes: Key markers of injury and prognosis. In V. Nambi (Ed.). *Biomarkers in cardiovascular disease* (pp. 41–51).
- Nenova, N., Drumeva, M. (2012). Investigation on protein content and amino acid composition in the kernels of some sunflower lines. *Helia*, 35(56), 41–46.
- Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42, 469–479.
- Nirmala, C., Bisht, S. M., Bajwa, K. H., & Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91-99.

- Norton, J. E., Wallis, G. A., Spyropoulos, F., Lillford, P. J., Norton, I. T. (2014). Designing food structures for nutrition and health benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 177–195.
- Ogrodowska, D., Tanska, M., Brandt, W. (2017). The influence of drying process conditions on the physical properties, bioactive compounds and stability of encapsulated pumpkin seed oil. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1265–1280.
- Otto M. (1999). *Chemometrics Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. Wiley VCH, Weinheim, Germany
- Ozdal, T., Capanoglu, E., Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970.
- Özsan, A. G. K., Öner, A. F. (2020). A new oligosaccharide-filgrastim conjugate prepared by enzymatic method: Preparation and physicochemical characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 55.
- Pajin, B. (2009). *Praktikum iz tehnologije konditorskih proizvoda (Practicum in Technology of Confectionary Products)*. Novi Sad, Serbia: Faculty of Technology.
- Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, R. E., Lyng, J. (2021). Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibition properties: A review. *Food Chemistry*, 338.
- Paulo, F., Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327–1340.
- Pavlić, B.; Pezo, L.; Marić, B.; Tukuljac, L.P.; Zeković, Z.; Solarov, M.B.; Teslić, N. (2020). Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 157, 104687.
- Pearce, K., Kinsella, J. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J. (2002). Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 82, 960–965.
- Peričin, D., Škrinjar, M., Radulović, Lj., Mađarev, S., Dimić, E. (2007). Uljane pogače i njihova biotehnoška primena. *Zbornik radova 48. Savetovanje industrije ulja*, 113-117.



- Pham, L. B., Wang, B., Zisu, B., Adhikari, B. (2019). Complexation between flaxseed protein isolate and phenolic compounds: Effects on interfacial, emulsifying and antioxidant properties of emulsions. *Food Hydrocolloids*, 94, 20–29.
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., ZeneziniChiozzi, R., Lagana, A. (2018). Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3425–3444.
- Pojić, M., Misan, A., Tiwari, B. (2018). Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 93–104
- Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., Torbica, A. M. (2013). Antioxidative and Functional Properties of Pumpkin Oil Cake Globulin Hydrolysates. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 90, 1157-1165.
- Popović, Lj., Stolić, Ž., Čakarević, J., Torbica, J., Tomić, J., Šijački, M. (2017). Biologically active digests from pumpkin oil cake protein: effect of cross-linking by transglutaminase. *Journal of the American oil chemists' society*, 94, 1245–1251.
- Popović, S. (2012). Istraživanje dobijanja i karakterizacija biorazgradivih kompozitnih filmova na bazi biljnih proteina. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Prigent, S. V. E., Voragen, A. G. J., van Koningsveld, G. A., Baron, A., Renard, C. M. G. C., Gruppen, H. (2009). Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, 92(12), 5843–5853.
- Prigent, S. V., Voragen, A. G., Visser, A. J., van Koningsveld, G. A., Gruppen, H. (2007). Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2502–2510.
- Prodpran, T., Benjakul, S., Phatcharat, S. (2012). Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 774–782.
- Pujara, N., Jambhrunkar, S., Wong, K. Y., McGuckin, M., Popat, A. (2017). Enhanced colloidal stability, solubility and rapid dissolution of resveratrol by nanocomplexation with soy protein isolate, *Journal of Colloid and Interface Science*, 488, 303–308.

Quan, T. H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A. K., Maqsood, S. (2019). Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trend in Food Science and Technology*, 91, 507–517.

Quintero, J., Rojas, J., Ciro, G. (2018). Vegetable proteins as potential encapsulation agents: A review. *Food Research*, 2(3), 208–220.

Reeds, P. J. (2000). Dispensable and indispensable amino acids for humans. *Journal of Nutrition*, 1835S–1840S.

Ren, Y., Liang, K., Jin, Y., Zhang, M., Chen, Y., Wu, H., Lai, F. (2016). Identification and characterization of two novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitory oligopeptides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed protein. *Journal of Functional Foods*, 26, 439–450.

Rizzello, C.G.; Lorusso, A.; Russo, V.; Pinto, D.; Marzani, B.; Gobbetti, M. (2017). Improving the antioxidant properties of quinoa flour through fermentation with selected autochthonous lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 241, 252–261

Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1386–1394.

Robyt, J. F. (2008). Starch: Structure, properties, chemistry, and enzymology. In B. O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Eds.). *Glycoscience: Chemistry and chemical biology* (pp. 1437–1472). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Rodrigues, I. M., Coelho, J. F. J., Carvalho, G. M. V. S. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109, 337–346.

Rodsamran, P., Sothornvit R. (2018). Physicochemical and functional properties of protein concentrate from by-product of coconut processing. *Food Chemistry*, 241, 364–371.

Rosak, C., Mertes, G. (2012). Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: Patient considerations. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 5, 357–367.

Różyło, R., W\_ojcik, M., Dziki, D. et al. (2019). Freeze-dried elderberry and chokeberry as natural colorants for gluten-free wafer sheets. *International Agrophysics*, 33, 217–225.

- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2019). Food processing for the improvement of plant proteins digestibility. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–20
- Saikia, S., Mahnot, N.K., Mahanta, C.L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food chemistry*, 171, 144–152.
- Sarteshnizi, R. A., Sahari, M. A., Gavlighi, H. A., Regenstein, J. M., Nikoo, M. (2019). Antioxidant activity of Sind sardine hydrolysates with pistachio green hull (PGH) extracts. *Food Bioscience*, 27, 37–45.
- Sathe, S. K., Zaffran, V. D., Gupta, S., Li, T. (2018). Protein Solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 883–901.
- Sęczyk, L., Sugier, D., Swieca, M., Gawlik-Dziki, U. (2021). The effect of *in vitro* digestion, food matrix, and hydrothermal treatment on the potential bioaccessibility of selected phenolic compounds. *Food Chemistry*, 344.
- Sęczyk, L., Swieca, M., Dziki, D., Anders, A., Gawlik-Dziki, U. (2017). Antioxidant, nutritional and functional characteristics of wheat bread enriched with ground flaxseed hulls. *Food Chemistry*, 214, 32-38.
- Sęczyk, Ł., Świeca, M., Gawlik-Dziki, U. (2015). Nutritional and health-promoting properties of bean paste fortified with onion skin in the light of phenolic–food matrix interactions. *Food and Function*, 17–19.
- Sedlar, T., Čakarević, J., Tomić, J., Popović, Lj. (2020). Vegetable By-Products as New Sources of Functional Proteins. *Plant Food for Human Nutrition*.
- Sharma, M., Kadam, D.M., Chadha, S., Wilson, R.A., Gupta, R.K. (2013). Influence of particle size on physical and sensory attributes of mango pulp powder. *International Agrophysics*, 27, 323-328.
- Sharma. P.C., Tilakratne. B.M.K.S., Gupta. A. (2010). Utilization of wild apricot kernel press cake for extraction of protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 47, 682–685.
- Shimada, K., & Matsushita, S. (1980). Relationship between thermocoagulation of proteins and amino acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 13–17.

- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Wilchek M, Bayer EA (eds) *Methods in enzymology*, 299, 152–178.
- Smith, C. R., Shekleton, M. C., Wolff, I. A., Jones, Q. (2014). Seed protein sources - amino acid composition and total protein content of various plant seeds. *Economic Botany*, 13(2), 132–150.
- Sobel, R., Versic, R., Gaonkar, A. G. (2014). Introduction to microencapsulation and controlled delivery in foods. In A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, & S. Robert (Eds.), *Microencapsulation in the food industry* (pp. 3–12). Academic Press.
- Sousa, A. G. O., Fernandes, D. C., Alves, A. M., Freitas, J. B., & Naves, M. M. V. (2011). Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. *Food Research International*, 44(7), 2319–2325
- Spackman D. H., Stein W. H., Moose, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, 30, 1190–1206.
- Sui, X., Sun, H., Qi, B., Zhang, M., Li, Y., Jiang, L. (2018). Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions. *Food Chemistry*, 245, 871-878.
- Sun Jin Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, 125, 1-12.
- Sun, M., Mu, T., Zhang, M., & Arogundade, L. A. (2012). Nutritional assessment and effects of heat processing on digestibility of Chinese sweet potato protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1–2), 104–110.
- Sun-Waterhouse, D., Zhao, M., & Waterhouse, G. I. N. (2014). Protein modification during ingredient preparation and food processing: Approaches to improve food processability and nutrition. *Food and Bioprocess Technology*, 7(7), 1853–1893.
- Świeca, M., Dziki, D., Gawlik-Dziki, U. (2017). Starch and protein analysis of wheat bread enriched with phenolics-rich sprouted wheat flour. *Food Chemistry*, 228, 643-648.
- Świeca, M., Sęczyk, Ł., Gawlik-Dziki, U., Dziki, D. (2014). Bread enriched with quinoa leaves- The influence of protein-phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. *Food Chemistry*, 162, 54–62.

- Taylor, J., Taylor, J. R. N., Belton, P. S., Minnaar, A. (2009). Kafirin microparticle encapsulation of catechin and sorghum condensed tannins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 7523–7528.
- Temdee, W., Benjakul, S. (2015). Effect of phenolic compounds and bark/wood extracts oxidised by laccase on properties of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin gel. *International Food Research Journal*, 22(1), 246–253.
- Thakur, N., Raigond, P., Singh, Y., Mishra, T., Singh, B., Kumar Lal, M., Dutt, S. (2020). Recent updates on bioaccessibility of phytonutrients. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 366-380.
- Timilsena, Y. P., Adhikari, R., Barrow, C. J., Adhikari, B. (2016). Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds. *Food Chemistry*, 212, 648-656.
- Tkaczewska, J. (2020). Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 106, 298–311.
- Tomić, J., Torbica, A., Popović, Lj., Hristov, N., Nikolovski, B. (2016). Wheat breadmaking properties in dependence on wheat enzymes status and climate conditions. *Food Chemistry*, 199, 565-572.
- Tomičić, Z. M., Spasevski, N. J., Popović, S. J., Banjac, V. V., Đuragić, O. M., Tomičić, R. M. (2020). By- products of the oil industry as sources of amino acids in feed. *Food and Feed Research*, 47 (2), 131-137.
- Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(6), 589–601.
- Trapero, A., Llebaria, A. (2012). A prospect for pyrrolidine iminosugars as antidiabetic alpha-glucosidase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 10345–10346.
- Tsumura, K, Kugimya, W., Bando, N., Hiemori, M., Ogawa, T. (1999). Preparation of hypoallergic soybean protein with processing functionally by selective enzymatic hydrolysis. *Food Science Technology*, 5, 171-175.

Tumbas Šaponjac, V., Čanadanović Brunet, J., Četković, G., Jakišić, M., Đilas, S., Vulić, J., Stajčić, S. (2016). Encapsulation of Beetroot Pomace Extract: RSM Optimization, Storage and Gastrointestinal Stability. *Molecules*, 21 (5).

Tuśnio, A., Taciak, M., Barszcz, M., Świąch, E. (2017). Effect of replacing soybean meal by raw or extruded pea seeds on growth performance and selected physiological parameters of the ileum and distal colon of pigs. *PLoS One*, 12(1), 1–16.

Vasconcelos, I. M., Campello, C. C., Oliveira, J. T. A., Urano, A. F., Bezerra, D. O., Maia, F. M. M. (2006). Brazilian soybean *Glycine max* (L.) merr. Cultivars adapted to low latitude regions: Seed composition and content of bioactive proteins. *Revista Brasileira de Botanica*, 29(4), 617–625.

Vaštag, Ž. (2011). Biološki aktivni enzimski hidrolizati proteina hrane - Razvoj bioprocasa, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Krimer, V., Peričin, D. (2011). Production of enzymatic hydrolysates with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity from pumpkin oil cake protein isolate. *Food Chemistry*, 124, 1316-1321.

Vaštag, Ž., Popović, Lj., Popović, S., Peričin-Starčević, I., Krimer-Malešević, V. (2013). *In vitro* study on digestion of pumpkin oil cake protein hydrolysate: evaluation of impact on bioactive properties. *International journal of food sciences and nutrition*, 64, 452–460.

Verhoeckx, K. (2015). The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models. SpringerOpens.

Vetrani, C., Rivellesse, A. A., Annuzzi, G., Adiels, M., Borén, J., Mattila, I., Aura, A. M. (2016): Metabolic transformations of dietary polyphenols: Comparison between in vitro colonic and hepatic models and in vivo urinary metabolites. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 33, 111-118.

Vidović, S. S., Vladić, J. Z., Vaštag, Ž. G., Zeković, Z. P., Popović, Lj. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder technology*, 258, 209–215.

Visentini, F.F., Ferrado, J. B., Perez, A. A., Santiago, L. G. (2019). Simulated gastrointestinal digestion of inclusion complexes based on ovalbumin nanoparticles and conjugated linoleic acid. *Food and function*, 10, 2630–2641.

Von Elbe, J.H., 2004. Betalains. In: R. E. Wrolstad, et al., eds. Handbook of food analytical chemistry. Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components. 9 ed. New York: Wiley & Sons.

WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. World Health Organization Technical Report Series, 935, 1–265 ISBN 92 4 120935 6.

Wienk KJH, Marx JJM, Beynen AC (1999) The concept of iron bioavailability and its assessment. Eur J Nutr 38:51–75

Wildman, R. E. C. (2007). Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC/Taylor & Francis.

Williams, J. P., Williams, J. R., Kirabo, A., Chester, D., & Peterson, M. (2016). Chapter 3 - nutrient content and health benefits of insects. In A. T. Dossey, J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas (Eds.). Insects as sustainable food ingredients (pp. 61–84). San Diego: Academic Press.

Wruss, J., Waldenberger, G., Huemer, S., Uygun, P., Lanzerstorfer, P., Müller, U., Höglinger, O., Weghuber, J. (2015). Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. Journal of Food Composition and Analysis, 42, 46-55.

Wu, S., Wang, X., Qi, W., Guo, Q. (2019). Bioactive protein/peptides of flaxseed: A review. Trends in Food Science and Technology, 92, 184-193.

Xu, Q., Hong, H., Wu, J., Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. Trends in Food Science and Technology, 86(July 2018), 399–411

Y. Wei, F. Vriesekoop, Q. Yuan, et al. (2018). Lactoglobulin as a nanotransporter for glabridin: exploring the binding properties and bioactivity influences, ACS Omega 3, 12246–12252.

Yan, S., Xie, F., Zhang, S., Jiang, L., Qi, B., Li, Y. (2021). Effects of soybean protein isolate – polyphenol conjugate formation on the protein structure and emulsifying properties: Protein – polyphenol emulsification performance in the presence of chitosan. Colloids and Surfaces A, 609.

Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., Wu, Y. (2019). Effect of pyrogalllic acid (1,2,3 benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and

antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *LWT- Food Science and Technology*, 109, 443-449.

Yildirim-Elikoglu, S., Erdem, Y. K. (2018). Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes, and the future trends in the dairy industry. *Food Reviews International*, 34(7), 665–697.

Yin, C., Yang, L., Zhao, H., Li, C.-P. (2014). Improvement of antioxidant activity of egg white protein by phosphorylation and conjugation of epigallocatechin gallate. *Food Research International*, 64, 855–863.

Yoshie-Stark, Y., Bez, J., Wada, Y., Wäsche, A. (2004). Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7681–7689.

Yoshie-Stark, Y., Wada Y., Wäsche (2008): Chemical composition, functional properties, and bioactivities of rapeseed protein isolates. *Food Chemistry* 107, 32-39.

You, J., Luo, Y., Wu, J. (2014). Conjugation of ovotransferrin with catechin shows improved antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2581–2587.

You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., Lin, S. (2012). Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *Food Science and Technology*, 46, 164–168.

Yu, J.M., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing, *Food Chemistry*, 103, 121–129.

Zhao, Q., Selomulya, C., Xiong, H., Chen, X. D., Li, X., Wang, S., et al. (2014). Rice dreg protein as an alternative to soy protein isolate: Comparison of nutritional properties. *International Journal of Food Properties*, 17(8), 1791–1804

Zhao, Y., Sun, Z. (2017). Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S2822–S2832.

Złotek, U. (2018). Antioxidative, potentially anti-inflammatory, and antidiabetic properties, as well as oxidative stability and acceptability, of cakes supplemented with elicited basil. *Food Chemistry*, 243, 168-174.



Zuidam, N. J., Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 3-29.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

## План третмана података

<b>Назив пројекта/истраживања</b>
<i>Ин vitro</i> дигестија и њен утицај на активност, стабилност и доступност биолошки активних једињења
<b>Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање</b>
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад б) в)
<b>Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање</b>
<b>1. Опис података</b>
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input checked="" type="radio"/> а) квантитативни <input type="radio"/> б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ <input checked="" type="radio"/> д) узорци ткива: навести врсту уљана погача тикве, кајсије и шљиве <input checked="" type="radio"/> ђ) снимци, фотографије: навести врсту микрографије инкапсулата, слике узорака у току рада <input checked="" type="radio"/> е) текст, навести врсту литература ж) мапа, навести врсту _____ <input checked="" type="radio"/> з) остало: описати експериментални резултати</p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p><input checked="" type="radio"/> а) Excel фајл, датотека .xlsx б) SPSS фајл, датотека _____ <input checked="" type="radio"/> в) PDF фајл, датотека .pdf <input checked="" type="radio"/> г) Текст фајл, датотека .docx <input checked="" type="radio"/> д) JPG фајл, датотека .tiff е) Остало, датотека _____</p>

## 1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли \_\_\_\_\_  
 б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) \_\_\_\_\_

## 1.3.3. Поновљена мерења

- а) да  
 б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак између поновљених мера је од неколико минута до неколико дана  
 б) варијабле које се више пута мере односе се на сва експериментална мерења  
 в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као \_\_\_\_\_

Напомене: \_\_\_\_\_

*Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?*

- а) Да  
 б) Не

*Ако је одговор не, образложити* \_\_\_\_\_

## 2. Прикупљање података

## 2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент, навести тип ензимске хидролизе протеинских супстрата, инкапсулација, испитивање физичких, морфолошких и биолошких особина узорака  
 б) корелационо истраживање, навести тип \_\_\_\_\_  
 в) анализа текста, навести тип прикупљање литературних података и упоређивање са експерименталним подацима  
 д) остало, навести шта \_\_\_\_\_

2.1.2 *Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).*

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

## 2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

- а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да  Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? \_\_\_\_\_  
 б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да  Не   
 в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података \_\_\_\_\_

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан понављањем експерименталних мерења.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података је контролисана њиховим упоређивањем са експерименталним и литературним подацима.

### 3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у НаРдУс – Националном репозиторијуму дисертација у Србији и у репозиторијуму Информационог система научне делатности Универзитета у Новом Саду.

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs/>, <http://www.uns.ac.rs/index.php/univerzitet/javnost-rada-2/javni-uvid-doktorske>

3.1.3. DOI \_\_\_\_\_

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до \_\_\_\_\_

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог \_\_\_\_\_

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? \_\_\_\_\_

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? \_\_\_\_\_

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да  Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да  Не

Образложити

---



---

#### 4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности ([https://www.paragraf.rs/propisi/zakon\\_o\\_zastiti\\_podataka\\_o\\_licnosti.html](https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html)) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

---

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

---



---

#### 5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

---



---

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

---



---

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

---

#### 6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Јелена Чакаревић, [jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs](mailto:jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs)

*6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима*

Јелена Чакаревић, [jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs](mailto:jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs)

*6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима*

Јелена Чакаревић, [jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs](mailto:jelena.cakarevic@tf.uns.ac.rs)