



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Potencijal brašna od različitih vrsta insekata
kao alternativnih izvora proteina u ishrani
životinja
DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:
Dr Ljiljana Popović, vanredni profesor
Dr Olivera Đuragić, naučni savetnik

Kandidat:
Danka Dragojlović, mast. inž.

Novi Sad, 2022. godine

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA¹

Vrsta rada:	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora:	Danka Dragojlović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad dr Olivera Đuragić, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije u Novom Sadu
Naslov rada:	Potencijal brašna od različitih vrsta insekata kao alternativnih izvora proteina u ishrani životinja
Jezik publikacije (pismo):	Srpski (latinica)
Fizički opis rada:	Uneti broj: Stranica (177) Poglavlja (7) Referenci (332) Tabela (13) Slika (50)
Naučna oblast:	Tehnološko inženjerstvo
Uža naučna oblast (naučna disciplina):	Prehrambeno inženjerstvo
Ključne reči / predmetna odrednica:	Optimizacija uzgoja insekata, brašno od insekata, hrana za životinje, alternativni proteini, funkcionalne osobine proteina, bioaktivne osobine proteina
Rezime na jeziku rada:	U okviru ove doktorske disertacije istraživanja su bazirana na optimizaciji uslova uzgoja različitih vrsta insekata u cilju proizvodnje visoko nutritivnog brašna od insekata, kao alternativne sirovine u ishrani životinja. Istraživanja su sprovedena na tri vrste insekata- crvu brašnaru, super crvu i popcima. Praćen je uticaj supstrata i vreme uzgoja insekata na nutritivna svojstva insekatskog brašna poput opštih hemijskih analiza, aminokiselinskog, masnokiselinskog i mineralnog sastava. U drugoj fazi, istraživanja su bazirana na izolaciji proteina i unapređenju procesa ekstrakcije i čistoće proteina. U ovoj fazi dobijeni proteini su iskarakterisani u pogledu funkcionalnih i bioloških osobina. U trećoj fazi ove doktorske disertacije sprovedena je enzimaska hidroliza proteinskog izolata. Dobijeni hidrolizati su ispitani kroz različite testove na antimikrobnu aktivnost.

¹ Autor doktorske disertacije potpisao je i priložio sledeće:

5 – 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.

	Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji čine naučno saznanje o uslovima uzgoja insekata, nutritivnom sastavu različitih vrsta insekatskog brašna, kao i njihovim proteinima, koji mogu naći široku primenu u industriji hrane za životinje i prehrambenoj industriji.
Datum prihvatanja teme od strane nadležnog veća:	30.09.2021.
Datum odbrane: (Popunjavanje odgovarajuća služba)	
Članovi komisije: (titula, ime, prezime, zvanje, institucija)	<p>Predsednik: dr Sanja Podunavac-Kuzmanović, redovni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član (mentor): dr Ljiljana Popović, vanredni profesor, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član (mentor): dr Olivera Đuragić, naučni savetnik, Univerzitet u Novom Sadu, Naučni institute za prehrambene tehnologije u Novom Sadu</p> <p>Član: dr Marija Jokanović, docent, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad</p> <p>Član: dr Sonja Gvozdenc, naučni saradnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Novi Sad</p>
Napomena:	

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Danka Dragojlović
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad dr Olivera Đuragić, principal research fellow, Institute of Food Technology
Thesis title:	Potential of different insect meals as an alternative protein sources in animal nutrition
Language of text (script):	Serbian language (latin)
Physical description:	Number of: Pages (177) Chapters (7) References (332) Tables (13) Illustrations (50)
Scientific field:	Technological Engineering
Scientific subfield (scientific discipline):	Food engineering
Subject, Key words:	Rearing optimization, Insect meal, animal feed, alternative proteins, functional properties of proteins, bioactive properties of proteins
Abstract in English language:	<p>The research of this doctoral dissertation, was based on the optimization of insect rearing conditions with the aim of high nutrition insect meals production as an alternative feedstuffs. Research was conducted on three different insect specie - yellow meal worm, super worm and house cricket. It was investigated the influence of different substrates and time of rearing on nutritional properties of insect meals, such as proximate analysis, amino acid, fatty acid and mineral composition.</p> <p>In the second phase, research was based on protein isolation and improvement of protein extraction and purity. In this phase obtained proteins were characterized in terms of functional and biological properties.</p> <p>In the third phase of this doctoral thesis enzymatic hydrolysis of protein isolates was obtained. Acquired hydrolyses were investigated on the different antimicrobial tests.</p> <p>The results presented in this doctoral dissertation constitute scientific knowledge of the conditions of insect rearing, the nutritional composition of different insect meals, as well as their proteins which can be widely used in the feed and food production.</p>

² 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.

Accepted on Scientific Board on:	30.09.2021.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	<p>President: dr Sanja Podunavac-Kuzmanović, full professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member (supervisor): dr Ljiljana Popović, associate professor, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member (supervisor): dr Olivera Đuragić, principal research fellow, University of Novi Sad, Institute of Food Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Marija Jokanović, assistant professor, University of Novi Sad, Faculty of Technology Novi Sad</p> <p>Member: dr Sonja Gvozdenc, research associate, Institute of Field and Vegetable Crops, National Institute of the Republic of Serbia</p>
Note:	

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Cilj istraživanja	4
3. Pregled literature.....	7
3.1 Jestivi insekti kroz istoriju.....	8
3.2 Izazovi u industriji hrane za životinje	9
3.3 Alternativni proteini u industriji hrane za životinje	11
3.3.1 Alternativni biljni izvori proteina	12
3.3.2 Insekti kao alternativni proteini	14
3.4 Crv brašnar (<i>Tenebrio molitor</i>)	16
3.4.1 Životni ciklus crva brašnara	17
3.4.2 Nutritivni sastav larvi crva brašnara	19
3.4.3 Potencijalna primena crva brašnara u ishrani životinja	21
3.5 Super crv (<i>Zophobas morio</i>)	23
3.5.1 Životni ciklus super crva	23
3.5.2 Nutritivni sastav larvi super crva.....	25
3.5.3 Potencijalna primena super crva u ishrani životinja.....	27
3.6 Popci (<i>Acheta domesticus</i>)	28
3.6.1 Životni ciklus popaca.....	29
3.6.2 Nutritivni sastav popaca	30
3.6.3 Potencijalna primena popaca u ishrani životinja	31
3.7 Opšte osobine proteina	33
3.7.1 Opšte osobine amino kiselina	35
3.7.2 Proteini insekata	38
3.7.3 Ekstrakcija proteina iz brašna insekata.....	39
3.7.4 Enzimaska hidroliza proteina insekata	40
3.7.5 Funkcionalne osobine proteina.....	41
3.7.6 Bioaktivne osobine proteina/peptida	43
4. Materijal i metode	49
4.1 Materijal	50
4.1.1 Uzgoj crva brašnara i super crva	51
4.1.2 Uzgoj popaca	54

4.2 Metode.....	56
4.2.1 Određivanje mase i dužine larvi super crva, crva brašnara i odraslih jedinki popaca..	56
4.2.2 Osnovne hemijske analize	57
4.2.3 Određivanje sadržaja masnih kiselina u ulju insekata	57
4.2.4 Određivanje sadržaja amino kiselina u brašnu insekata	58
4.2.5 Određivanje sadržaja mineralnih komponenti u brašnu od insekata	60
4.2.6 Mikrobiološke analize	60
4.2.7 Dobijanje izolata proteina.....	61
4.2.8 Karakterizacija proteinskih izolata	63
4.2.9 Enzimaska hidroliza proteina izolata	64
4.2.10 Antimikrobna aktivnost proteinskog hidrolizata (PH)	65
4.3 Obrada rezultata	68
4.3.1 Statistička obrada rezultata	68
4.3.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) analiza	68
4.3.3 Veštačka neuronska mreža ANN model.....	68
4.3.4 Višeciljna optimizacija MOO (<i>Multi-objective optimization</i>).....	69
5. Rezultati i diskusija.....	70
5.1 Dužina larvi crva brašnara, super crva i popaca nakon perioda uzgoja	71
5.2 PCA analiza.....	72
5.2.1 PCA analiza brašna od crva brašnara i super crva.....	73
5.2.2 PCA analiza brašna od popaca	75
5.3 Nutritivni sastav brašna crva brašnara i super crva.....	77
5.3.1 Prinos crva brašnara i super crva	77
5.3.2 Sadržaj proteina u brašnu crva brašnara i super crva	78
5.3.3 Sadržaj masti u brašnu crva brašnara i super crva.....	80
5.3.4 Sadržaj pepela i sirovih vlakana u brašnu super crva i crva brašnara	82
5.3.5 Svarljivost proteina u brašnu crva brašnara i super crva	83
5.4 Nutritivni sastav brašna popaca.....	83
5.4.1 Prinos popaca.....	83
5.4.2 Sadržaj proteina u brašnu popaca	84
5.4.3 Sadržaj masti u brašnu popaca.....	85
5.4.4 Sadržaj pepela i sirovih vlakana u brašnu popaca	85

5.4.5 Svarljivost proteina u brašnu popaca.....	86
5.5 Aminokiselinski sastav brašna crva brašnara i super crva	88
5.6 Aminokiselinski sastav u brašnu popaca.....	92
5.7 Mineralni sastav brašna od crva brašnara i super crva.....	94
5.8 Mineralni sastav brašna od popaca.....	98
5.9 Masnokiselinski sastav brašna crva brašnara i super crva	100
5.10 Masnokiselinski sastav brašna popaca	103
5.11 Optimizacija uslova gajenja insekata	106
5.12 Mikrobiološke analize brašna od insekata	108
5.13 Izolacija i karakterizacija proteina insekata	110
5.13.1 Hemijski sastav brašna od insekata	110
5.13.2 Modifikacija uslova alkalne ekstrakcije	111
5.13.3 Karakterizacija PI insekata	114
5.13.4 Funkcionalne osobine PI	120
5.13.5 Biološke osobine PI.....	124
5.14 Enzimaska hidroliza.....	129
5.14.1 SDS gel elektroforeza.....	132
5.14.2 Antimikrobna aktivnost PH insekata.....	133
6. Zaključak.....	143
7. Literatura.....	150

1. Uvod

Usled povećanja ljudske populacije, ekonomskog razvoja, povećanja potrošnje energije i promene navika potrošača, potreba za hranom je sve veća. Kako meso predstavlja jednu od osnovnih proteinskih namirnica, čiji su resursi limitirani, industrija hrane za životinje (kao prva karika u lancu ishrane) se suočava sa novim izazovima, koji imaju za cilj poboljšanje postojeće proizvodnje kao i potragu za novim alternativnim izvorima hrane za životinje, a naročito proteinskih komponenti.

U 2011. godini proizvedeno je 870 miliona tona hrane za životinje, čija se vrednost procenjuje na 350 milijardi dolara. Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (*Food and Agriculture Organization*, FAO) do 2050. godine proizvodnja hrane će morati da poraste za 70% kako bi se zadovoljile svetske potrebe. Trenutno najčešće korišćeni izvori proteina u ishrani životinja su sojina sačma kao sirovina biljnog porekla i riblje brašno animalnog porekla. Cena ribljeg brašna, najkvalitetnijeg izvora animalnih proteina, je visoka. Takođe, usled preterane eksploatacije ribe, iz mora i okeana, limitirana je količina, što predstavlja potencijalni problem u budućnosti. S druge strane, biljni proteini dobijeni kao nusproizvod industrije ulja, su deficitarni u pogledu pojedinih esencijalnih amino kiselina, a njihova proizvodnja je ograničena usled nedostatka obradivog zemljišta. Samo u poslednjih osam godina, cena proteinskih hraniva se udvostručila i već predstavlja 60-70% ukupnih troškova proizvodnje hrane za životinje. Zbog sveg ovoga, potražnja i istraživanja na temu alternativnih izvora proteina je od velikog značaja.

Jedno od potencijalnih rešenja je masovno uzgajanje insekata u cilju proizvodnje visokoproteinskog hraniva. Masovnija upotreba ovog hraniva u industriji hrane za životinje, primarno bi mogla da bude alternativa ribljem brašnu, sojinoj sačmi i ribljem ulju.

U svetu je danas poznato između 1500-2000 jestivih insekata. Većina od njih se sakuplja iz prirodnih staništa. Na području Azije, Afrike i Latinske Amerike, insekti predstavljaju redovnu namirnicu u ishrani ljudi, jer je jeftina, a nutritivno bogata sirovina. Takođe, nije nepoznanica da se insekti vekovima masovno uzgajaju u cilju proizvodnje meda, svile, kao i u medicinske svrhe. Zapadne civilizacije teško prihvataju upotrebu insekata u svakodnevnoj ishrani ljudi, najčešće zbog bojazni od toksičnih, mikrobioloških i hemijskih komponenti. Ove bojazni su većinom neutemeljene, jer većina jestivih insekata, ukoliko se gaji pod kontrolisanim uslovima predstavlja bezbednu sirovinu. Ovome u prilog ide i činjenica da se u poslednje vreme sve veći broj zemalja Zapadne Evrope odlučuje na masovnu proizvodnju insekata u cilju proizvodnje brašna i ulja. Za

industrijske potrebe, proizvodnja jestivih insekata predstavlja relativno jednostavan proces i ne zahteva velika ekonomska ulaganja. Potreba za prostorom je daleko manja, sirovine koje se koriste u proizvodnji su jeftinije, a upotreba vode je daleko manja u poređenju sa proizvodnjom konvencionalnih proteina. Dodatno, konverzija hrane kod insekata je mnogo efikasnija nego kod toplokrvnih životinja, jer ne zahtevaju utrošak energije na održavanje telesne mase.

Sa stanovništva ekologije i zaštite životne sredine, postoji mnoštvo prednosti za masovni uzgoj insekata, pogotovo šte se njime doprinosi realizaciji koncepta cirkularne ekonomije. Za potrebe uzgoja insekata mogu da se koriste biljne sirovine nižeg kvaliteta, poljoprivredni i prehrambeni otpad. Na ovaj način proizvodnja insekata je veoma ekonomski isplativa i održiva, jer se za dobijanje visokoproteinskog i nutritivno bogatog proizvoda koristi otpad, a supstrat koji zaostaje nakon uzgoja može da se koristi u obogaćivanju zemljišta kao organsko đubrivo. Tokom uzgoja insekata emisija gasova sa efektima staklene bašte, je mnogo manja u odnosu na proizvodnju drugih animalnih proteina.

Iako Evropska Unija i FAO organizacija rade na popularizaciji upotrebe insekata u ishrani ljudi i životinja, u zemljama zapadnog sveta još uvek nije u potpunosti prihvaćen ovaj trend u ishrani ljudi, dok je u slučaju životinjske ishrane situacija u mnogome povoljnija.

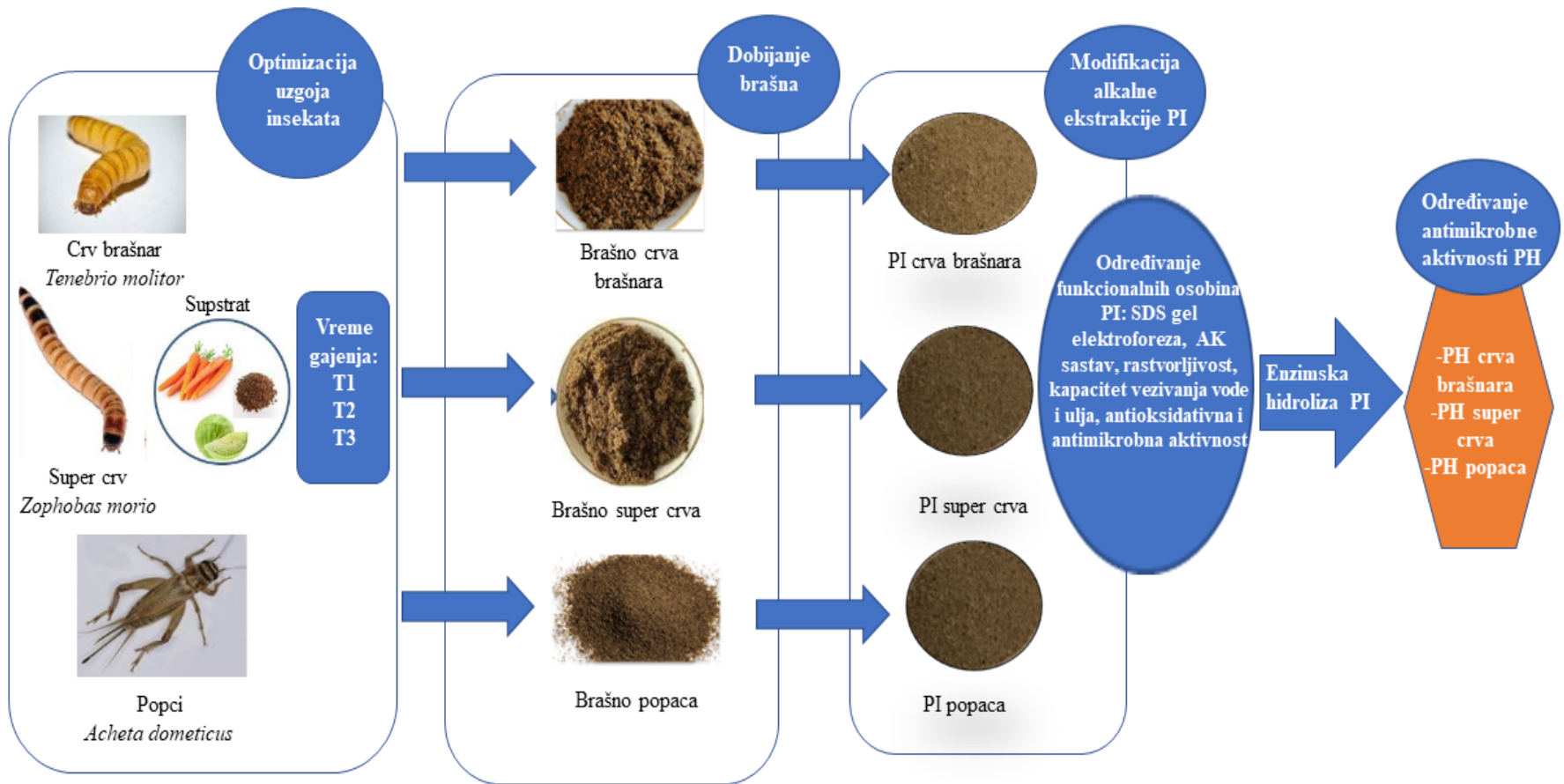
Primena insekata u proizvodnji hrane za životinje ima veliki potencijal, pogotovo u ishrani riba i živine, koji za ove vrste životinja već predstavljaju prirodnu hranu. Iako animalni proteini predstavljaju kvalitativno bolju sirovinu u odnosu na biljne u pogledu sadržaja esencijalnih amino kiselina, njihova primena u ishrani životinja je usled zakonskih regulativa ograničena. Usled nedostatka animalnih proteina u ishrani životinja, insekti kao sirovina nutritivno bogata proteinima, mastima i mineralima imaju veliki potencijal kao izvor animalnih proteina, ali mogu delimično ili u potpunosti da zamene riblje brašno. U poslednjih par godina donete su zakonske regulative Evropske unije, koje dozvoljavaju upotrebu insekata u ishrani riba, živine, svinja i pasa. Međutim da bi se omasovila proizvodnja insekata neophodna su dalja istraživanja, koja će stručnim znanjem i stavovima potkrepiti donošenje novih regulativa, a sve u cilju dobijanja bezbednog i kvalitetnog proizvoda.

2. Cilj istraživanja

Istraživanje ove doktorske disertacije se sastoji iz dva dela. Prvi deo ima za cilj optimizaciju uzgoja različitih vrsta insekata u cilju proizvodnje brašna od insekata. Drugi deo istraživanja ima za cilj izolaciju proteina iz brašna insekata i ispitivanje njihovih funkcionalnih osobina, sa mogućnošću dalje primene u industriji hrane za životinje. Ciljevi istraživanja su grafički prikazani na Slici 1.

Prvi deo eksperimenta obuhvata odabir insekatskih vrsta i ispitivanje uticaja različitih uslova uzgoja (vrste supstrata, trajanja uzgoja) na nutritivne vrednosti brašna. Na osnovu dostupne literature i moguće primene u ishrani životinja, odabrane su tri različite vrste: *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae, crv brašnar), *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae, super crv) i *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae, popac). U cilju obogaćivanja nutritivnog sastava punomasnog brašna od insekata, odabrana su tri različita supstrata za uzgoj, dok je vreme uzgoja izabrano na osnovu životnog ciklusa svake insekatke vrste. Kriterijumi za izbor supstrata su bili niska cena koštanja sirovine, poput otpada iz prehrambene industrije i poljoprivredne proizvodnje, ali i dostupnost za naše podneblje. Za karakterizaciju nutritivnog sastava brašna odabrani su sledeći parametri: osnovni hemijski sastav, amino kiseline, minerali i masne kiseline.

Drugi deo ove doktorske disertacije se odnosio na optimizaciju procesa/postupka izolacije proteina i određivanju funkcionalnih karakteristika izolata. U cilju dobijanja što većih prinosa, optimizacija izolacije proteina se bazira na modifikaciji alkalne ekstrakcije, koja podrazumeva korekciju vrednosti pH ekstrakcije i precipitacije. Radi dobijanja što čistijeg proteinskog izolata, uključen je i korak prečišćavanja, koji podrazumeva ponovljenu ekstrakciju taloga proteina. Proteinski izolati, karakterisani su sledećim osobinama: SDS elektroforeza, rastvorljivost, kapacitet vezivanja vode i ulja, antioksidativna i antimikrobna aktivnost i aminokiselinski sastav. Kako bi ispitao potencijal za antimikrobnu aktivnost, izvedena je enzimaska hidroliza izolata, a potom je dobijeni hidrolizat podvrgnut različitim antimikrobnim testovima na dve vrste bakterija.



Slika 1. Prikaz faza istraživanja, PI-proteinski izolat, PH- proteinski hidrolizat

3. Pregled literature

3.1 Jestivi insekti kroz istoriju

Pretpostavlja se da su insekti desetinama hiljada godina bili sastavni deo ljudske ishrane. Na osnovu slika pronađenih u pećinama, kao i hemijskom analizom zuba praistorijskog čoveka potvrđeno je da, upotreba insekata u ljudskoj ishrani datira još od perioda od 30.000 do 9.000 godina p.n.e. (van Itterbeeck i van Huis, 2012). Veruje se da je praistorijski čovek na osnovu posmatranja životinja i njihove ishrane insektima, najverovatnije usvajao njihove navike, po kojima je uvrstio insekte u svoju svakodnevnu ishranu (Baiano, 2020).

Tokom istorije, stari Rimljani i Grci su pravili specijalna jela od skakavaca i različitih larvi, a Alžirci su kovali skakavce u slanoj vodi, a potom ih sušili na suncu. U Australiji su stari Aboridžini redovno koristili moljce u ishrani, tako što su ih skupljali u prirodi, termički obrađivali u vrelom pesku, a potom odstranjivali ekstremitete i glavu, kako bi meso dalje koristili u ishrani (Bryant, 2008). U kineskoj medicini se vekovima insekti koriste u ishrani zbog svojih mnogobrojnih pozitivnih uticaja po zdravlje čoveka (Dossey, 2010). Najpoznatije religije današnjice u svojim svetim spisima spominju upotrebu insekata u ljudskoj ishrani i dozvoljavaju njihovu upotrebu (Das, 2020).



Slika 2. Konzumacija jestivih insekata na Institutu za prehrambene tehnologije u Novom Sadu

Danas je u svetu poznato oko 2.000 jestivih insekata, a više od 2 milijarde ljudi na svetu ih svakodnevno upotrebljava u svojoj ishrani (van Huis i sar., 2013). Većina ovih grupa pripada narodima Azije, Afrike i Latinske Amerike, što se može objasniti činjenicom da za mnoge insekte, usled klimatskih uslova, ove teritorije predstavljaju prirodno stanište, te se zbog toga skupljaju iz prirode i redovno koriste u ishrani. Nasuprot ovome, u zapadnim civilizacijama, urbanizacija je u mnogome promenila način života savremenog čoveka i udaljila ga od prirode, čime se ishrana čoveka više ne zasniva na sakupljanju hrane iz prirodnog staništa (Cozzolino i sar., 2012). U Evropi je entomofagija (ishrana insektima) zastupljena u 11 država i još uvek nije široko rasprostranjena (Jongema, 2017). Međutim, u poslednje vreme je prisutan trend porasta popularizacije insekata u ishrani ljudi (Slika 2).

Nasuprot ljudima, većina životinja prirodno koristi insekte u svojoj svakodnevnoj ishrani. U poslednjih par godina beleži se rastući trend masovnog uzgoja insekata, u cilju proizvodnje brašna za potrebe ishrane životinja. Najčešće se masovno uzgajaju larve *Hermetia illucens*, *Tenebrio molitor* i *Alphitobius diaperinus*, dok se skakavci i popci koriste za ishranu kućnih ljubimaca i životinja u zoološkim vrtovima (Derrien i Boccuni, 2018)

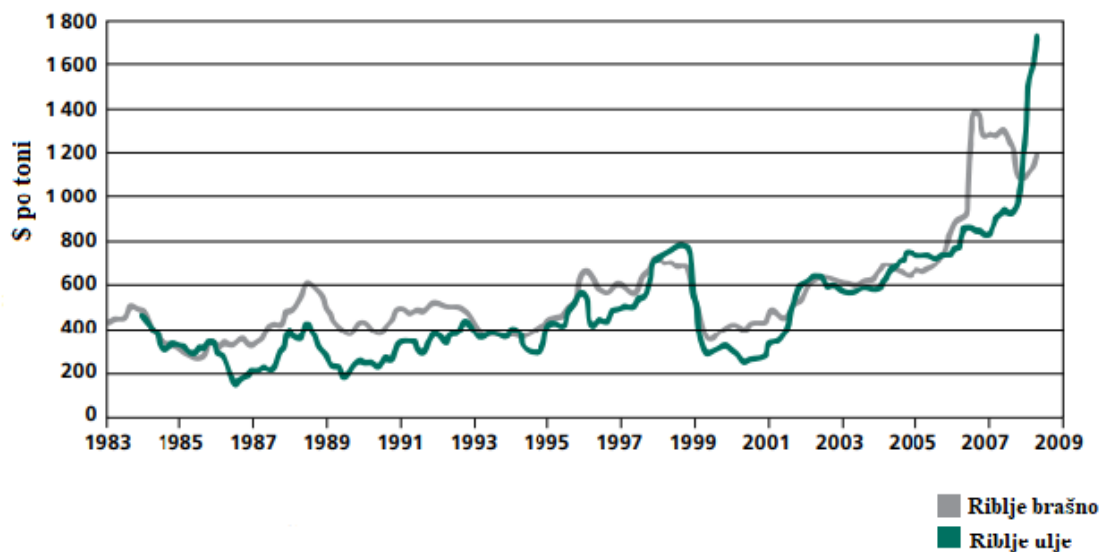
3.2 Izazovi u industriji hrane za životinje

The International Feed Industry Federation (IFIF) je globalna organizacija koja ima važnu ulogu u promovisanju održive, zdrave i bezbedne hrane za životinje na globalnom nivou. Njena uloga je veoma važna u zemljama u razvoju, gde zajedno sa FAO organizacijom radi na poboljšanju internacionalnih zakona i standarda koji utiču na industrijsku proizvodnju hrane za životinje, a sve u cilju proizvodnje bezbednih, kvalitetnih i održivih proizvoda. Upravo su ove dve organizacije predvidele da će se do 2050. godine proizvodnja hrane povećati za 70%, a da će samim tim i potreba za hranom za životinje kao prvom karikom u industriji hrane biti duplirana (IFIF, 2012). Za uzgoj stoke koristi se 75% obradivog poljoprivrednog zemljišta i 8% ukupne količine vode koju čovek koristi (Foley i sar., 2011). Ove brojke ukazuju na to da poljoprivredni usevi u budućnosti neće moći da zadovolje potrebe industrije hrane za životinje. U proizvodnji hrane za životinje, danas se najčešće koriste sojina sačma/ulje i riblje brašno/ulje (Apri i Komalasari, 2020). Takođe, procenjuje se da je stočarstvo jedan od glavnih zagađivača vazduha

sa udelom od 14,5% ukupne emisije gasova staklene bašte (7,1 gigatona CO₂ godišnje), stoga je veoma poželjna upotreba alternativnih proteina i u ljudskoj ishrani (Gerber i sar., 2013).

Sojina sačma predstavlja energetski bogatu sirovinu sa izbalansiranim aminokiselinskim sastavom i najčešće se upotrebljava u ishrani stoke (Lević i sar., 2005). Međutim, za uzgoj soje su potrebne velike količine vode i velika površina obradivog zemljišta, a često je povezana i sa nekontrolisanom upotrebom pesticida (Thévenot i sar., 2018).

Najčešće korišćena sirovina animalnog porekla u industriji hrane za životinje je riblje brašno. Trenutno 10% izlovljene ribe se koristi za proizvodnju ribljeg brašna/ulja, koje se dalje najčešće koriste u ishrani riba (FAO, 2011). U poslednjih desetak godina cena ribljeg brašna je dramatično skočila na tržištu (Grafik 1), i iako je trend rasta zaustavljen, cena je i dalje ostala izuzetno visoka (Tacon i Metian, 2008). Takođe, sve je veći problem sa izlovljavanjem riba i pritisak javnosti da se industrija hrane za životinje, a pogotovo proizvođači riba okrenu ka upotrebi održivih sirovina (Deutsch i sar., 2007). Imajući u vidu i trenutnu situaciju na globalnom nivou i energetska krizu, cena transporta pomorskih brodova i proizvodnja ribljeg ulja/brašna će biti veća u godinama koje dolaze. S tim u vezi, cena ribljeg brašna i ulja u budućnosti neće biti isplativa za male proizvođače, što će ih primorati da se okrenu ka upotrebi nekih alternativnih sirovina (van Huis i sar., 2013).



Grafik 1. Cena ribljeg ulja i brašna (\$) po toni. (Tacon i Metian, 2008)

Na osnovu svega navedenog, jasno je da se industrija hrane i hrane za životinje nalazi na prekretnici i da je neophodno da se nađu rešenja koja će doprineti manjem utrošku energije, manjem zagađenju životne sredine, a istovremeno da zadovolje nutritivne zahteve životinja. Većinu ovih zahteva bi mogao da ispuni masovni uzgoj inesketa, kao nove visokoproteinske sirovine. U svetu trenutno postoji nekoliko fabrika za masovni uzgoj insekata, čiji kapacitet nije veći od 10 t dnevno (Cortes Ortiz, 2016). Ovaj kapacitet bi mogao da zadovolji zahteve samo nekoliko farmi za uzgoj živine (Cortes Ortiz, 2016). Ovi podaci ukazuju na neophodnost da se poveća broj fabrika za uzgoj insekata, kako bi ova sirovina postala konkurentna konvencionalnim sirovinama poput soje (van Huis i sar., 2015). Da bi sve ovo bilo izvodljivo, neophodno je da se optimizuju uslovi gajenja insekata, čime bi se smanjili troškovi proizvodnje i tako omogućili širu upotrebu insekata u industrijskoj preradi hrane za životinje.

3.3 Alternativni proteini u industriji hrane za životinje

U ishrani monogastričnih životinja, trenutno se u svetu najčešće koriste proteinske sirovine kao što su kukuruz, sojina i suncokretova sačma i pogača uljane repice (Đuragić i sar., 2021). S obzirom da se industrija hrane za životinje susreće sa velikim problemima uslovljenim nedostatkom raspoloživih proteinskih sirovina, sve su veće težnje ka potrazi za novim, alternativnim izvorima proteina.

Prilikom odabira novih proteinskih sirovina, neophodno je da ove sirovine budu dostupne, da im tržišna cena bude zadovoljavajuća, ali istovremeno i da ispune zahteve u vidu kvalitete i da ne sadrže antinutrijente. Neki od najčešćih biljnih alternativnih proteinskih sirovina su različite vrste pasulja, grašak, sočivo, konoplja i različite vrste semenki žitarica (Đuragić i sar., 2021). Životinjski proteini imaju povoljniji aminokiselinski profil i sadržaja minerala u odnosu na biljne, te se zbog toga sve više istražuje primena različitih insekata, morskih organizama i školjki u ishrani životinja (Miller, 2004). Najveća prepreka u bržoj i široj primeni ovih sirovina su zakonske regulative, prihvatljivost konzumenata i cena koštanja, koja nije konkurentna sa cenama konvencionalnih proteina (Đuragić i sar., 2019).

3.3.1 Alternativni biljni izvori proteina

Kako potrošači, tako i prehrambena industrija se sve više okreće ka upotrebi biljnih proteina, kao zdravijoj i održivijoj sirovini u odnosu na životinjske proteine.

3.3.1.1 Mahunarke i semena uljarica

Postoji veliki broj različitih biljnih sirovina koje se mogu koristiti kao izvori proteina, ali najčešće su to različite vrste mahunarki i uljarica (Asgar i sar., 2010; Multari i sar., 2016).



Slika 3. Prikaz uzgoja fava pasulja (https://www.legumehub.eu/is_article/growing-faba-bean-and-pea-in-the-nordic-region/)

Iako dovoljno neistražena mahunarka, fava pasulja (*Vicia faba L.*) ima izuzetan potencijal za ishranu životinja (Slika 3). Ova mahunarka sadrži oko 28% proteina, 1-2% ulja i veoma je bogata vlaknima (7-9%) i polifenolima (Multari i sar., 2016). Osim svojih nutritivnih karakteristika, ova biljka se može posmatrati i sa stanovišta ekologije, jer smanjuje količinu azota u vazduhu i može da raste u ekstremnim klimatskim uslovima (Multari i sar., 2016). Sočivo i grašak, koji su slabijeg kvaliteta i nisu za ljudsku upotrebu, se takođe mogu koristiti u ishrani životinja, kao visokoproteinske sirovine, čiji se sadržaj kreće od 25 do 28% (Landero i sar., 2012). Glavna prepreka u široj upotrebi sočiva i graška u ishrani životinja je sadržaj antinutritjenata. Upotrebom nekih od termičkih tretmana, ovaj sadržaj se može smanjiti, ali će istovremeno povećava njegovu tržišnu cenu (Millar i sar., 2019).

Osim mahunarki, u ishrani životinja se mogu koristiti i visokoproteinske uljane pogače, koje nastaju kao nusproizvod u industriji ulja, nakon ceđenja ulja. Tako bi pogača uljane tikve mogla da nađe upotrebu u ishrani preživara, jer sadrži preko 60% proteina i bogata je esencijalnim amino kiselinama poput lizina i metionina (Klir i sar., 2017). Pokazano je i da utiče na poboljšanje ukusa i usvojivosti hraniva i da ne dolazi do smanjenja produkcije mleka u periodu laktacije kod koza (Klir i sar., 2017).

3.3.1.2 Mikroalge

Mikroalge su visokokvalitetno hranivo, koje se može koristiti kako u ishrani ljudi, tako i u ishrani životinja (Đuragić i sar., 2021). Izuzetno su bogate proteinima, čiji se sadržaj kreće od 30 do 70%, ali i esencijalnim masnim kiselinama, kako linoleinskom (C18:3n3, n-3) tako i linolnom (C18:2n6c, n-6) (Kusmayadi i sar., 2021). Veruje se da je riblje ulje bogato esencijalnim masnim kiselinama, upravo iz razloga što se ribe hrane algama (Kusmayadi i sar., 2021). Mikroalge imaju i visok sadržaj pigmenata, koji su poznati kao prirodni antioksidansi, a takođe su bogate i vitaminom B12 (Hong i sar., 2017).



Slika 4. Izgled biomase mikroalgi nakon perioda gajenja (Hong i sar., 2017)

Upotreba mikroalgi u ishrani životinja ima pozitivno dejstvo na prirast i na imunološko stanje životinja usled bioaktivnih komponenti koje imaju antibakterijsko i antivirusno dejstvo (Lorenzo i sar., 2018). S obzirom da je vreme uzgoja mikroalgi relativno kratko, a biomasa koja se dobija velika, čine ovo hranivo jednim sa najvećim potencijalom u daljoj upotrebi u industriji hrane za životinje (Madeira i sar., 2017). Izgled biomase mikroalgi prikazan je na Slici 4.

3.3.1.3 Proteini mikroorganizama algi, gljiva, kvasaca i bakterija *Single-cell protein*

Biomasa mikroorganizama može da bude hrana budućnosti. Pre više od šest decenija prvi put se pominje termin *Single-cell protein* koji obuhvata proizvodnju biomase mikroorganizama, koja bi se koristila u ishrani ljudi i životinja kao nutritivno bogato i visokokvalitetno hranivo (Jones sar., 2020). Sadržaj proteina biomase na bazi bakterija može da se kreće u vrednostima od 50 do 80%, čime se svrstavaju u visokoproteinska hraniva budućnosti (Jones i sar., 2020). Rast biomase mikroorganizama, poput kvasaca, gljiva, algi i bakterija je veoma veliki i u poređenju sa biljnim kulturama, jer se oni svakodnevno mogu koristiti, dok su biljke dostupne samo u jednom periodu godine (Đuragić i sar., 2021).

3.3.2 Insekti kao alternativni proteini

Insektima se prirodno hrane mnoge životinje poput živine i riba (Slika 5). Poznato je da se u ribolovu mušice i larve muva koriste kao mamci (van Huis i sar., 2013). S obzirom da se mnoge životinje prirodno hrane insektima, pretpostavlja se da su ove životinje evolutivno adaptirane na ovakvu vrstu hrane (Sealey i sar., 2011; Biasato i sar., 2016). U prilog tome idu i poslednja istraživanja, koja su pokazala da većina insekata može u potpunosti da zadovolji nutritivne potrebe životinja u pogledu nutritivnog i aminokiselinskog sastava (Makkar i sar., 2018).



Sika 5. Slikoviti prikaz brojlera kako prirodno koriste crve u svojoj ishrani
(<https://smallpethub.com/can-chickens-eat-mealworms/>)

Najveći broj istraživanja koji se bazirao na ishrani životinja insektima obuhvatio je larve muva *Hermetia illucens* (Schiavone i sar., 2017; Schiavone i sar., 2018) i *Musca domestica* (Hussein i sar., 2017; Allegratti i sar., 2018) i brašnara *Tenebrio molitor* (Iaconisi i sar., 2017; Secci i sar., 2018) i. Istraživanja podrazumevaju potpunu ili delimičnu zamenu konvencionalnih sirovina (sojine sačme i ribljeg brašna) sa larvama insekata. Dobijeni rezultati pokazuju da je upotreba insekata u ishrani prasadi, pilića i riba dovela do poboljšanja njihovog zdravstvenog stanja, prinosa, ali i kvaliteta mesa (Veldkamp i sar., 2012; Barroso i sar., 2014; Biasato i sar., 2018).

Upotreba insekata u ishrani životinja ima mnoštvo prednosti u odnosu na upotrebu konvencionalnih proteina: i) insekti u potpunosti mogu da zadovolje nutritivne zahteve većine životinja; ii) njihova proizvodnja ima mnogo manji uticaj na životnu sredinu u odnosu na proizvodnju konvencionalnih proteina; iii) neophodan prostor za proizvodnju 1kg insekata je znatno manji u odnosu na konvencionalne proteine; iv) njihovom proizvodnjom se smanjuje poljoprivredni i prehrambeni otpad (koji se koristi u ishrani) za dobijanje visokoproteinskog i kvalitetnog proizvoda (Oonincx i Boer; 2012; van Huis i Oonincx; 2017; Makkar, 2018; Meneguz i sar., 2018).

Od 2000. godine počinje da raste broj fabrika za proizvodnju brašna od insekata. Najviše se za potrebe životinja uzgajaju larve muve *Hermetia illucens*, pri čemu su proizvedene količine ovog insekta udvostručene u periodu od 2014 do 2016. godine (Sogari i sar., 2019). U zavisnosti

od vrste životinja, larve ovog insekta mogu da zamene od 25-100% sojine sačme i ribljeg brašna. Za njihov uzgoj koristi se većinom prehrambeni otpad, čija proizvedena količina iznosi 1,3 milijarde tona godišnje, a vrednost dostiže 750 milijardi \$ (FAO, 2011; The Economist, 2014). Većina fabrika za uzgoj larvi *Hermetia illucens* se nalazi u SAD-u, Kanadi, Kini, Južnoj Africi, ali u poslednjih par godina i u Francuskoj, Holandiji i Nemačkoj.

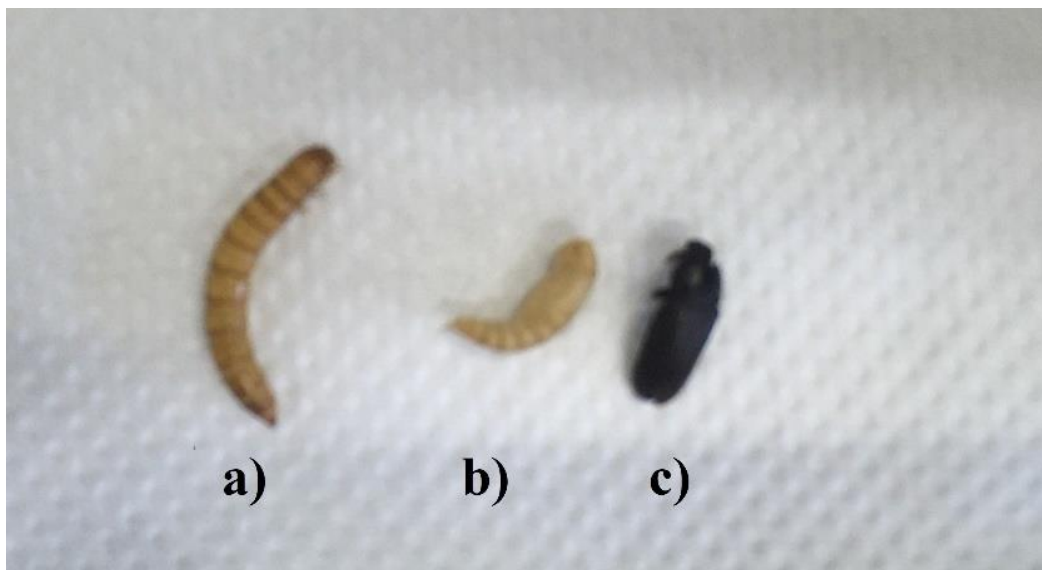
Osim ispitivanja kvaliteta i zdravstvene bezbednosti mesa, od životinja hranjenih insektima, veoma je važno da se ispita tržište i sveopšta prihvatljivost od strane konzumenata ovakvih proizvoda. Ovo se prvenstveno odnosi na stanovnike zapadne i centralne Evrope, gde je upotreba insekata u ishrani ljudi i životinja i dalje neuobičajena. Na osnovu ispitivanja tržišta, u poslednjih par godina pokazao se rastući trend u prihvatanju mesa dobijenog od životinja hranjenih insektima. Tako se u istraživanjima u periodu od 2013-2015. godine, 88% ispitanika izjasnilo da želi više informacije o upotrebi insekata u ishrani životinja, dok se 64% izjasnilo da nema bojazni o upotrebi ovakvog mesa u svakodnevnoj ishrani (Verbeke i sar., 2015). U 2016. godini većina ispitanika u oblasti ribarstva je dalo pozitivno mišljenje o upotrebi insekata u ishrani riba, pri čemu su negativna mišljenja bila od onih koji su verovali da se ishranom insekata utiče na ukus mesa ribe (Mancuso i sar., 2016). Samo dve godine kasnije, gotovo 80% ispitanika se izjasnilo pozitivno o upotrebi insekata u ishrani riba (Ankamah-Yeboah i sar., 2018). Na osnovu ispitivanja došlo se do zaključka da ispitanici i dalje nemaju dovoljno informacija o pozitivnom uticaju uzgoja insekata kako na životnu sredinu, tako i na zdravstveno stanje životinja i kvalitet mesa (Sogari i sar., 2019). Popularizacijom insekata i pružanju više informacija o njihovom pozitivnom uticaju u ishrani životinja i ljudi, može se znatno povećati njihova sveopšta prihvatljivost.

3.4 Crv brašnar (*Tenebrio molitor*)

Crv brašnar (Coleoptera: Tenebrionidae, *Tenebrio molitor*) je insekt koji se najčešće posmatra kao skladišna štetočina. Pronalazi se u različitim vrstama brašna i zrnastog materijala, a rasprostranjen je širom sveta (Ramos-Elorduy, 2002; Jajić i sar., 2020). U poslednjih par godina ovaj insekt se posmatra i kao jestiva vrsta.

3.4.1 Životni ciklus crva brašnara

Crv brašnar prolazi kroz četiri životna stadijuma: jaje, larva, lutka i odrasla jedinka - imago (Slika 6). Ženke ovog insekta mogu da polože u proseku 500 jaja, iz kojih se nakon 3-9 dana na temperaturi od 25°C pile larve (Ghaly i sar., 2009; Li i sar., 2013). Larve crva brašnara su žuto-braon boje i u ovom stadijumu mogu da ostanu u periodu od 1-8 meseci (Siemianowska i sar., 2013). Prosečna dužina larvi crva brašnara iznosi od 2,0-3,5 cm. Nakon stadijuma larve, prelaze u stadijum lutke, koji traje od 5-28 dana (u zavisnosti od temperature), dok nakon toga dolazi stadijum bube, koji traje u proseku 2-3 meseca (Li i sar., 2013; Hong i sar., 2020). Čitav životni ciklus pri optimalnim uslovima može da traje od 75 do 90 dana (Spencer i Spencer, 2006). Odrasla jedinka crva brašnara, imago, je jedna od najvećih vrsta iz reda Coleoptera i prosečne dužine je oko 1 cm (Siemianowska i sar., 2013).



Slika 6. Razvojni stadijumi crva brašnara a) larva, b) lutka i c) imago

Ambijentalna relativna vlažnost i temperatura su veoma važni uslovi za uzgoj crva brašnara. Optimalna temperatura za njihov uzgoj od 25-28°C (Kim i sar., 2015), dok su temperature niže od 10 i više od 35°C letalne za ovu vrstu insekta. Temperature niže od 17°C sprečavaju razmnožavanje, dok temperature veće od 30°C izazivaju veću stopu smrtnosti (Koo i sar., 2013). Osim temperature, na normalan razvoj crva brašnara utiče i relativna vlažnost vazduha. Dokazano je da je optimalna vlažnost vazduha za uzgoj ove vrste između 60 i 75% (Ribeiro i sar., 2018).

U ishrani životinja i ljudi, koriste se larve crva brašnara (Slika 7). Prema načinu ishrane, larve ovog insekta se mogu svrstrati u svaštojede, odnosno mogu da se hrane i životinjskim i biljnim materijalom, pri čemu je važno da sirovina sadrži minimum 20% proteina (Ramos-Elorduy, 2002). U uslovima komercijalnog gajenja najčešće se u njihovoj ishrani koriste pšenične mekinje ili pšenično, ovseno i kukuruzno brašno, dok se kao izvor vode dodaju različite vrste povrća i voća (Hong i sar., 2013). Neka istraživanja su pokazala da vrsta ishrane crva brašnara utiče na nutritivni sastav larvi i da se optimizacijom ishrane može poboljšati kvalitet proizvedenog brašna (Rumbos i sar., 2020; Jajić i sar., 2020; Dragojlović i sar., 2022).



Slika 7. Prikaz larvi crva brašnara

Koeficijent konverzije hrane u slučaju celokupne mase (*feed conversion ratio, FCR*) za crva brašnara iznosi tri, dok za živinu i prasad iznosi 1,7 i 2,3 respektivno (Oonincx i sar. 2015; Wilkinson i sar. 2011). Imajući u vidu da su svi delovi larve jestivi, za razliku od drugih animalnih proizvoda, može se reći da je konverzija hrane u slučaju crva brašnara bolja u odnosu na živinu i prasad (Wilkinson i sar. 2011). Dnevna specifična stopa rasta (*specific growth rate/day*) pri optimalnim temperaturama je viša u odnosu na živinu i iznosi 16,6% (Bjørge i sar., 2018). Slično kao i u slučaju nutritivnog sastava, pokazano je da vrsta ishrane crva brašnara utiče na njegov rast i reprodukciju (Rumbos i sar., 2020), čime se opet nameće ideja o neophodnosti optimizacije uzgoja insekata.

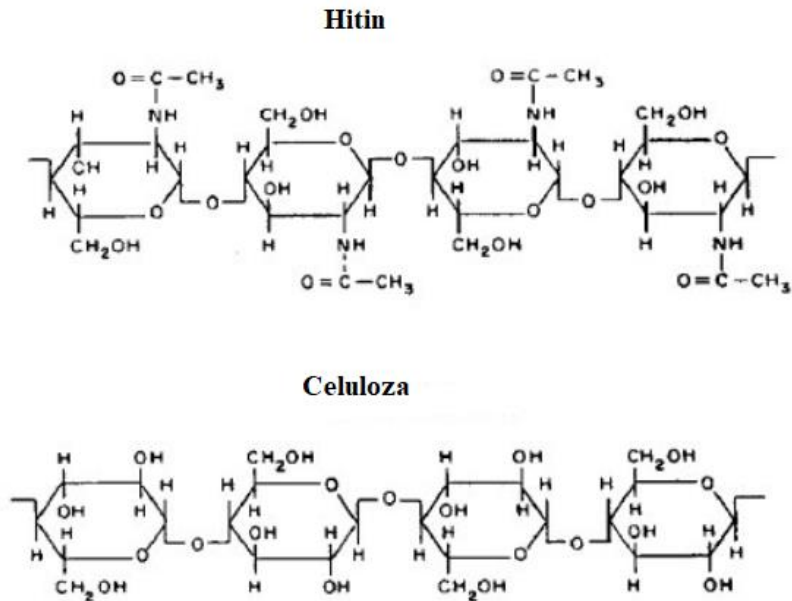
3.4.2 Nutritivni sastav larvi crva brašnara

Larve crva brašnara su prepoznate kao nutritivno bogata sirovina koja bi u budućnosti mogla da se redovno koristi u ishrani ljudi i životinja. U ishrani životinja, larve crva brašnara imaju potencijal da se koriste kao punomasno brašno, proteinsko brašno i ulje. Punomasno brašno podrazumeva osušene larve, koje su potom samlevene i dalje mogu da se koriste u ishrani životinja. Obezmašćeno proteinsko brašno podrazumeva da se iz punomasnog brašna ekstrahuje ulje (mehanički ili putem nekih zdravstveno bezbednih rastvarača), čime se dobijaju dve sirovine: proteinsko brašno i ulje.

Larve crva brašnara su prepoznate kao izvor proteina, čiji se sadržaj kreće u vrednostima od 47,0 do 60,2% (Ghosh i sar., 2017; Ao i sar., 2020; Boulous i sar., 2020). U poređenju sa konvencionalnim sirovinama, koje se pretežno koriste u formulacijama životinjskih hraniva, može se reći da je sadržaj proteina u larvama crva brašnara viši nego u sojinoj sačmi (49,4%) i nešto niži u odnosu na riblje brašno (67,5%) (Boulous i sar., 2020). Larve crva brašnara sadrže polisaharid hitin (izgrađen od glukozamina i N-acetilglukozamina), koji u svojoj strukturi sadrži azot. Zbog toga neki autori smatraju da je sadržaj proteina dobijen Kjeldahl metodom nerealno visok, jer se prilikom proračuna uzima ukupan azot koji se množi sa koeficijentom (kp) od 6,25. Stoga su za proračun proteina u crvu brašnaru predloženi i sledeći koeficijenti: 4,74 (Belghit i sar., 2019); 4,75 (Janssen i sar., 2017) i 5,41 (Boulous i sar., 2020). Kada bi se u obzir uzeli ovi koeficijetni, može se reći da bi sadržaj proteina bio sličan sa proteinima u sojinoj sačmi, dok bi daleko niži bio u poređenju sa ribljim brašnom.

U zavisnosti od načina tehnološkog postupka obrade larvi, sadržaj masti u larvama crva brašnara se kreće u intervalu od 19,1 do 36,7% (Ghosh i sar., 2017; Boulous i sar., 2020; Hong i sar., 2020). U poređenju sa sojinom sačmom (1,4%) i ribljim brašnom (10,4%), larve crva brašnara sadrže veću količinu masti (NRC, 2012). Sadržaj sirovih vlakana u larvama se kreće u opsegu od 4,19 do 22,35% i uglavnom potiče od kutikule (Hong i sar., 2013). Vrednosti za sadržaj sirovih vlakana su veće u odnosu na riblje brašno (0,26%) i slične sa sojinom sačmom (7,43%) (NRC, 2012). Najveći udeo u ukupnim vlaknima čini hitin, koji je kompleksnim strukturama vezan za proteine, lipide i ostale komponente (Selenius i sar., 2018). Po svojoj strukturi hitin je veoma sličan celulozi (Slika 8), pa se za njegovo određivanje mogu koristiti ADF vrednosti (acid detergent fiber) (Finke i sar., 2007). Sadržaj pepela u larvama crva brašnara se kreće od 2,65 do 6,99%, što

je niže u odnosu na sadržaj pepela u sojinoj sačmi (7,2%) i ribljem brašnu (17,2%) (NRC, 2012; Hong i sar., 2020).



Slika 8. Strukturna formula hitina i celuloze (Le, 2000)

Aminokiselinski sastav crva brašnara je visokokvalitetatan, stoga se može smatrati za kvalitetnu proteinsku sirovinu pogodnu za ishranu životinja. Najzastupljenije esencijalne amino kiseline su leucin, valin i lizin, dok su manje zastupljene histidin, metionin i triptofan (Ravzanadii i sar., 2012; Heidari-Parsa, 2018). Količina lizina se kreće od 1,58 do 5,76%, dok je metionin prisutan u količini od 0,52 do 2,20% računato na suhu materiju (Jin i sar., 2016; Yoo i sar., 2019). Sadržaj lizina, metionina, treonina, triptofana i valina je veći u odnosu na količinu u sojinoj sačmi, dok je sadržaj lizina, metionina i treonina niži u larvama crva brašnara u odnosu na riblje brašno (NRC, 2012).

Najzastupljeniji mineral u larvama crva brašnara je fosfor i nalazi se u količinama od 0,70 do 1,04% (računato na suhu materiju) (Ravzanadii i sar., 2012). Kalijum se takođe nalazi u znatnoj količini, od 0,74 do 0,95%, dok je najmanje prisutan kalcijum i to od 0,04 do 0,50% (Boulous i sar., 2020). Od mikroelemenata najviše je zastupljen cink i to u količini od 102,0 do 117,40 mg/kg, a najmanje bakar od 12,3 do 20 mg/kg (Heidari-Parsa, 2018).

U pogledu zasićenih masnih kiselina, larve crva brašnara sadrže najveću količinu palmitinske kiseline (C16:0) u vrednostima od 9,33 do 17,21%, zatim miristinske kiseline (C14:0)

od 2,12 do 5,21% i stearinske (C18:0) u opsegu od 0,26 do 3,06%. U okviru mononezasićenih masnih kiselina najzastupljenije je oleinska (C18:1n9c) u rasponu od 40,78 do 49,71%, dok je jedna od esencijalnih kiselina, linolna (C18:2n6c) najviše zastupljena među polinezasićenim masnim kiselinama, od 24,19 do 35,58% (Ravzanadii i sar., 2012; Heidari-Parsa, 2018). Druga esencijalna masna kiselina linolenska (C18:3n3) je prisutna u malom procentu i to od 0,35 do 2,27%. Nekoliko istraživanja je pokazalo da uticaj ishrane insekata utiče na masnokiselinski sastav larvi i da se može obogatiti dodatkom hraniva bogatog esencijalnim masnim kiselinama u toku gajenja insekata (St-Hilaire i sar., 2007; Oonincx i sar., 2021).

3.4.3 Potencijalna primena crva brašnara u ishrani životinja

Larve crva brašnara imaju veliki potencijal da se koriste u ishrani živine i to kao potpuna ili delimična zamena sojinoj sačmi i ribljem brašnu. U pogledu proteina i masti, larve crva brašnara bi mogle u potpunosti da zadovolje potrebe većine gajenih životinja (Ramos-Elorduy i sar., 2002). Međutim, nedostatak je limitirajući sadržaj metionina i neadekvatan odnos Ca:P (Makkar i sar., 2014). Ovaj nedostatak se prevazilazi dodavanjem sintetičkog metionina i CaCO₃ (stočne krede) u formulaciju za ishranu životinja (Đuragić i sar., 2009).

Živinarstvo

U ishrani brojlera preporučuje se dodavanje do 10% suvih larvi crva brašnara, bez negativnih posledica na ukus i miris hraniva kao i na usvajanje i konverziju hrane (Ramos-Elorduy i sar., 2002). Dok se u nekim slučajevima preporučuje udeo i do 25% u smeši, bez negativnih uticaja (Schiavone i sar., 2014). Smeša za brojlere koja sadrži od 0,3 do 15% larvi crva brašnara može pozitivno da utiče na prirast i konverziju hrane bez negativnog uticaja na ukus i miris mesa (Benzertiha i sar., 2020; Sedgh-Gooya i sar., 2020). Dodatak crva brašnara u ishrani brojlera može da ima pozitivno dejstvo na zdravlje i imunološko stanje brojlera, jer je pokazano da je odnos albumina/globulina u krvi povoljniji, što najverovatnije ima veze sa prebiotskim dejstvom hitina (Bovera i sar., 2015). Na osnovu rezultata bioloških oglada, može se reći da se produkcija jaja može povećati za 2,5% ukoliko se u ishranu koka nosilja uključi i brašno crva brašnara (Sedgh-Gooya i sar., 2021).

Ribarstvo

Larve crva brašnara mogu da se koriste u uzgoju različitih vrsta riba, gde u zavisnosti od načina ishrane (da li su svaštojedi ili mesojedi) može da se dozira odgovarajuća količina ovog hraniva (Henry i sar., 2015). Tokom tehnološkog procesa proizvodnje hrane za ribe, najčešće se koristi proces ekstrudiranja (Banjac i sar., 2021). Punomasno brašno od crva brašnara može negativno uticati na kvalitet proizvedenog ekstrudata, stoga je neophodno da se brašno prvo obezmasti kako bi se dalje koristilo u proizvodnji hrane za ribe (Rema i sar., 2019).

U ishrani pastrmke punomasno brašno crva brašnara može da zameni 50% ribljeg brašna, dok ga u potpunosti može zameniti ukoliko se brašno obezmasti (Belforti i sar., 2015; Melenchón i sar., 2020). U ishrani brancina punomasno brašno crva brašnara može da zameni 30-50% ribljeg brašna i pri tome nema uticaja na rast i konverziju hrane (Antonopoulou i sar., 2019; Mastoraki i sar., 2020). Obezmašćenjem brašna može da se poveća i njegov udeo, i tada može da zameni 80% ribljeg brašna (Mastoraki i sar., 2020). Zamena 60% ribljeg brašna, brašnom od crva brašnara ne utiče na performanse rasta i prinos somova, dok veće količine redukuju rast i konverziju hrane (Roncari i sar., 2015). Pokazano je da upotrebom brašna ovog insekta dolazi do znatnog povećanja mase škampa (shrimp) i bolje konverzije hrane, pri čemu bi brašno crva brašnara u potpunosti moglo da zameni riblje brašno u ishrani ovih rakova (Chung i sar., 2015). Rezultati istraživanja bioloških ogleda na ribama i uticaj ishrane crvom brašnarom su pokazala pozitivne rezultate i mogućnost dalje komercijalizacije ovog brašna (Shafique i sar., 2021).

Svinjarstvo

Za razliku od živinarstva i ribarstva, do danas ima malo podataka o potencijalnoj primeni crva brašnara u ishrani svinja i prasadi. Za ishranu ovih životinja, bila bi neophodna velika količina ovog hraniva, pa verovatno zbog toga još uvek nema dovoljno dostupnih podataka o njihovom uticaju na ishranu (Hong i sar., 2021). Međutim, neki ogledi koji se odnose na uticaj ishrane crva brašnara na stanje prasadi su ipak sprovedeni.

Uključivanje brašna od crva brašnara u ishranu prasadi do 6% dovodi do povećanja prirasta i konverzije hrane (Jin i sar., 2016). Suplementacija brašnom dovodi do povećane svarljivosti proteina i lakšeg usvajanja amino kiselina, što se manifestuje poboljšanim rastom prasadi (Meyer i sar., 2020). U ogledima u kojima je izvršena potpuna zamena ribljeg brašna, brašnom ovog

insekta, nije bilo značajnog uticaja na prirast i konverziju hrane u odnosu na ishranu ribljim brašnom (Ao i sar., 2020; Ko i sar., 2020). Na osnovu pomenutih istraživanja, može se reći da je brašno crva brašnara pogodno za ishranu prasadi. Sa druge strane za ishranu svinja u porastu i tovu neophodna je mnogo veća količina brašna, te su dalja istraživanja o upotrebi ovog hraniva neophodna.

3.5 Super crv (*Zophobas morio*)

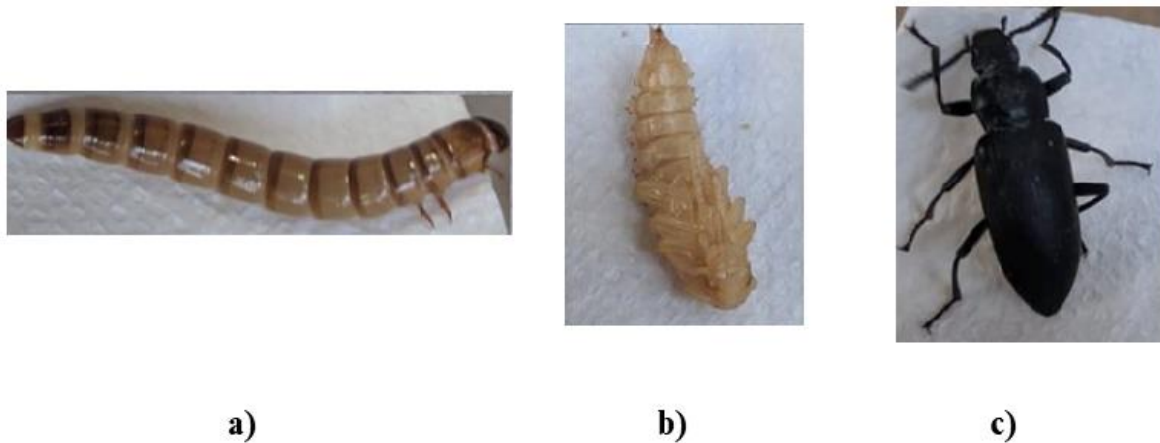
Super crv (Coleoptera: Tenebrionidae, *Zophobas morio*) je insekt koji ima veliki potencijal u prehrambenoj industriji i industriji hrane za životinje, ali je do skoro u potpunosti bio zanemaren od strane naučne zajednice. Nasuprot zapadnoj civilizaciji, drevni narodi u Meksiku ga upotrebljavaju u redovnoj ishrani ljudi, dok se u Brazilu gaji kao životinjsko hranivo (Ramos-Elorduy, 2009; Araujo i sar., 2019). U poslednjih par godina privlači sve veću pažnju kako naučne zajednice iz oblasti hrane, tako i uzgajivača insekata (Kim i sar., 2015; Harsányi i sar., 2020).

3.5.1 Životni ciklus super crva

Kao i crv brašnar, super crv pripada familiji Tenebrionidae. Insekti ove familije su poznati kao skladišne štetočine, ali super crv se može povezati sa ovim kontekstom jedino u slučaju pšeničnog brašna (Hangstrum i Subramanyam, 2009). To ukazuje da je njegova uloga kao skladišne štetočine zanemarljiva. Super crv je prirodno nastanjen u tropskim predelima Centralne i Južne Amerike, a u poslednje vreme se gaji i na teritoriji Evrope i Azije (Yuan i sar., 2012).

Super crv prolazi kroz četiri životna stadijuma: jaje, larva, lutka i odrasla jedinka- imago (Slika 9). Ženka super crva u proseku položi oko 2.000 jaja (Tschinkel, 1993), koja su okrugla i dužine oko 1,7 mm (Fursov i Cherney, 2018). Nakon osam dana, iz jaja se pile larve, na temperaturi od 25°C (Kim i sar., 2015), koje su žuto-braon boje, a čija dužina može da dosegne do 55 mm (Friederich i Volland, 2004). Dužina trajanja stadijuma larve je uslovljena mnogim faktorima, ali traje mnogo duže u odnosu na crva brašnara. Tako da larve koje se nalaze u uslovima gde se gaje sa ostalim larvama mogu da ostanu u ovom stadijumu u periodu od jedne godine (Mancini i sar., 2019). U stadijum lutke prelaze tek kada se fizički odvoje od ostatka larvi. Ovaj fenomen je povezan sa mehanizmom kontaktne simulacije između larvi i pokazano je, da je što je veća gustina larvi, manja je količina lutaka (Tschinkel i Willson, 1971; Kim i sar., 2015).

Pretpostavlja se da je ovapojava posledica odbrambenog mehanizma od kanibalizma (Rumbos i Athanassiou, 2021). Dakle, za masovno gajenje, a u cilju dalje reprodukcije super crva, ovaj fenomen bi mogao da bude otežavajuća okolnost, jer zahteva dosta dodatnog manuelnog rada, koji bi povećao troškove proizvodnje. Izolovane larve prelaze u stadijum lutke koji traje od 13-15 dana na temperaturi od 25°C (Quennedey i sar., 1995). Iz stadijuma lutke se kasnije razvijaju odrasle jedinke, koje su karakteristične crne boje i dužine od 38 do 57 mm. U ovom stadijumu super crv može da bude do 6 meseci (Fursov i Cherney, 2018).



Slika 9. Razvojni stadijumi super crva: **a)** larva, **b)** lutka i **c)** imago

Uslovi gajenja su veoma slični uslovima za crva brašnara. Optimalna temperatura za je između 25 i 28°C, a relativna vlažnost vazduha u opsegu između 60 i 70% (Zaelor i Kitthawee, 2018). Kanibalizam je česta pojava kod ove vrste insekata, stoga je veoma važno da se regulišu optimalni uslovi za rast i razvoj, kao i da ima dovoljno raspoložive hrane. Najčešće se u ishrani super crva koriste pšenične mekinje, različite vrste žitarica i brašna, dok se kao izvor vode i minerala dodaju različite vrste voća i povrća (Ichikawa i Kurauchi, 2009; van Broekhoven i sar., 2015). Neka istraživanja su pokazala da se super crv može gajiti na različitim vrstama prehrambenog otpada poput hleba, konditorskih proizvoda, kore od krompira i proizvodima industrije alkohola i vrenja poput kvasca, kao i ostacima kukuruza nakon destilacije (van Broekhoven i sar., 2015). Međutim, treba uzeti u obzir da otpad iz poljoprivredne industriji poput

različite vrste lišća može da uspori rast super crva, tako da je i u ovom slučaju važna optimizacija uslova gajenja ovog insekta (Harsányi i sar., 2020).

3.5.2 Nutritivni sastav larvi super crva

Kao i u slučaju crva brašnara, larve super crva, u odnosu na lutku i imaga, imaju najveći potencijal u ishrani životinja. Larve ovog insekata su veoma bogate nutrijentima (Slika 10). Najčešće se posmatraju kao proteinske sirovine, usled visokog sadržaja proteina koji se kreće od 38,75 do 53,75% (Barroso i sar., 2014; Bosch i sar., 2014; Adámková i sar., 2016). Slično kao i sa sadržajem proteina u crvu brašnaru, postoji mogućnost da su ove vrednosti više od realnog sadržaja proteina zbog prisustva hitina. U poređenju sa sojinom sačmom i ribljim brašnom, može se reći da larve ovog insekta imaju sličan sadržaj proteina sa sojinom sačmom, dok je nešto niži u odnosu na riblje brašno (NRC, 2012).



Slika 10. Larve super crva

Larve super crva su bogat izvor masti, čiji se sadržaj kreće u opsegu od 31 do 43,6% (Rumbos i Athanassiou, 2021). Količina masti u larvama super crva je uslovljena uslovima gajenja, polom, životnim stadijumom i ishranom larvi (van Broekhoven i sar., 2015; Adámková i sar., 2016). Količina masti je mnogo veća u odnosu na konvencionalne sirovine koje se koriste u ishrani životinja poput sojine sačme i ribljeg brašna (NRC, 2012). Stoga, imajući u vidu visok

sadržaj masti, larve super crva se mogu koristiti za dobijanje ulja u industriji hrane za životinje. Sadržaj sirovih vlakana u larvama super crva se kreće oko 9%, od čega najveći udeo ima hitin (Harsányi i sar., 2020). Sadržaj hitina u larvama super crva se kreće od 3,9 do 6% (Adámková i sar., 2016). Količina pepela u larvama super crva se kreće od 2,4 do 8,2%, što je veoma slično sa sadržajem pepela u sojinoj sačmi i manje u odnosu na riblje brašno (NRC, 2012).

Najzastupljenije esencijalne amino kiseline u larvama ovog insekta su leucin, lizin i izoleucin. Leucin je zastupljen od 3,4 do 4,5%, lizin od 2,4 do 2,9% i izoleucin od 2,2 do 2,4% (Bosch i sar., 2014; Finke, 2015). Kao hranivo u ishrani životinja, limitirajuća amino kiselina je metionin, čije se vrednosti kreću od 0,5 do 1,0% (Harsányi i sar., 2020). Od neesencijalnih aminokiselina najzastupljenije su glutaminska, od 5,7 do 6,6%, asparaginska, od 3,8 do 4,7% i tirozin od 3,3 do 3,9% (Bosch i sar., 2014; Finke, 2015). Aminokiselinski profil larvi super crva je veoma povoljan i zbog toga može da bude vredno hranivo u ishrani životinja, uz odgovarajuću suplementaciju metioninom. U pogledu aminokiselinskog profila, larve super crva bi mogle da budu adekvatna zamena sojinoj sačmi, ali nešto lošija ribljem brašnu (NRC, 2012).

Od mineralnih materija u larvama super crva, najzastupljeniji su kalijum u procentu od 0,75 do 0,77% i fosfor od 0,56 do 0,57%, dok je sadržaj kalcijuma, od 0,03 do 0,07%, i magnezijuma, od 0,04 do 0,1% veoma nizak (Rumbos i sar., 2020). Najzastupljeniji mikroelementi u larvama super crva su cink u rasponu od 2,3 do 8,2 mg/kg i gvožđe od 2,3 do 5,4 mg/kg (Finke, 2015). Nedostatak kalcijuma u ishrani životinja izaziva bolesti vezane za normalan razvoj kostiju. Međutim, suplementacijom kalcijuma u ishrani insekata bi mogao da se poveća njegov sadržaj u larvama insekata, čime bi omogućilo da ovo hranivo bude konkurento ribljem brašnu u pogledu sadržaja kalcijuma (Anderson, 2000).

U pogledu masnokiselinskog sastava, larve super crva su bogate zasićenim masnim kiselinama u udelu od 38,8 do 44,6% ukupnih masnih kiselina i mononezasićenim masnim kiselinama, u udelu od 32,1 do 42,4% ukupnih masnih kiselina (Araújo i sar., 2019). Od zasićenih masnih kiselina, najviše je zastupljena palmitinska kiselina (C16:0) u udelu ukupnih kiselina od 29,1 do 32,40%, a oleinska u slučaju mononezasićenih masnih kiselina (C18:1) od 31,1 do 38,0% na ukupan sadržaj masnih kiselina (Barroso i sar., 2014). U pogledu polinezasićenih masnih kiselina linolna kiselina je najzastupljenija i to u udelu od 15,6 do 23,4% (Araújo i sar., 2019). Kao i u slučaju masnokiselinskog sastava larvi crva brašnara, larve super crva imaju nizak sadržaj

linolenske kiseline, ali se ishranom može uticati na povećanje njene količine (St-Hilaire i sar., 2007).

3.5.3 Potencijalna primena super crva u ishrani životinja

Larve super crva predstavljaju nutritivno bogatu sirovinu, koja najviše ima potencijala da se koristi u ishrani živine i riba. Trenutno, jedan od mogućih ograničavajućih faktora za masovnjiju upotrebu može biti komplikovaniji uzgoj usled dodatnog manuelnog rada, koji zahteva izolaciju larvi za dalje postupak razmnožavanja i povećanje biomase.

Živinarstvo

U pojedinim istraživanjima pokazano je da dodatak malih količina (od 0,3 do 0,4%) punomasnog brašna od larvi super crva može pozitivno na da utiče na rast i imuni sistem brojlera (Islam i Yang, 2017; Benzertiha i sar., 2020). Dodatak punomasnog brašna od larvi super crva ima niz korisnih efekata na prirast, konverziju hrane, ilealnu svarljivost, dejstvo enzima pankreatina i na prebiotsko dejstvo (Benzertiha i sar., 2019). Prebiotsko dejstvo u crevnom traktu brojlera se ogleda u podsticanju rasta bakterija poput *Actinobacteria*, koje imaju zaštitnu ulogu od patogena (Józefiak i sar., 2020). Takođe, pokazano je da zamena sojinog ulja, uljem od larvi super crva nije uticala na performanse rasta brojlera i iskoristivost hrane, čime se pruža mogućnost šire upotrebe (Kierończyk i sar., 2018).

Ribarstvo

Super crv još uvek nije na listi zakonski odobrenih insekata Evropske Unije koji se mogu koristiti u ishrani riba. Međutim, ovo nije sprečilo da se mnoga istraživanja sprovedu na ovu temu. U naučnoj zajednici, larve super crva su prepoznate kao kvalitetno hranivo, koje može da zadovolji nutritivne potrebe većine riba i da smanji upotrebu ribljeg brašna.

Tako je pokazano da upotrebom larvi super crva u udelu od 15 i 30% kao zamena sojinog sačmi/ulju nije dovela do negativnog uticaja na rast vrste ribe *Nile tilapia* (Alves i sar., 2020). Ipak, veći udeo brašna od larvi super crva (više od 30%) vodi ka manjoj usvojivosti hrane, svarljivosti proteina i manjem prirastu, što je najverovatnije povezano sa deficitarnim sadržajem nekoliko esencijalnih amino kiselina poput metionina i triptofana u larvama super crva (Jabir i sar.,

2012a). Takođe, veće količine su imale uticaja na nutritivni sastav mesa ribe, koji je podrazumevao veći sadržaj vode i masti, a manji sadržaj proteina i pepela u odnosu na kontrolno hranivo (Alves i sar., 2020). Na osnovu istraživanja, u ishrani ribe *Nile tilapia*-e se preporučuje udeodo 25% brašna larvi super crva kao zamena ribljem brašnu (Jabir i sar., 2012b). Ovaj procenat bi mogao da bude veći, ukoliko se brašno super crva obogati sirovinama prirodno bogatim metioninom. Hidrolizovano i obezmašćeno brašno larvi super crva bi moglo da se koristi u većoj količini (30% zamena ribljem brašnu) u ishrani riba poput lososa sa pozitivnim dejstvom na konverziju hrane i prirast (Mikołajczak i sar., 2020).

Svinjarstvo

Larve super crva se mogu koristiti u ishrani prasadi, međutim potrebna je velika količina kako bi se zadovoljile nutritivne potrebe ovih životinja. Stoga, do danas je veoma malo istraživanja rađeno na ispitivanju uticaja ishrane larvama super crva na performanse rasta prasadi i svinja. Mali broj istraživanja je pokazao da dodatak brašna od larvi super crva u udelu od 5% pozitivno utiče na usvojivost amino kiselina u poređenju sa kontrolnim hranivom na bazi kukuruza i soje (Liu i sar., 2020). Istraživanje je pokazalo da se korišćenjem larvi super crva smanjuje učestalost dijareje, koja je karakteristična za period odbijanja prasadi od sisanja (Ji i sar., 2016). Što se tiče svinjarstva, može se reći da larve super crva imaju najveći potencijal u ishrani prasadi, ali su neophodna dalja istraživanja, kako bi se u budućnosti ovo hranivo moglo da se komercijalizuje.

3.6 Popci (*Acheta domesticus*)

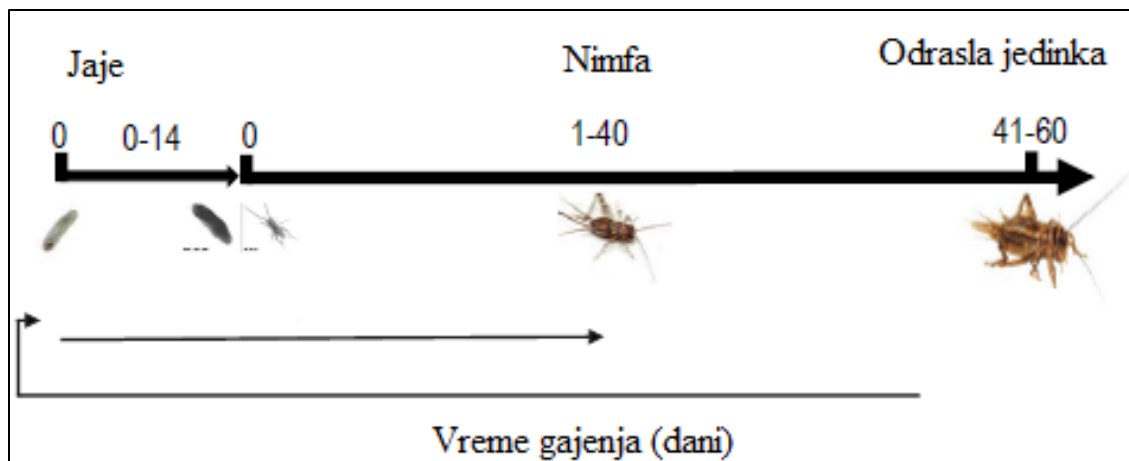
Popci (Orthoptera: Gryllidae, *Acheta domesticus*) potiču sa područja Jugozapadne Azije, a danas su jedni od najčešće masovno uzgajanih insekata na svetu (Lundy i Parrella, 2015). U pojedinim kulturama se koriste u ljudskoj ishrani, a široko se upotrebljavaju i u ishrani egzotičnih ljubimaca (van Huis, 2013). U ishrani se koriste odrasle jedinice (Slika 11). S obzirom na to da je vreme uzgajanja ovih insekata veoma kratko i da njihov uzgoj ne zahteva velike utroške energije, ovi insekti imaju veliki potencijal za široku upotrebu kako u ishrani životinja, tako i u ishrani ljudi.



Slika 11. Odršala jedinka popca

3.6.1 Životni ciklus popaca

Životni ciklus popa traje u proseku od 30 do 50 dana u zavisnosti od spoljašnjih uslova gajenja. Popci polažu jaja u treset, zemlju ili pesak, a potom se nakon 14 dana razvijaju nimfe. U stadijumu nimfe popci provode oko 40 dana. Zrelost u proseku dostižu nakon 41 do 60 dana od početka uzgoja (Slika 12) (Fernandez-Cassi i sar., 2019). Farme popaca godišnje mogu da proizvedu od 8-10 ciklucua (generacija) insekata (Halloran i sar., 2017). Prilikom masovnog uzgoja popaca, prosečna gustina iznosi od 6.000 do 12.000 popaca/m². Za uzgoj važno je da se podese optimalni uslovi za rast i razvoj. Optimalna temperatura je od 25 do 30°C, a relativna vlažnost vazduha od 60 do 80% (Fernandez-Cassi i sar., 2019).



Slika 12. Grafički prikaz uzgoja popaca (Fernandez-Cassi i sar., 2019)

U masovnoj proizvodnji popci se najčešće gaje na gotovoj smeši za uzgoj koka, sa visokim sadržajem proteina (od 20 do 22%). Neki proizvođači, da bi izbegli visoke troškove hrane, koriste prehrambeni otpad poput voća i povrća u proizvodnji popaca (Collavo i sar., 2005). Prilikom uzgoja ove vrste insekata važno je obezbediti izbalansiranu ishranu popaca sa dostupnom količinom vode i izvorima minerala i vitamina, jer se u suprotnom može javiti kanibalizam (Durst i Hanboonsong, 2015). Pojedina istraživanja su pokazala da se popci mogu gajiti na prehrambenom otpadu, pod uslovom da nutritivno zadovoljavaju njihove zahteve u pogledu sadržaja ugljenih hidrata i masti (Lundy i sar., 2015; Dobermann i sar., 2018).

3.6.2 Nutritivni sastav popaca

Sa stanovišta nutritivnog sastava popaca, može se reći da oni predstavljaju visokoproteinsku sirovinu, čiji se sadržaj kreće od 64,10 do preko 70% (Rumpold i Schlüter, 2013). U poređenju sa mesom junetine, svinjetine i piletine, sadržaj proteina u popcima je mnogo veći (Zhong, 2017). Iz tog razloga, teoretski popci bi u potpunosti mogli da zamene upotrebu ribljeg brašna i sojine sačme u ishrani životinja, u pogledu sadržaja proteina (Alfiko i sar., 2021). Za razliku od larvi crva brašnara i super crva, ovi insekti sadrže manju količinu masti, koja se kreće u vrednostima od 8,9 do 20% (Bawa i sar., 2020). Sa druge strane, iako je sadržaj masti veći u odnosu na sojinu sačmu i nešto malo veći u odnosu na riblje brašno ovaj sadržaj masti ne bi mogao da zadovolji nutritivne potrebe većine životinja (Alfiko i sar., 2021). Sadržaj pepela je relativno nizak i kreće se u vrednostima od 3 do 5%, dok je sadržaj ukupnih vlakana u vrednostima od 6 do 17% i čini ga pretežno hitin (Rumpold i Schlüter, 2013; Kulma i sar., 2019)

U pogledu aminokiselinskog sastava, popci sadrže sve esencijalne amino kiseline (Alfiko i sar., 2021). Najzastupljenije su leucin, izoleucin i valin (Finke, 2013). Od neesencijalnih amino kiselina najzastupljenije su glutaminska i asparaginska (Makkar i sar., 2014). Aminokiselinski profil popaca je bolji u odnosu na profil amino kiselina sojine sačme, dok je neophodno istaći da je i u slučaju popaca limitirajuća amino kiselina metionin (Alfiko i sar., 2021). Stoga, u ishrani životinja neophodna bi bila suplementacija sintetičkim metioninom, da bi se zadovoljili nutritivni zahtevi životinja.

U odraslim jedinkama popaca, najveći sadržaj od svih minerala zabeležen je u slučaju fosfora i kalijuma i to od 0,25 do 0,29% i od 0,134 do 0,135% (na suhu masu), respektivno (Finke, 2013). Popci su takođe siromašni u pogledu sadržaja kalcijuma, njegove vrednosti se kreću u opsegu od 0,04 do 0,13% (Rumpold i Schlüter, 2013). Imajući u vidu tako nizak sadržaj kalcijuma dalja upotreba u ishrani životinja bi zahtevala suplementaciju ovog minerala (Henry i sar., 2015).

Sadržaj masnih kiselina u ulju popaca je uslovljen životnim stadijumom i načinom ishrane popaca. Ali generalno, najviši sadržaj masnih kiselina čine polinezasićene masne kiseline i to oko 39,2%, zatim slede zasićene oko 33%, a potom mononezasićene kiseline u udelu od 25,1% (Makkar i sar., 2014). Od polinezasićenih masnih kiselina najzastupljenija je linolna (C18:2n6c), od mononezasićenih oleinska (C18:1n9), a od zasićenih palmitinska kiselina (C16:0) (Alfiko i sar., 2021). Od esencijalnih masnih kiselina deficitarna je linolenska kiselina (C18:3n3), ali je pokazano u nekim istraživanjima da se dodatkom sirovina bogatih ovom kiselinom može povećati njen sadržaj u ulju popaca (Oonincx i sar., 2015).

3.6.3 Potencijalna primena popaca u ishrani životinja

Sirovi popci se decenijama koriste u ishrani egzotičnih životinja, dok se sušeni kod nekih naroda koriste u ishrani domaćih životinja poput živine. Međutim, trenutno upotreba popaca bi mogla da nađe širu primenu u ljudskoj upotrebi u odnosu na životinjsku, jer im je cena na tržištu i dalje izuzetno visoka. Tako je cena kg ovog insekta u SAD-u 21,46 € što je mnogo skuplje u odnosu na kg konvencionalnih proteina poput junetine i piletine, ali se moguća primena može ogledati u suplementaciji i obogaćivanju pojedinih proizvoda poput hleba i keksa (Morales-Ramos, 2018; Luna i sar. 2021, Kowalski i sar., 2022). S obzirom da popci imaju veliki nutritivni

potencijal u ishrani domaćih životinja, optimizacijom gajenja i tehnološkom obradom, ovi insekti bi mogli u budućnosti da budu prihvatljiviji u industriji hrane za životinje.

Živinarstvo

Prema dostupnim podacima, na Filipinima postoji uzgoj kokošaka, čija ishrana podrazumeva upotrebu popaca i skakavaca. Dobijeno meso ove živine je visoko cenjeno i ukus je prijemčiv, pa je s tim u vezi cena mnogo viša u odnosu na meso koje je gajeno konvencionalnim hranivima (Khusro i sar., 2012). U ishrani brojlera brašno popaca može da zameni 5 do 15% ribljeg brašna bez negativnog uticaja na prirast i konverziju hrane (Wang i sar., 2005). Takođe, pokazano je da ishrana popaca može da poboljša aminokiselinski profil pilećeg mesa, a pojedina istraživanja su pokazala da utiče i na poboljšanje ukusa (Schiavone i sar., 2017).

Ribarstvo

Od svih životinja, upotreba popaca bi mogla da bude najznačajnija u uzgoju riba. Tako je pokazano da zamena ribljeg brašna u uzgoju soma može u potpunosti da bude zamenjena, a da pri tome nema negativne efekte na prirast i konverziju hrane (Taufek i sar., 2018a). Daljim istraživanjem je zaključeno da upotreba brašna od popaca ima niz prednosti koje se odnose na prirast, imunološko stanje, svarljivost proteina i nutritivni sastav mesa od soma (Taufek i sar., 2018b). Brašno popaca može da zameni do 25% ribljeg brašna u ishrani slatkovodnog grgeča, i da poboljša sadržaj linolne kiseline (C18:2n6c) u mesu ribe (Tilami i sar., 2020). U tehnološkom procesu proizvodnje hrane za ribe, najčešće se koristi ekstrudiranje kao tehnološka operacija, samim tim fizičke karakteristike ekstrudata su veoma važne za kvalitet proizvoda. Tako je u istraživanjima pokazano da dodatak brašna popaca ne utiče negativno na stepen ekspanzije, čvrstoću i na stepen otiranja proizvedenih ekstrudata (Irungu i sar., 2018).

Svinjarstvo

Gotovo da nema dostupne literature o upotrebi popaca u ishrani svinja i prasadi. Pre više od 70 godina, rađena su istraživanja o upotrebi skakavaca, koji pripadaju istom redu insekata kao i popci, redu Orthoptera. Istraživanja su dovela do zaključka da upotreba skakavaca ne utiče negativno na prirast prasadi, ali utiče na ukus i miris mesa. Tako meso prasadi hranjeno

skakavcima ima ukus na ribu, pri čemu se ovaj neprijatan ukus može smanjiti ukoliko se hranjenje skakavcima zaustavi tri nedelje pre klanja životinje (Hemsted, 1947).

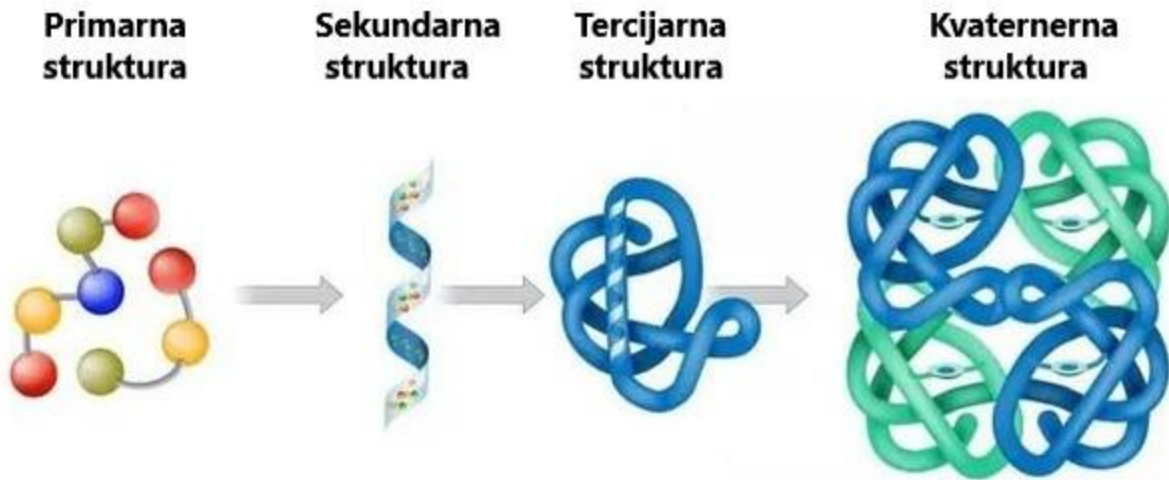
Za širu upotrebu brašna od popaca u industriji hrane za životinje, neophodno je da se sprovedu dalje studije i biološki ogledi na životinjama, a potom da se na osnovu rezultata predlože recepture, odnosno količine brašna od popaca, koje bi mogle da zamene upotrebu ribljeg brašna i sojine sačme.

3.7 Opšte osobine proteina

Proteini su jedni od najznančajnijih molekula u organizmu čoveka i životinja. Ljudsko telo je sastavljeno od 50% proteina (računato na suhu materiju), od čega najveći udeo ulazi u sastav mišića. Proteini imaju značajnu ulogu u telu čoveka i životinja, jer enzimi čine esencijalne proteine, a enzimi su odgovorni za normalan rad i funkcionisanje organizma. U sastav hromozoma i ribozoma ulaze proteini, a imunološki sistem čoveka je povezan sa proteinima, jer su antitela iz krvi u suštini specifični proteini.

Molekul proteina je izgrađen iz ugljenika (50-55%), vodonika (6-7%), kiseonika (20-23%), azota (12-19%), sumpora (0,2-3%) i fosfora (<3%) (Regenstein i Regenstein, 1984). U većini uzoraka sadržaj proteina se određuje po Kjeldahl metodi. Metodologija određivanja sadržaja proteina se zasniva na određivanju sadržaja azota, pri čemu je uzeta u obzir da je prosečan sadržaj azota u proteinu 16%, pa je samim tim opšte prihvaćeni faktor za preračunavanje proteina (kp) 6,25.

S obzirom da su proteini izuzetno kompleksne molekulske strukture, moraju se strukturalno mnogo šire posmatrati, . Molekuli proteina su kompleksni polimeri izgrađeni od 20 različitih aminokiselina vezanih peptidnim vezama. Struktura proteina se može posmatrati u četiri nivoa i to: primarna, sekundarna, tercijarna i kvaternerna struktura (Slika 13).



Slika 13. Različiti nivoi struktura proteina (Dastider i sar., 2020)

Primarnu strukturu proteina čine linearne sekvence amino kiselina vezane peptidnim vezama u linearni lanac. Raspored i vrsta aminokiselina je genetski određena i svaka promena na lancu menja biološku ulogu proteina.

Sekundarna strukturu proteina se odnosi na prostorni raspored polipeptidnih lanaca, odnosno vodonične veze koje se formiraju između N-H i C=O. Na osnovu prostornog rasporeda ovi proteini se mogu podeliti na: α heliks, β nabrana ravan i trostruki heliks.

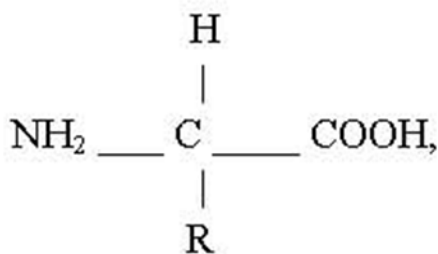
Tercijarnu strukturu čine veze između funkcionalnih grupa bočnih nizova amino kiselina i odnose se na način uvijanja polipeptidnog lanca. Ove veze čine nekovalentne interakcije poput vodoničnih i jonskih veza, hidrofobne interakcije, van der Valsove, dipol-dipol veze, itd.

Kvaternerna struktura nastaje međusobnim udruživanjem i polimerizacijom lanaca proteina tercijarne strukture, čime nastaju molekuli koji se sastoje od dva ili više polipeptidna lanca, odnosno subjedinice (Khan i sar., 2017).

Sa aspekta nutricionista i prehrambenih tehnologa najvažnije osobine proteina se ogledaju kroz njihov aminokiselinski profil i funkcionalne osobine. Ove osobine utiču na dobijanje visokonutritivnog, kvalitetnog i bezbednog proizvoda za dalju upotrebu u ishrani životinja i ljudi.

3.7.1 Opšte osobine amino kiseline

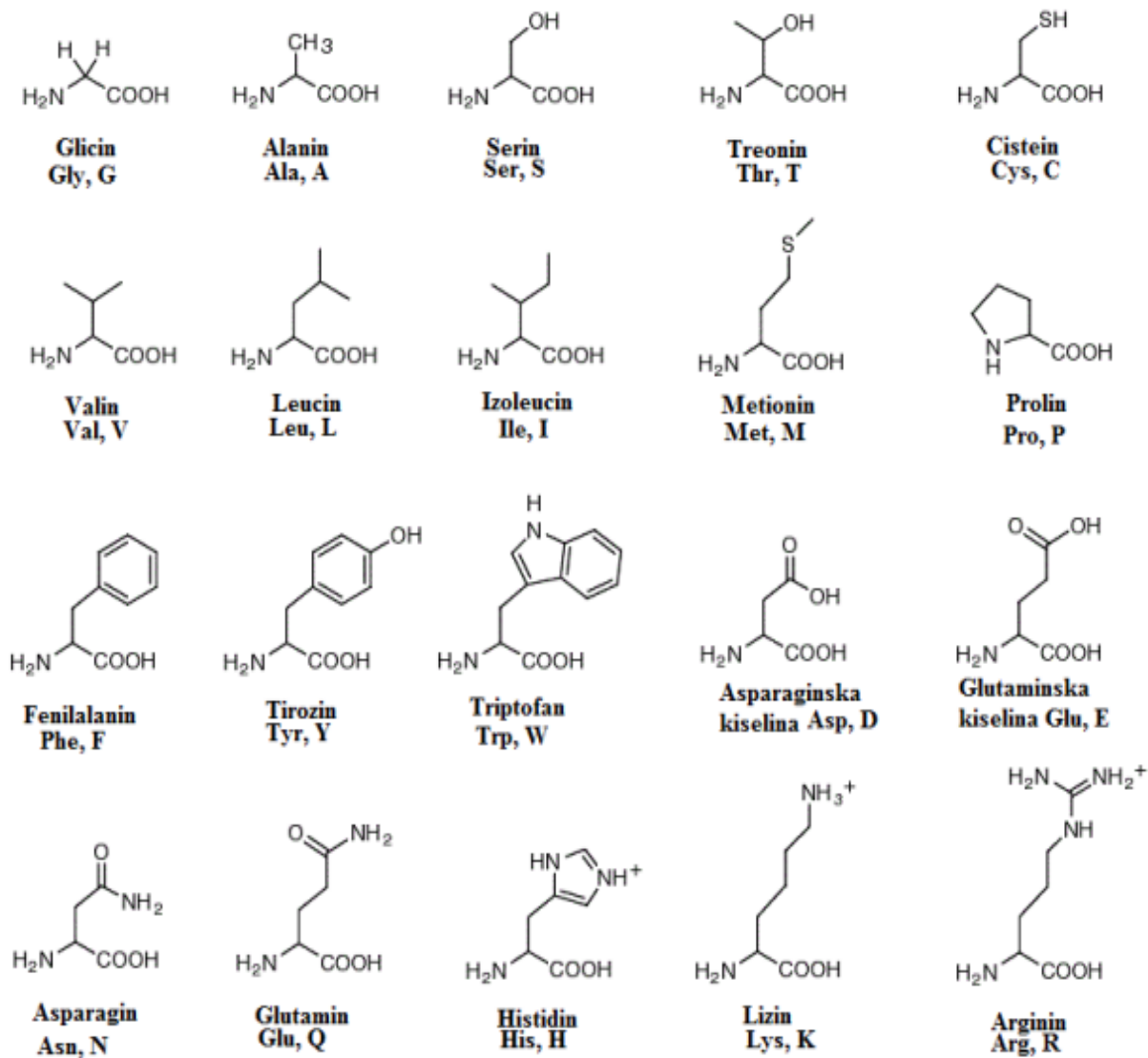
Aminokiseline su organske kiseline, koje čine osnovnu strukturnu jedinicu proteina. U organizmu se osim u obliku proteina mogu nalaziti u slobodnom stanju ili vezane sa drugim organskim jedinjenjima. Veliki značaj imaju u proizvodnji prehrambenih proizvoda, kao i u proizvodnji dodataka u ishrani životinja (Hermann, 2003). Kao takve, veoma su važne za obavljanje različitih biohemijskih, fizioloških i strukturnih funkcija u organizmu.



Slika 14. Opšta strukturna formula aminokiseline (Borjarska i sar., 2018)

Sve amino kiseline, izuzev prolina i hidroksiprolina u svom molekulu sadrže dve karakteristične funkcionalne grupe - amino i karboksilnu grupu (Slika 14). Dok prolin i hidroksiprolin predstavljaju α -imino karboksilne kiseline. Bočni lanac R predstavlja različite funkcionalne grupe, koje mogu biti izgrađene od alkil lanaca, alkohola, tiola, amina, amida, karboksilnih kiselina, aromatičnih ugljovodonika (benzen, fenol) i heterocikličnih grupa. Osim najjednostavnije aminokiseline - glicina, čija je formula $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, gde R predstavlja H, sve ostale α -aminokiseline su optički aktivna jedinjenja. Postoje dva optička izomera (D i L). Za prikazivanje ovih izomera, koristi se Fišerova formula, koja koristi amino grupu za označavanje ovih izomera. Ukoliko je amino grupa usmerena u levo, reč je o L-konfiguraciji, a ukoliko je u desno, reč je o D-konfiguraciji. Aminokiseline izdvojene iz proteina pripadaju L-izomerima. Neki D-izomeri se javljaju u prirodi i obično imaju veoma specijalne funkcije (Ilisz i sar., 2012). Ovi izomeri su najzastupljeniji u antibioticima, dok su D-alanin i D-glutaminska kiselina nađene u bakterijskom ćelijskom zidu, i njihova funkcija je najverovatnije sprečavanje enzimskih napada (Džamić, 1990).

Do danas je otkriveno preko 80 aminokiselina, koje su dobijene hidrolizom proteina ili ekstrakcijom biološkog materijala, kao i laboratorijskom sintezom. Od njih, 26 su priznate kao „prirodne“ aminokiseline, a 20 ulazi u sastav proteina (Slika 15). U pogledu nutritivnih svojstava, veoma je važno napomenuti esencijalne amino kiseline. Ove amino kiseline su od posebne važnosti, jer telo čoveka i životinja nije sposobno da ih sintetiše i zbog toga ih je neophodno nadomestiti unosom proteina ishranom, koji se dejstvom enzima razgrađuju, nakon čega se solobađaju aminokiseline. Esencijalne amino kiseline su: valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, triptofan, metionin, treonin i lizin (Džamić, 1990). Ove amino kiseline služe kao prekursor ostalih vitalnih metabolita i po potrebi služe i kao izvor energije (Cabarello i sar., 2003). Glutamin, glutaminska kiselina, asparagin i glicin imaju ulogu neurotransmitera, a tirozin predstavlja prekursor hormona štitne žlezde tiroksina i trijodtironina (Cabarello i sar., 2003; Wu, 2013).



Slika 15. Strukturne formule aminokiselina (Borjarska i sar., 2018)

U svakodnevnoj ishrani, čoveku su na raspolaganju različiti izvori aminokiselina, međutim u posebnim slučajevima gde postoji samo jedan proizvod, kao hranljivi izvor, veoma je važno znati njegov aminokiselinski profil. Ovo je pogotovo važno prilikom pravljenja receptura za ishranu životinja, jer se neretko koristi jedan izvor hraniva (npr. kukuruz), koji često ne sadrži dovoljnu količinu esencijalnih amino kiselina.

Sastav proteina iz biljnih izvora je deficitiran nekim esencijalnim amino kiselinama. Proteini pšeničnog brašna i pirinča nemaju u svom sastavu dovoljnu količinu lizina, kukuruz triptofana, a proteini povrća triptofana i metionina.

Radi postizanja visoke proizvodnje u ishrani nepreživara neophodno je da se koriste hraniva, koja su bogata proteinima. Najbolji izvori ovih hraniva su najčešće životinjskog porekla, međutim često loša higijenska ispravnost, visoka cena i neretko loš kvalitet često zahteva da se ova hraniva zamene biljnim sirovinama. Sa druge strane biljne sirovine nisu dovoljno bogate esencijalnim amino kiselinama, sa izuzetkom mahunarki. U savremenoj ishrani životinja često se u obroke koji su na bazi kukuruza i sojine sačme dodaju sintetičke aminokiseline i to metionin i cistin, dok se u obroke koji su na bazi suncokretove sačme dodaje L-lizin (Dinić i sar., 2011).

3.7.2 Proteini insekata

Jestivi insekti su prepoznati kao proteinske sirovine, čiji se sadržaj kreće od 7 do 91% (na suhu materiju), pri čemu su najbrojnije vrste koje sadrže oko 60% proteina (van Huis, 2016). Najveći sadržaj proteina, preko 75%, je detektovan u predstavnicima reda Orthoptera (Rumpold i Schlüter, 2013). U okviru iste vrste insekata, sadržaj proteina može značajno da se razlikuje, što ukazuje na to da je sadržaj proteina povezan i sa načinom i vrstom ishrane insekata, ekološkim uticajima, ali i sa tehnološkom obradom (termički i mehanički tretmani).

Za neke vrste insekata poput *Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens* i *Acheta diaperinus* zbog prisustva hitina u telu insekata, koji sadži azot, predloženo je da se prilikom preračunavanja proteina (Kjeldahl metodom) uzima faktor od 4,76; 5,33; 5,60 (Jansen i sar., 2017; Boulous i sar., 2020). Međutim, za većinu insekata kp faktor još uvek nije određen, te je zbog toga vrednost ovog faktora tema naučnih rasprava.

Većina insekata se smatara sirovinama bogatim esencijalnim aminokiselinama (Nongonierma i FitzGerald, 2017). Prema Svetskoj Zdravstvenoj Organizaciji WHO (World Health Organisation) u pogledu esencijalnih aminokiselina, proteinski koncentрати i izolati dobijeni iz larve svilene bube u potpunosti zadovoljavaju nutritivne zahteve odojčadi (Wu i sar., 2011), dok se aminokiselinski profil super crva i crva brašnara može porediti sa sojinim proteinima i kazeinom (Yi i sar., 2013).

Svarljivost proteina insekata je izuzetno dobra i čini ih veoma poželjnom hranljivom sirovinom. Tako se vrednosti za svarljivost proteina kreću oko 54% za crva brašnara, 86% za larve svilene bube i od 76 do 90,5% za termite i skakavce (Nongonierma i FitzGerald., 2017).

Studije vezane za vrste proteina insekata su veoma retke. Najčešće se odnose na razdvajanje molekulskih frakcija, pomoću SDS gel elektroforeza, koje su potom identifikovane tečnom hromatografijom sa masenim detektorom (LC-MS/MS) (Nongonierma i FitzGerald., 2017). Primarni proteini mišićne strukture insekata su identifikovani kao aktin, miozin i kolagen, dok su proteini crevnog trakta identifikovani kao miozin 1 kratkog lanca, tropomiozin 1, profilin, serpin-2 i glutation peroksidaza (Vercruysse i sar., 2005). Pronađeno je da sinteza proteina zavisi od načina ishrane insekta, tako da ukoliko su hranjeni neadekvatnom sirovinom dolazi do formiranja imunog odgovora što za rezultat ima sintezu specifičnih proteina (Zhou i sar., 2008).

Elektroforetski profil crva brašnara, super crva i popaca je veoma širok i kreće se u opsegu od 6 do 200 kDa (Nongonierma i FitzGerald., 2017). Prva linija na elektroforetskom profilu (8,5 do 13 kDa) predstavlja antifriz proteine (nastaju tokom zamrzavanja larvi), zatim proteini kutikule (14 do 30 kDa), zatim različite vrste enzima (32-95 kDa) i protein vitelogenin (protein velikih molekulskih masa, preko 95 kDa) (Yi i sar., 2016). Pronađeno je da su najzastupljeniji proteini u larvama crva brašnara tropomiozin, aktin, troponin T, hemolimfni proteini i α -amilaza (Nongonierma i FitzGerald., 2017).

3.7.3 Ekstrakcija proteina iz brašna insekata

Postupak ekstrakcije proteina iz brašna insekata se sastoji iz nekoliko koraka: (1) homogenizacija uzorka, (2) obezmašćivanje, (3) rastvaranje proteina, (4) izoelektrično taloženje, (5) izdvajanje proteina i (6) sušenje (Nongonierma i FitzGerald., 2017).

- (1) Proces homogenizacije predstavlja usitnjavanje uzorka na manje čestice, kako bi dodirna površina sa vodenim rastvorom bila što veća, a samim tim i proces ekstrakcije proteina efikasniji.
- (2) Obezmašćivanje uzorka obuhvata odstranjivanje lipidne frakcije iz uzorka, upotrebom organskih rastvarača kao što su petroletar, n-heksan, etanol i heksan: izopropanol (Zhao i sar., 2016; Jia i sar., 2015; Longvah i sar., 2011). Prilikom upotrebe organskih

rastvarača dolazi i do gubitaka proteina, jer neki proteini su skloni da interreaguju sa ovim rastvaračima (Nongonierma i FitzGerald., 2017). Za odstranjivanje lipidne frakcije, može da se koristi i superkritična ekstrakcija pomoću CO₂, a kako je trend u svetu da se što manje upotrebljavaju organski rastvarači, postoji mogućnost i upotrebe centrifugalne sile u cilju razdvajanja lipidne frakcije (Yi i sar., 2013).

- (3) Ekstrakcija proteina može da se posmatra kao izolacija proteina rastvorljivih i nerastvorljivih u vodenim rastvorima. Za izolaciju proteina, koji su rastvorljivi u vodi najčešće se koristi alkalna ekstrakcija, koja obuhvata podešavanje pH (većih od pH 7) kako bi se postigla najbolja rastvorljivost i dobio najveći prinos proteina (Nongonierma i FitzGerald., 2017).

Za dobijanje nerastvorljivih proteina, nakon ekstrakcije vodeni rastvor se centrifugira na temperaturi od 4°C. Dobijeni talog predstavlja proteine nerastvorljive u vodenom rastvoru. Ovi proteini su identifikovani kao proteini mišićne strukture insekta i većina ih je identifikovana kao aktin, miozin, tropomiozin i troponon (Wang i sar., 2011).

- (4) Za taloženje proteina iz supernatanta se dalje podešava pH na vrednosti izoelektrične tačke (pI) na pH vrednosti ispod pH 5. U zavisnosti od vrste insekata podešavaju se optimalne vrednosti za pH ekstrakcije i taloženja (Yang i sar., 2013).
- (5) Dobijeni talog se zatim centrifugira na temperaturi od 4 °C i odvaja od tečnog dela.
- (6) Sušenje taloga (proteina) se obavlja na nižim temperaturama u sušnici (oko 30°C), sušenje pod vakuumom ili *freeze drying* tehnologijom.

3.7.4 Enzimaska hidroliza proteina insekata

Prilikom procesuiranja brašna/proteina od insekata, enzimaska hidroliza se najčešće koristi kako bi se oslobodili bioaktivni peptidi (BAP) i mali proteini i da bi se poboljšali tehnofunkcionalne karakteristike proteina. Pokazano je da se enzimskim tretmanom dobijaju mnogo veće količine BAP u poređenju sa nekim mehaničkim tretmanima poput ultrazvuka i mikrotalasa (Zhou i sar., 2017). Generalno gledano, enzimaska hidroliza može da se primeni i na brašno od insekata i na sam proteinski izolat (nakon izolacije proteina).

Prema dostupnoj literaturi, mnogi enzimi su korišćeni u hidrolizi proteina/brašna insekata i na osnovu porekla mogu se podeliti na: enzime digestivnog trakta (pepsin, tripsin i himotripsin) i enzime mikroorganizama (alkalaza, proteinaza, itd) (Nongonierma i FitzGerald., 2017).

Tokom enzimske hidrolize proteina insekata, stepen hidrolize (DH) se kreće od 3 do 100%. Širok opseg DH može da se objasni razlikama u procesu izvođenja enzimske hidrolize, kao i u različitim vrstama insekta. Tako, istim postupkom enzimske hidrolize dobijeni DH za insekt *Amphiacusta annulipes* iznosi 15,8% , a za *Locusta migratoria* 36,3% (Zielińska i sar., 2017).

3.7.5 Funkcionalne osobine proteina

Da bi se neki proteini koristili u prehrambenoj industriji, neophodno je da im se ispituju funkcionalna svojstva. S obzirom da su proteini kompleksni molekuli i da u prehrambenim proizvodima interreaguju sa drugim jedinjenjima, funkcionalne osobine daju jasniju sliku o njihovoj mogućoj primeni i njihovom ponašanju u celokupnom sistemu.

3.7.5.1 Rastvorljivost proteina

Rastvorljivost je pored želiranja, emulzionih osobina i svojstva formiranja pene jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava proteina u prehrambenoj industriji. Ova osobina daje jasniju sliku o tome kako se proteini ponašaju u vodenim rastvorima, odnosno o njihovom stepenu rastvaranja (Williams i sar., 2016). Rastvorljivost proteina zavisi od mnogobrojnih unutrašnjih faktora kao što su aminokiselinski sastav, veličina i trodimenzionalna struktura proteina, ali i od spoljašnjih faktora poput jonske jačine, pH vrednosti i temperature (Kramer i sar., 2012; Sathe i sar., 2018).

Interreakcija između proteina i vode definiše njihovu rastvorljivost. Ukoliko su na površini proteina zastupljenije polarne aminokiseline, rastvorljivost će biti veća, u suprotnom ukoliko je više nepolarnih aminokiselina rastvorljivost će biti manja (Kramer i sar., 2012). Veća rastvorljivost proteina se postiže kada proteinska struktura nije isuviše kompaktna, pa je samim tim veća dodirna površina molekula sa vodom. Takođe, ukoliko su proteini manje molekulske mase, veća je njihova rastvorljivost. Ovo se najviše može videti posle hidrolize proteina, gde hidrolizati manjih molekulskih veličina imaju mnogo veću rastvorljivost. Ovaj fenomen se objašnjava time da hidroliza povećava odbojne sile u molekulu proteina, čime se oslobađaju naelektrisane grupe, a time i povećava rastvoljivost (Gould i Wolf, 2018).

Spoljašnji faktori poput temperature i jonske jačine imaju veliki uticaj na rastvorljivost proteina. Tako se sa porastom temperature povećava i rastvorljivost proteina, ali samo do

određenih vrednosti, odnosno do temperature na kojoj dolazi do denaturacije proteina (Sathe i sar., 2018). Denaturacijom dolazi se do procesa agregacije i precipitacije proteina, čime se rastvorljivost smanjuje. Zagrevanjem vodenog rastvora na temperaturu od 50 do 60°C znatno se povećava rastvorljivost proteina *Hermetia illucens* (Bußler, i sar., 2016). Rastvori soli male jonske jačine utiču na poboljšanje rastvorljivosti proteina, jer se u tom slučaju naelektrisane grupe skoncentrišu na površini molekula proteina i na taj način se smanje elektrostatičko privlačenje unutar molekula proteina. Nasuprot ovome, velika jonska jačina povećava kompeticiju jona soli sa molekulom proteina, pri čemu se joni soli brže vezuju sa molekule vode, a proteini za proteine pri čemu dolazi do agregacije i smanjenja rastvorljivosti proteina (Popović, 2012; Sathe i sar., 2018).

Rastvorljivost proteina je uslovljena i vrednostima pH rastvarača. U blizini izoelektrične tačke, naelektrisanje proteina je neutralno što dovodi do međusobne interreakcije proteina, čime se smanjuje intererakcija sa molekulima vode, rezultujući krajnjom precipitacijom proteina. Ekstremne pH vrednosti povećavaju ukupno naelektrisanje proteina na površini molekula što povećava rastvorljivost proteina (Popović, 2012; Sathe i sar., 2018). Proteini mleka, mahunarki, soje i drugih hranljivih sirovina imaju vrednosti pI između 3 i 6 (Gravel i Doyen, 2020). Sličan trend je utvrđen i za proteine insekata (Bußler, i sar., 2016).

3.7.5.2 Kapacitet vezivanja vode

Kapacitet vezivanja vode je svojstvo proteina da veže ili fizički zadrži vodu, a izražava se kao g vode na g uzorka (Bußler, i sar., 2016). Ova funkcionalna osobina je veoma važna sa tehnološkog aspekta proizvodnje hrane i hrane za životinje, jer daje više informacija o potencijalnoj upotrebi u okviru određenih proizvoda. Takođe, u prehrambenim proizvodima, kapacitet upijanja vode je povezan sa procesom želiranja, ali i sa teksturom i vlažnosti samog proizvoda (Gravel i Doyen, 2020). U industriji hrane ovo osobina je važna jer utiče na fizički kvalitet proizvedenih peleta i ekstrudata (Banjac i sar., 2021).

Kapacitet vezivanja vode brašna nekih insekata poput *Tenebrio molitor* i *Rhynchophorus phoenicis* se može porediti sa kapacitetom upijanja vode proteinskih koncentrata soje i proteina mleka, dok je veći u odnosu na proteine nekih mahunarki (Meena i sar., 2017; Zielińska i sar., 2018). Ovakvi rezultati indukuju da se brašno insekata može koristiti u suplementaciji postojećih prehrambenih proizvoda, ali i formulacijama novih proizvoda.

3.7.5.3 Kapacitet vezivanja ulja

Kapacitet vezivanja ulja je funkcionalna osobina koja se odnosi na količinu ulja koji proteini mogu da absorbuju. Ova osobina je direktno povezana sa emulgirajućim svojstvima proteina. Pokazano je da manji molekuli proteina, sa više hidrofobnih lanaca u molekulu vezuju veću količinu ulja (Aryee i sar., 2018). Količina absorbovanog ulja utiče na ukus i teksturu, mekoću i celokupan doživljaj hrane. U industriji hrane za životinje, ova osobina je veoma važna, jer se ulje na ekstrudate dodaje nakon termičkog tretmana (ekstrudiranja, peletiranja), tzv. *Post pelleting liquid application* proces, gde je važno da se obezbedi što bolje zadržavanje ulja u granulama hrane, kako bi što manje bilo gubitaka tokom procesa proizvodnje (Sredanović i sar., 2002).

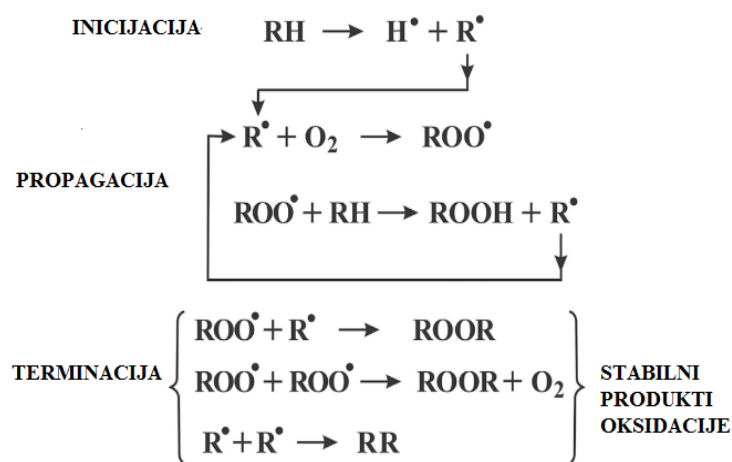
Na osnovu istraživanja dostupnih u literaturi, brašno insekata, ali i proteinski proizvodi insekata su pokazali da imaju zadovoljavajuću sposobnost zadržavanja ulja, pa ove proizvode čini veoma poželjnim za dalju upotrebu kako u prehrambenoj, tako i u industriji hrane za životinje.

3.7.6 Bioaktivne osobine proteina/peptida

Poznato je da peptidi, tzv. bioaktivni peptidi imaju važne biološke osobine poput antihipertenzivnih, antioksidativnih i antidijabetskih i da su ove osobine značajne kako sa zdravstvenog aspekta, tako i sa tehnološkog (Cicero i sar., 2017). Do sada su bioaktivne osobine proteina najviše istražene u ribljim proteinima i proteinima soje i mleka (Nongonierma i Fitzgerald, 2017). Insekti su poznati po svojim pozitivnim zdravstvenim uticajima na zdravlje čoveka i u kineskoj medicini se koriste kao sredstvo za lečenje mnogih bolesti. Međutim, u zapadnoj civilizaciji se tek u poslednje vreme interesovanje naučne zajednice proširuje i na temu bioaktivnih peptida dobijenih iz insekata. Na osnovu istraživanja, pronađeno je da proteini i peptidi insekata poput svilene bube (*Bombix mori*) imaju mnogobrojne bioaktivne osobine poput antimikrobnih, antihipertenzivni, antioksidativnih i antidijabetskih, što ih čini veoma primamljivim za dalja istraživanja i upotrebu u prehrambenoj i industriji hrane za životinje (Kumar i sar., 2015).

3.7.6.1 Antioksidativna aktivnost proteina/peptida

Veliki broj namirnica i proizvoda je veoma bogat uljima i mastima, kako bi se zadovoljili energetske zahtevi konzumenata. Kiseonik predstavlja veliki problem tokom skladištenja hrane bogate uljima i mastima, jer u prisustvu kiseonika nastaju reaktivna kiseonična jedinjenja, poznata kao ROS (eng. reactive oxygen species). ROS su sledeća jedinjenja: superoksid radikal (O_2^\bullet), hidroksil radikal ($\bullet OH$), peroksil radikal (RO_2^\bullet), alkoksil radikal (RO^\bullet), hipohloritna kiselina ($HClO$), ozon (O_3), singletni kiseonik ($^1\Delta gO_2$) i vodonik peroksid (H_2O_2). U oksidaciji ulja najreaktivniji su hidroksil i hidroperoksil radikali. Hidroksil radikal je najreaktivniji u toku reakcije oksidacije lipida. U biološkim sistemima se pretpostavlja da hidroksil radikal nastaje u toku Fentonove reakcije, gde slobodni joni gvožđa (Fe^{2+}) reaguju sa vodonik peroksidom i u toku Haber-Weiss reakcije, kada Fe^{2+} reaguje sa superoksid radikalom (Sampson i sar., 2019).



Slika 16. Faze oksidacije lipida (Sampson i sar., 2019)

Oksidacija lipida je lančana reakcija i sastoji se iz tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 16). U fazi inicijacije dolazi do formiranja alkilnog slobodnog radikala iz nezasićene masne kiseline, uklanjanjem vodonika pomoću prooksidanata kao što je npr. hidroksil radikal. Potom, kiseonik iz vazduha reaguje sa alkil radikalom, pri čemu se formira peroksidni radikal. Peroksidni radikali imaju sposobnost da reaguju sa vodonikom iz drugih jedinjenja, stvarajući pri tome hidroperokside, koji se potom ponovo raspadaju na peroksidne radikale. Ova faza reakcije naziva se faza propagacije. Poslednja faza autooksidacije lipida, terminacija,

podrazumeva povezivanje dva slobodna radikala, koji potom formiraju neradikalno jedinjenje (Sampson i sar., 2019). Primarni produkti oksidacije lipida su lipidni hidroperoksidi (LOOH), dok su sekundarni produkti oksidacije malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (4-HNE) (Yin i Porter, 2011). U velikom broju radova objavljena je veza između sadržaja MDA i 4-HNE i nastanka bolesti poput: Alchajmera, raka, kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa, bolesti jetre i Parkinsonove bolesti (Ramana i sar., 2014).

Antioksidativna aktivnost proteina i peptida u proizvodima se ogleda u tome što sprečavaju štetno delovanje kiseonika i time sprečavaju proces oksidacije, koji narušava aromu, teksturu, boju, ali i kvalitet prehrambenog proizvoda. Negativno delovanje kiseonika u prehrambenim proizvodima osim što utiče na masti, utiče i na proteine, čime narušava nutritivni kvalitet, ali i zdravstvenu bezbednost proizvoda (Rakita i sar., 2020; Dragojlović i sar., 2021). Antioksidativno delovanje proteina/peptida je izuzetno specifično i može se posmatrati kao biološki mehanizam, koji inhibira lipidnu oksidaciju ponašajući se kao „antioksidativni enzim“ i time što vezuje gvožđe i sprečava njegovo štetno delovanje kao katalizatora oksidacije (Asimi i sar., 2013). U suštini, antioksidativno delovanje proteina/peptida predstavlja složeni proces koji se ogleda u inaktivaciji reaktivne kiseonične vrste, heliranju metalnih jone i sprečavanju nastanka peroksida. U poređenju sa drugim antioksidansima, proteini se ponašaju kao multifunkcionalni antioksidansi, koji mogu da inhibiraju nekoliko različitih puteva lipidne oksidacije.

Prema dostupnoj literaturi pokazano je da i izolati i hidrolizati proteina svilene bube imaju visoku antioksidativnu aktivnost (Wang i sar., 2011). Veliki uticaj na antioksidativnu aktivnosti proteinskog hidrolizata (PH) ima vrsta enzima korištena u procesu hidrolize. Tako da se alkalaza pokazala kao najbolji enzim za dobijanje hidrolizata visoke antioksidativne aktivnosti (Yang i sar., 2013). U poređenju sa nekim konvencionalnim PH, hidrolizati insekata imaju veću antioksidativnu aktivnost, čime opravdavaju dalja istraživanja i upotrebu u prehrambenoj industriji (Nongonierma i FitzGerald, 2017)

3.7.6.2 Antimikrobna aktivnost peptida/proteina

Insekti mogu da proizvode različite vrste antimikrobnih peptida/proteina (AMP). Do danas je pronađeno preko 150 različitih vrsta AMP-a i većina pokazuje antibakterijsko i antifungalno dejstvo, dok neki pokazuju i antivirusno i antiparazitsko delovanje. Sadržaj AMP-a u insektima je direktno povezano sa uticajem spoljašnje sredine u kojoj se insekt nalazi. Pa se tako insekti koji

su tokom evolucije više bili izloženi različitim patogenim vrstama imaju veći sadržaj, ali i raznovrsniji AMP profil (Mylonakis i sar., 2016). Većina AMP-a predstavlja prekursore za dobijanje proteina ili proteina velikih molekularskih masa, međutim neki od njih poput gloverina (oko 14 kDa) i atacina (oko 20 kDa) predstavljaju i sami velike molekule (Yi i sar., 2014).

3.7.6.2.1 Podela AMP insekata

AMP se na osnovu svoje strukture mogu podeliti na: α -helični peptidi (cecropin i moricin), peptidi β linearne strukture (defenzin i drozomicin), peptidi bogati prolinom (apidaecin, drozocin i lebocin) i peptidi bogati glicinom (atacin i gloverin) (Bulet i Stocklin, 2005). U većini insekata pronađeni su gotovo svi pomenuti AMP, izuzev moricina i gloverina koji je pronađen samo u redu Lepidoptera.

Antibakterijska aktivnost peptida iz insekata je prvi put utvrđena u lutkama svilene bube *Hyalophora cecropia* delovanjem AMP cecropina, koji pripada grupi α -heličnih peptida (Boman i sar., 1974; Faye i sar., 1975). Njegova aktivnost se ogleda u antibakterijskom delovanju na Gram negativne bakterije poput *Escherichia coli*. Neke vrste ovih peptida su ispoljile i antibakterijsko delovanje i na Gram pozitivne bakterije (Poppel i sar., 2015).

Defenzin je tipičan predstavnik β linearne strukture AMP. To je mali katjonski AMP, čija je molekularna masa oko 4 kDa. Ovaj AMP je detektovan u sledećim redovima insekata Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera i Lepidoptera (Yi i sar., 2014). Njihova antimikrobna aktivnost se većinom ogleda u delovanju protiv Gram pozitivnih bakterija poput *Micrococcus luteus*, *Aerococcus viridians*, *Bacillus thuringiensis* i *Staphylococcus aureus*, ali i nekih Gram negativnih poput *Escherichia coli* (Lee i sar., 2004; Seufi i sar., 2011). Antibakterijsko delovanje ovog AMP-a se ogleda u tome što peptidi reaguju sa fosfolipidnom membranom bakterija, čime dolazi do formiranja kanala u ćelijskoj membrani bakterije što vodi do smrti ćelije (Yi i sar., 2013).

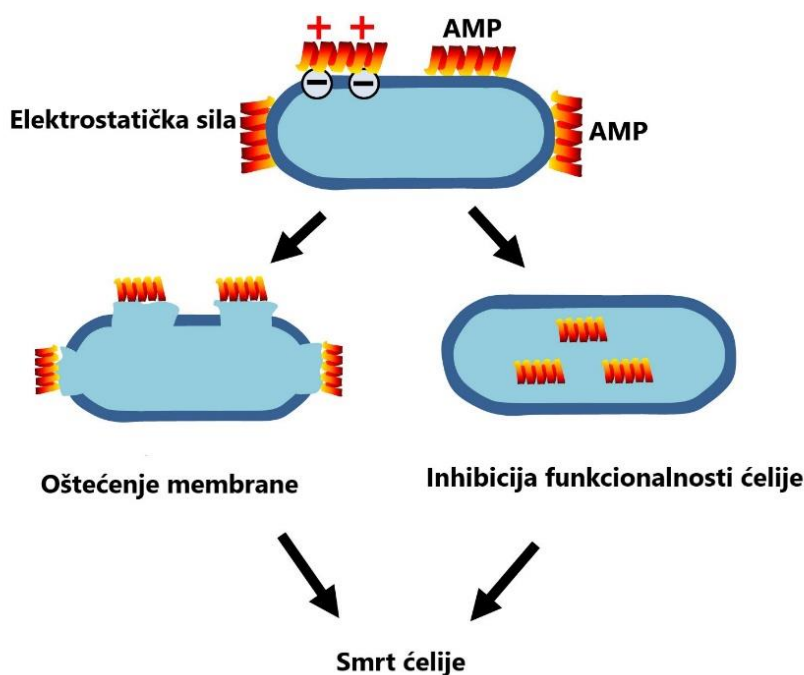
AMP bogati prolinom se mogu podeliti u dve grupe: kratkog molekularskog lanca (do 20 aminokiselinskih jediniva) i dugog molekularskog lanca (preko 20 aminokiselinskih jedinica). AMP kratkog molekularskog lanca više ispoljavaju antimikrobno dejstvo prema Gram negativnim bakterijama, dok AMP dugog molekularskog lanca više deluju na Gram pozitivne bakterije i gljivice (Taniguchi i sar., 2016).

Tipičan predstavnik AMP bogatog aminokiselinom glicin je atacin. Prvi put AMP atacin je izolovan iz lutke *H. cecropia*, molekularne mase je između 20 i 23 kDa. Ovaj AMP ima

antibakterijsko delovanje prema većini Gram negativnih bakterija, poput *Escherichia coli* i *Pseudomonas cichorii*, ali i prema nekim Gram pozitivnim kao što su *Bacillus subtilis* i *Listeria monocitogenes* (Bang i sar., 2012).

3.7.6.2.2 Antimikrobno delovanje

Većina AMP insekata ima pozitivno naelektrisanje i sadrži više od 50% hidrofobnih rezidua (Wiesner i Vilcinskas, 2010).



Slika 17. Antimikrobno delovanje AMP (antimikrobnih proteina/peptida) na bakterijsku ćeliju (Zhang i Gallo, 2016)

Ovo vodi ka tome da AMP insekata reaguje sa negativnim naelektrisanjem liofilnih membrana bakterijske ćelije, za razliku od eukariotskih ćelija koje su neutralnog naelektrisanja. Jednom kada se AMP veže za membranu ćelije bakterije, hidrofobni delovi molekula AMP prodiru u unutrašnjost ćelije, čineći membranu tanjom, stvarajući pore i kanaliće, pri čemu dolazi do izlivanja sadržaja ćelije i do njene smrti (Slika 17). Takođe AMP poput atacina inhibira sintezu proteina ćelijske membrane, dok neke vrste AMP-a inhibiraju sintezu ćelijskog zida, tako što

interreaguju sa enzimima odgovornim za njihovu sintezu. Veruje se da molekulu AMP-a smanjuju i permeabilnost bakterijske membrane, ali tačan mehanizam još uvek nije utvrđen (Mylonakis i sar., 2016).

S obzirom na svoje antimikrobno delovanje AMP insekata bi mogli da nađu široku primenu u prehrambenoj industriji, poljoprivredi, medicini i veterini. Inkorporacija ovih peptida u prehrambene proizvode mogla bi da poveća mikrobiološku stabilnost proizvoda. U poljoprivredi primena AMP bi se ogledala u povećanju rezistencije biljke na patogene vrste poput različitih bakterija i gljivica. U SAD-u, godišnje dva miliona ljudi potraži zdravstvenu pomoć uzrokovanu bakterijskim infekcijama, koje su postale rezistente na dva ili više komercijalna antibiotika (Mylonakis i sar., 2016). Od njih, 23.000 završi sa smrtnim ishodom, kao direktna posledica rezistentnosti bakterija na konvencionalne antibiotike. Novija istraživanja su pokazala da AMP ima veliki potencijal da zameni konvencionalne antibiotike u lečenju ljudi i životinja, a da su pri tome male šanse da se razvije rezistentnost bakterija (Pöppel i sar., 2015).

4. Materijal i metode

4.1 Materijal

U eksperimentu su korišćene tri vrste insekata: crv brašnar (*Tenebrio molitor*, Coleoptera), super crv (*Zophobas morio*, Coleoptera) i popac (*Acheta domesticus*, Orthoptera) koji su gajeni u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (Slika 18) u cilju optimizacije uslova uzgoja, a sve u nameri da se dobije nutritivno vredno brašno. Crv brašnar i super crv pripadaju istom redu, redu tvrdokrilaca (Coleoptera) i uslovi za njihov uzgoj su veoma slični, dok se uslovi za uzgoj popaca razlikuju. Kako bi se pratio uticaj supstrata na proizvedenu količinu larvi i nutritivni sastav, insekti su hranjeni istim sirovinama. U skladu sa zakonom EU (EFSA, 2015) koji ne dozvoljava upotrebu životinjskih hraniva za ishranu vrsta koje se dalje koriste u ishrani životinja i ljudi, izabrane su samo sirovine biljnog porekla, i to: pšenične mekinje kao osnovni supstrat i varijacije koje uključuju šargarepu, kupus i mešavinu šargarepe, kupusa i mlevenog semena lana. Još jedan od razloga zašto su ove sirovine izabrane je to što su lako dostupne, jeftine i široko rasprostranjene na području Vojvodine i Republike Srbije.



Slika 18. Laboratorijski uzgoj insekata

4.1.1 Uzgoj crva brašnjara i super crva

Crv brašnjar i super crv su gajeni u plastičnim kutijama dimenzija $28 \times 40 \times 13,5$ cm. Svaka kutija je sadržala 850 g pšeničnih mekinja i svaki treći dan dodato je 100 g šargarepe (supstrat S); kupusa (supstrat K) i mešavine koja se sastojala od šargarepe, kupusa i mlevenog semena lana u odnosu 1:1:1 (supstrat M). Temperatura prostorije u kojoj su gajeni insekti je bila $27 \pm 2^\circ\text{C}$, a vlažnost vazduha 50-60%. Svaka posuda je redovno kontrolisana, a mrtve larve i trulo povrće su redovno odstranjivani. Na početku eksperimenta, odrasle jedinke (insekti) su gajene u cilju polaganja jaja u periodu od tri nedelje. Nakon tri nedelje izmerena je jednaka količina larvi (42,60 g), koje su potom su raspoređene u kutije za gajenje. Larve su uzgajane 90, 97 i 104 dana. Vreme uzgoja je izabrano na osnovu dostupne literature o životnom ciklusu ovih insekata. Potom su prosejane (na sitima otvora od 4 i 5,6 mm) odvojene od supstrata, lutaka i odraslih jedinki (Slika 19). U cilju pražnjenja sadržaja digestivnog trakta (fecesa) larvi, a time i smanjenja količine patogenih mikroorganizama usledio je takozvani period “gladovanja” larvi u trajanju od 24 h (Slika 20).



Slika 19. Larve, lutke i odrasli insekti nakon prosejavanja od supstrata

U slučaju super crva, larve su odvojene od supstrata, jer je to neophodno da bi došlo do proceca formiranja lutke. U suprotnom, larve mogu da ostanu u ovom fiziološkom stanju i do godinu dana.

Inaktivacija larvi je obavljena u ključaloj vodi u periodu od 30 sekundi, nakon čega su larve prosušene u sušnici (Sutjeska, SFRJ) 1h na temperaturi od 70°C. Za inaktivaciju insekata se, osim termičkih tretmana, koriste i druge tehnike poput zamrzavanja, inaktivacija u struji CO₂, tretman mikrotalasima itd. Međutim, novija istraživanja su pokazala da je inaktivacija u ključaloj vodi tzv „blanching“ metoda najpogodnija, jer se na taj način postiže mikrobiološka stabilnost brašna od insekata, smanjuje se oksidacija ulja, inaktiviraju se pojedini enzimi poput lipaze koji negativno utiču na stabilnost masnih kiselina, a istovremeno ne dolazi do značajnog uticaja na ostale nutritivne komponente (Vandeweyer i sar., 2017; Doyen i sar., 2019; Caligiani i sar., 2019). Takođe, preporuka *European Food Safety Authority* je da insekti budu termički tretirani pre upotrebe u ishrani životinja i ljudi (EFSA, 2015). Nakon sušenja, larve su samlevene u mlinu sa hlađenjem (KN 295 Knifetec™, FOSS), a potom su zamrznute sve do momenta analiziranja.



Uzgoj larvi



Izdvajanje larvi od lutaka,
insekata i supstrata



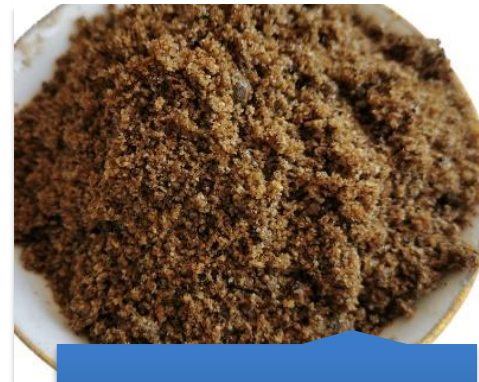
Period gladovanja



Inaktivacija u ključaloj
vodi



Sušenje larvi



Brašno od crva brašnjara

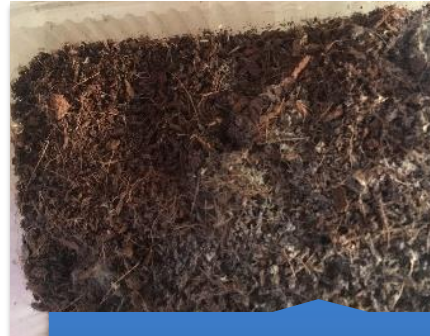
Slika 20. Postupak proizvodnje brašna od crva brašnjara

4.1.2 Uzgoj popaca

Popci se u pogledu taksonomije u mnogome razlikuju od crva brašnara i super crva. Zbog toga su uslovi gajenja bili nešto drugačiji. Uzgoj popaca je prikazan na Slici 21. Popci su gajeni u većim plastičnim posudama, dimenzije $36,5 \times 52 \times 24,5$ cm, sa poklopcem koji je imao rupe i obezbeđivao provetravanje. Za uzgoj popaca su korišćene iste vrste biljnih supstrata, s tim što je svaka platična kutija sadržala plastičnu posudu sa vodom i plastičnu posudu sa kokosovim tresetom, koji je služilo za polaganje jaja. Da bi se obezbedila veća dostupna površina i mesta za skrivanje, u svaku kutiju su stavljene po tri ambalažne kutije za jaja. 38,6 g odraslih popaca je dodato u svaku kutiju, gde je polovina činila mužjake, a polovina ženke. Pol je određen vizuelno. U svaku kutiju je dodato 30 g pšeničnih mekinja, izuzev kutija koje su bile predviđene za uzgoj popaca pomoću supstrata M. U te kutije dodato je po 15 g pšeničnih mekinja i 15 g samlevenog semena lana. U prvih mesec dana, svaki treći dan dodavano je po 30 g šargarepe (supstrat S), 30 g kupusa (supstrat K) i 30 g šargarepe i kupusa (1:1, supstrat M). Nakon mesec dana, dodato je po 50 g pšeničnih mekinja (supstrat K i supstrat S) i po 50 g pšeničnih mekinja i mlevenog semena lana (1:1, supstrat M). Količina povrća je povećana na 50 g i dodavana je svaki treći dan. Tokom gajenja popaca, higijenska praksa je od izuzetne važnosti, tako da su posude vizuelno kontrolisane svaki treći dan, trulo povrće je zamenjeno svežim i ukoliko je bilo potrebe, voda je zamenjena svežom. Popci su uzgajani u periodu od 60, 67 i 74 dana, kako bi se ispratio uticaj trajanja uzgoja na nutritivni sastav brašna od popaca. Vreme trajanja uzgoja je izabrano na osnovu literaturnih podataka o životnom ciklusu popaca. Nakon uzgoja, odvojeni su od supstrata i 24 h su bili u periodu „gladovanja“, kako bi se što je moguće više uklonio sadržaj iz digestivnog trakta i time smanjila količina *Enterobacteriaceae*. Inaktivacija popaca se obavila u ključaloj vodi u periodu od 30 sekundi, a zatim su odrasle jedinke popaca prosušene u sušnici (Sutjeska, SFRJ) na temperaturi od 70°C u trajanju od 1h. Nakon sušenja, popci su samleveni u mlinu sa hlađenjem (KN 295 Knifetec™, FOSS), a potom su zamrznuti sve do momenta analiziranja.



Kokosov treset



Polaganje jaja



Uzgoj popaca



Period gladovanja



Inaktivacija



Sušenje jedinki



Brašno od popaca

Slika 21. Postupak proizvodnje brašna od popaca

4.2 Metode

U okviru ove doktorske disertacije, prinos larvi crva brašnara i popaca je određen kao razlika u dobijenoj masi nakon uzgoja (90, 97 i 104 dana) i početnoj masi larvi. Prinos popaca je određen na isti način, ali nakon drugog vremena uzgoja (60, 67 i 74 dana). Za ispitivanje nutritivnog sastava insekatskog brašna korišćene su metode koje su podrazumevale osnovne hemijske analize, određivanje sadržaja masnih kiselina, amino kiselina i mineralnog sastava. Prinos larvi crva brašnara i popaca je određivan kao razlika u dobijenoj masi nakon uzgoja (90, 97 i 104 dana) i početnoj masi larvi. Prinos popaca je određen na isti način, s tim što je

4.2.1 Određivanje mase i dužine larvi super crva, crva brašnara i odraslih jedinki popaca

Pre i nakon perioda uzgoja masa svake šarže insekata je izmerena na vagi. Pomoću nonijusa, merena je dužina reprezentativnog uzorka larvi crva brašnara i super crva, kao i jedinki popaca (Slika 22). Dimenzije insekata su predstavljene kao srednja vrednost deset merenja \pm standardna devijacija.



Slika 22. Merenje dužine crva brašnara, super crva i popaca

4.2.2 Osnovne hemijske analize

Sirovi proteini su određeni pomoću Kjeldahl metode broj 978.04 (AOAC, 1999). Prilikom proračuna za određivanje sadržaja proteina na osnovu količine azota, uobičajeno je da se koristi faktor konverzije (kp) od 6,25. Međutim telo insekata je izgrađeno od hitina, polisaharida po strukturi sličnom celulozi, koji u svom sastavu sadži azot. Na osnovu ovoga neki autori su na osnovu količine proteina iz aminokiselinskog sastava i količine hitina predložili da kp bude 4,67 ili 5,33 kako bi se izbegla lažna slika o količini proteina koji se nalazi u određenim insektima (Jenssen i sar., 2017; Bouleus i sar., 2020). S obzirom da insekti predstavljaju veliku i divergentnu grupu beskičmenjaka po pitanju hemijskog sastava kutikule, kao i da još uvek nije predložen kp za super crva, korišćen je faktor konverzije od 6,25 uz napomenu da postoji mogućnost da se dobiju veće vrednosti za sadržaj proteina usled prisustva azota iz hitina koji ulazi u proračun.

Sadržaj vode u insekatskom brašnu određen je prema metodi 934.01, sirove masti su određene na Soxhlet uređaju prema metodi 920.39, a sirov pepeo prema metodi 942.05., dok je sadržaj fosfora određen prema metodi 965.17 AOAC, a svarljivost proteina u kiselom pepsinu prema metodi 971.09 AOAC (AOAC, 1998). Sirova vlakna su određena na uređaju Ankom 220 Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Macedon, NY, SAD) prema uputstvu proizvođača (Ankom, 2008). Svi rezultati su rađeni u minimum dva ponavljanja i preračunati su na suhu masu.

4.2.3 Određivanje sadržaja masnih kiselina u ulju insekata

Ulje iz brašna insekata dobijeno je hladnom ekstrakcijom pomoću smeše rastvarača hloroform:metanol, u odnosu 2:1. Sadržaj masnih kiselina je određen i izračunat na osnovu sadržaja metil estara masnih kiselina. Metil estri masnih kiselina su dobijeni transmetilacijom pomoću 14% metanolnog rastvora bortrifluorida, a zatim su rastvorene u n-heptanu. Ostatak n-heptana je uklonjen uparavanjem u struji azota. Oslobođeni od rastvarača metil estri masnih kiselina su se dalje analizirani pomoću gasne hromatografije (GC) na uređaju Agilent 7890A system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) sa plameno-jonizujućim detektorom (FID – *Flame Ionization Detector*). Razdvajanje metil estara masnih kiselina je vršeno u kapilarnoj elektrodi od mešane silike (Supelco SP-2560 *Capillary GC Column* 100 m × 0.25 mm, d=0,20 μm) (Supelco, Bellefonte, SAD) Kao gas nosač korišten je gas helijum, čistoće 99.9997% vol, protoka 1,5 ml/min i pritiska od 1,092 bar.

Detekcija masnih kiselina je izvršena na osnovu dobijenih pikova poređenjem retencionih vremena masnih kiselina iz analiziranih uzorka i retencionih vremena masnih kiselina iz standarda ("Supelco 37 component fatty acid methyl ester mix"). Sadržaj masnih kiselina je prikazan kao sadržaj pojedinačne masne kiseline (srednja vrednost dva ponavljanja) ili grupe masnih kiselina (zasićene, mononezasićene i polinezasićene) u 100 g ukupnih masnih kiselina u ulju uzorka, pri čemu je i uračunat i korekcionni faktor (F) za svaku pojedinačnu masnu kiselinu.

Formula za preračunavanje masnih kiselina:

$$f_i = \frac{A_i \times F_i}{\sum A_u \times F_i} \times 100 \quad (1)$$

f_i - relativni maseni sadržaj masne kiseline %

A_i - površina zahvaćena pikom pojedinačnog metil estera masnih kiselina

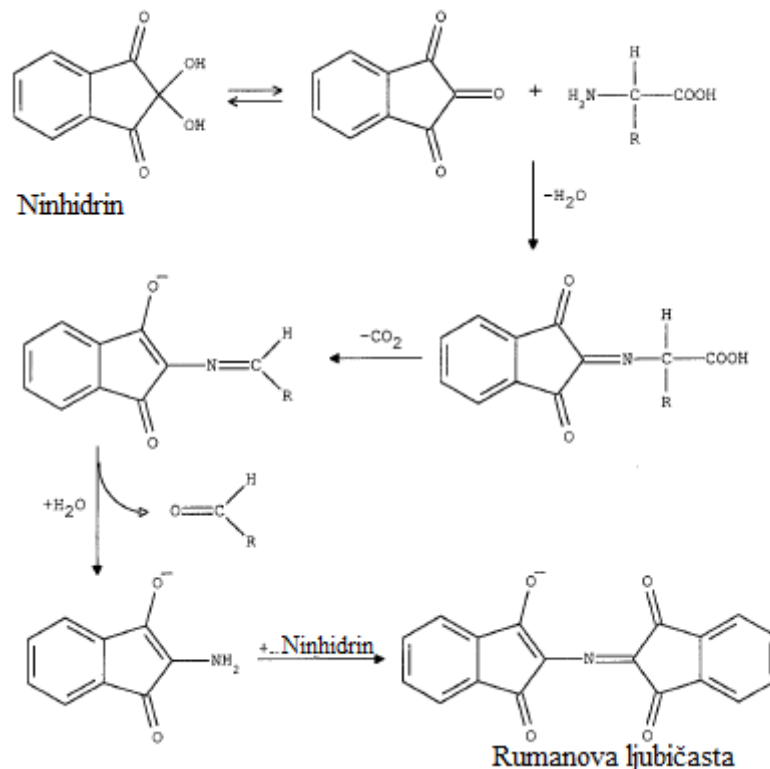
F_i - relativni korekcionni faktor pojedinačne masne kiseline

$\sum A_u$ - ukupne površine pikova metil estera masnih kiselina

4.2.4 Određivanje sadržaja amino kiselina u brašnu insekata

Postupak određivanja aminokiselina se sastojao iz dve faze. Prva faza je predstavljala pripremu uzorka, a druga hromatografsko određivanje. Aminokiselinski sastav u uzorcima je određen pomoću jonoizmenjivačke hromatografije. Priprema uzoraka je prvo podrazumevala kiselu hidrolizu u 6M HCl (Merck, Nemačka), na temperaturi od 110°C u periodu od 24 h. Da bi se zaštitile pojedine amino kiseline od degradacije usled hidrolize, kao zaštitni agensi dodati su 1% rastvor fenola i 0,5% tioglikolne kiseline u 6M HCl. Zaštitni agensi generalno se mogu podeliti na one koje uklanjaju halogene i one koje uklanjaju slobodne radikale. Fenol se pokazao kao efikasan zaštitni agens od halogenacije, dok se tioglikolna kiselina koristi u sprečavanju delovanja slobodnih radikala na amino kiseline u toku hidrolize. Nakon hidrolize, uzorci su ohlađeni na sobnoj temperaturi, a potom su amino kiseline rastvorene u 25 ml Loading puferu (pH 2,2) (Biochrom, Cambridge, VB). Uzorci su potom filtrirani pomoću 0,22 µm PTFE filtera (Plano, Texas, SAD) i preneseni u vijale (Agilent Technologies, SAD). Sastav amino kiselina u uzorcima brašna od insekata, kao i proteinskim izolatima brašna od insekata analiziran je pomoću jonoizmenjivačke hromatografije na aminoanalizatoru Biochrom 30+ (Biochrom, Cambridge,

VB), prema proceduri opisanoj u radu Spackman i sar. (1958). Proces razdvajanja slobodnih amino kiselina zasnivao se na specifičnim interrekcijama u koloni, koji je baziran na jonoizmenjivačkoj hromatografiji. Nakon razdvajanja amino kiselina usledila je postkolonska derivatizacija sa ninhidrinom. U reakciji svih primarnih aminokiselina dolazi do formiranja hromoforne grupe, prikazane na Slici 23, koja se zove „Rumanova ljubičasta“. Detekcija amino kiselina se vršila fotometrijski na UV detektoru i to na 570 nm (sve amino kiseline izuzev prolina) i na 440 nm (prolin). Detekcija amino kiselina je izvršena poređenjem retencionih vremena amino kiselina standarda i uzoraka, dok je kvantifikacija urađena na osnovu površine zahvaćenih pikova amino kiselina u odnosu na kalibracione krive korišćenog standarda (Amino Acid Standard Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD). Sadržaj aminokiselina je iskazan kao g amino kiselina (srednja vrednost dva ponavljanja) na 100 g proteina u uzorku.



Slika 23. Reakcija aminokiselina sa ninhidrinom (<http://what-when-how.com/molecular-biology/ninhydrin-molecular-biology/>)

4.2.5 Određivanje sadržaja mineralnih komponenti u brašnu od insekata

Sadržaj mineralnih komponenti (Ca, K, Na, Mg, Fe, Mn, Cu i Zn) u uzorcima brašna od insekata određen je atomskom apsorpcionom spektroskopijom prema standardu SRPS EN ISO 6869:2008. Uzorci brašna od insekata su izmereni, potom ugljenisani na grejnoj ploči, a zatim spaljeni u peći za žarenje na temperaturi od 550 ± 3 °C. Nakon spaljivanja, pepo uzoraka je rastvoren u 6 M HCL, a potom kvantitativno prenesen u normalni sud od 50 ml. U sud su potom dodate soli lantan nitrita i cezijum hlorida. Sadržaj minerala je određen na atomskom apsorpcionom spektrometru (Varian Spectra AA 10, Varian Techtron Pty Limited, Mulgrave, Victoria, Australija) u struji acetilen-vazduha. Rezultati su prikazani u mg mineralne komponente (srednja vrednost dva ponavljanja) po kg uzorka.

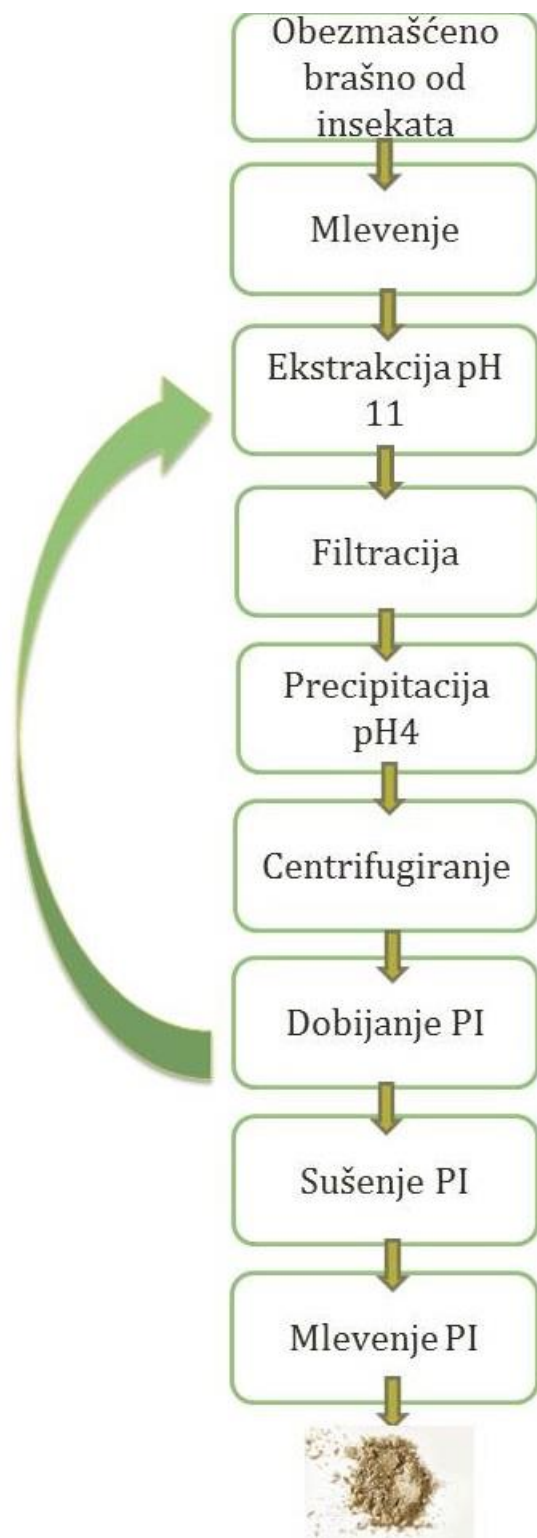
4.2.6 Mikrobiološke analize

Uzorci brašna od insekata su nakon mlevenja podvrgnuti mikrobiološkoj analizi na parametre koji su propisani zahtevima Pravilnika o kvalitetu hrane za životinje („Službeni glasnik RS”, br. 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017). U uzorcima brašna od insekata određen je ukupan broj bakterija, kao i kvasaca i plesni, zatim prisustvo *Salmonella* spp., *C. perfringens* i *S. aureus*. Mikrobiološke analize su rađene prema akreditovanim metodama Instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, SRPS EN ISO 7218:2008, SRPS CEN ISO/TS 11133-2:2008.

4.2.7 Dobijanje izolata proteina

Izolacija proteina iz brašna crva brašnara, super crva, i popca je modifikacija alkalne ekstrakcije opisane u radu Azagoh i sar., (2016). Prva tačka izolacije vršena je alkalnom ekstrakcijom obezmašćenog brašna. Punomasno brašno je obezmašćeno u n-heksanu u odnosu 1:5. Obezmašćeno brašno je potom osušeno preko noći na vazduhu, a potom dodatno samleveno u mlinu za kafu. Mleveno brašno od insekata je potom ekstrahovano u vodenom rastvoru na pH 11, koji je podešen pomoću rastvora 0,1 mol/l NaOH. Uz konstantno mešanje ekstrakcija je trajala sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon ekstrakcije rastvor proteina je profiltriran na Bihnerovom levku, nakon čega je izvršeno taloženje proteina. Precipitacija proteina je postignuta podešavanjem pH na 4 pomoću 0.1 mol/l HCl uz konstantno mešanje, pri čemu se vizuelno moglo primetiti odvajanje beličastog taloga. Odvajanje taloga je nastavljeno preko noći u frižideru na 4°C, a potom centrifugiranjem na 10.000 rpm na 4 °C u periodu od 20 minuta (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments).

U cilju prečišćavanja taloga, procedura ekstrakcije je još jednom urađena po istom protokolu. Nakon drugog taloženja, talog je osušen preko noći u sušnici (Binder FD56, Tuttlinger, Nemačka) na 30 °C, a potom usitnjen pomoću laboratorijskog tučka. Šematski prikaz dobijanja izolata proteina prikazan je na Slici 24.



Slika 24. Dobijanje izolata proteina iz brašna insekata (PI-proteinski izolat)

4.2.8 Karakterizacija proteinskih izolata

4.2.8.1 Elektroforeza

SDS elektroforeza uzoraka je urađena prema metodi Laemmli (1970). Sistem za SDS elektroforezu se sastojao od dva gela: gel za uzorak - 40 mg/ml akrilamida i gel za razdvajanje- 100 mg/ml akrilamida. Uzorci izolata proteina su rastvoreni u tris/glicin puferu (pH 6,8), koji je sadržao 20 g/l SDS (natrijum dodecil sulfata) i 50 g/l β -merkaptoetanol. Gelovi su bojeni *Coomassie brilliant blue* R-250 i srebrom. Elektroforeza je izvršena na uređaju (Multi Drive XL; Pharmacia, Uppsala, Sweden) na 60 mA sve dok boja nije došla do kraja ploče.

4.2.8.2 Rastvorljivost proteina

Rastvorljivost proteina određena je na različitim pH vrednostima (2-9) u rastvorima pufera. 10 mg izolata je imereno, a zatim je dodato po 1 ml pufera. Rastvor proteina je potom inkubiran 1h na sobnoj temperaturi na šejkeru Biosan TS 100-C (Biosan, Latvia). Nakon inkubacije rastvori proteina su centrifugirani pri 14 500 rpm u trajanju od 10 min (Ependorf Mini spin plus, Eppendorf, Nemačka). Rastvorljivi proteini su određeni prema Bradford metodi (Bradford, 1976). Rastvorljivost proteina je prikazana je kao koncentracije rastvorenih proteina (srednja vrednost tri ponavljanja).

4.2.8.3 Antioksidativna aktivnost izolata proteina 2,2-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6 – sulfonska kiselina) ABTS^{•+} radikal katjonu

Antioksidativna aktivnost proteinskih izolata je odrađena spektrofotometrijski prema ABTS^{•+} radikal katjonu (Popović i sar., 2013). Procedura merenje se zasnivala na obezbojavanju zelenog rastvora ABTS^{•+} radikal katjona u prisustvu proteinskih izolata na talasnoj dužini $\lambda=734$ nm. Osnovni rastvor ABTS^{•+} radikal katjona se pripremao rastvaranjem ABTS-a u 0,1 mol/l fosfatnog pufera (pH 7,4), koji je sadrži 5 mol/l NaCl (PBS). Ovako pripremljen rastvor čuvan je na tamnom u periodu od 12-24 h radi produkcije slobodnih radikala. Na dan testiranja, ovako pripremljen rastvor se razblaživao pomoću PBS do vrednosti apsorbance od 0,7 na $\lambda=734$ nm. U 3 ml radnog rastvora dodato je 30 μ l uzorka. Obezbojavanje reakcione smeše se pratilo 10 minuta, zajedno sa slepom probom. Antioksidativna aktivnost je rađena u tri ponavljanja.

Antioksidativna aktivnost je računata na osnovu sledeće formule:

$$AABTS^{\bullet+} = \frac{AABTS(H2O) - AABTS(u)}{AABTS(H2O)} \times 100 \quad (2)$$

Pri čemu je $AABTS(H2O)$ apsorbancija merena u slepoj probi
 $AABTS(u)$ apsorbancija merena u uzorku

4.2.8.4 Kapacitet vezivanja vode i ulja

Određivanje kapaciteta vode i ulja proteinskog izolata je odrađeno po metodi Popović (2011) i Čakarević (2021). Za određivanje kapaciteta vezivanja ulja za proteinski izolat inesekata, izmereno je 0,1 g proteinskog izolata u ependorf tubu kapaciteta 1,5 ml, u koju je potom dodat 1 ml vode. Ependorf tube su zatim stavljene na šejker (Thermo-Shaker TS-100C, Biosan, Latvija) u periodu od 30 minuta, na sobnoj temperaturi 25 ± 2 °C, nakon čega su centrifugirane pri 14 500 rpm u trajanju od 20 min (Ependorf Mini spin plus, Eppendorf, Nemačka). Ependorf tube su zatim okrenute na papir i ostavljene 30 minuta kako bi se odlio višak vode, a potom je merena masa i tube i uzorka. Kapacitet upijanja vode je određen kao $g_{vode} / g_{proteinskog\ izolata}$ (izrežen kao srednja vrednost tri merenja). Kapacitet upijanja ulja je određen na identičan način, pri čemu je zapremina ulja bila 0,9 ml.

4.2.9 Enzimski hidroliza proteina izolata

Proteinski izolati su rastvoreni u glicinskom puferu na pH 9. Pufer je izabran na osnovu aktivnosti enzima, kao i na osnovu rastvorljivosti proteinskih izolata. Napravljeni rastvor je konstantno mešan na mešalici i zagrevan na temperaturi od 50 °C. Nakon sat vremena mešanja, dodat je komercijalni enzim alkalaze (proteaza iz *Bacillus licheniformis* 2,4 AU/g, Sigma) u odnosu E/S 1:200. Enzimski hidroliza je izvođena u kontrolisanim uslovima. Kako bi se pratilo tok hidrolize u određenim vremenskim intervalima uziman je uzorak, koji je termički inaktiviran prokuvavanjem u ključalom kupatilu u vremenskom intervalu od 5 minuta. Kako bi se denaturisani proteini i enzimi odvojili od hidrolizata, uzorak je centrifugiran na Eppendorf Mini spin plus centrifugi, pri brzini od 14 500 rpm, tokom 5 min.

4.2.9.1 Određivanje stepena hidrolize

Određivanje stepena hidrolize je rađeno TCA metodom prema Tsumura i sar. (1999). Tokom enzimske hidrolize uziman je uzorak, a potom mu je dodat rastvor 0,44 mol/l TCA tako da budu u odnosu 1:1. Ovako pripremljen rastvor je stavljen u frižider na 4 °C u periodu od 30 minuta, kako bi se istaložili proteini. Nakon toga određena je koncentracija proteina neistaloženih proteina u rastvoru prema Bradford metodi (1976). Stepen hidrolize je određen pomoću sledeće formule:

$$DH = \frac{C(TCA)}{C(PRO)} \times 100 \quad (3)$$

Gde je DH-stepen hidrolize (%)

C(TCA)- koncentracija proteina u TCA frakciji (mg/ml)

C(PRO)- koncentracija ukupnih proteina (mg/ml)

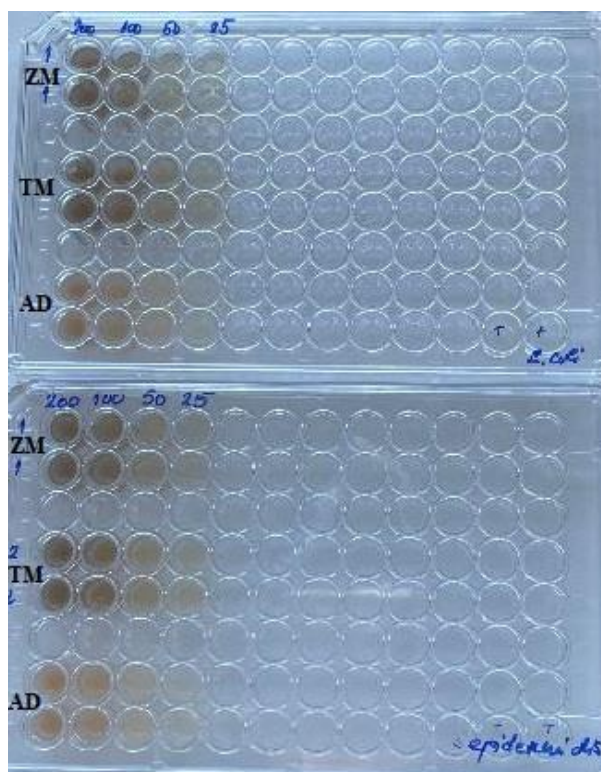
4.2.10 Antimikrobna aktivnost proteinskog hidrolizata (PH)

Priprema bakterijske suspenzije

Antimikrobna aktivnost PH je ispitana na referentnim mikroorganizmima: *Escherichia coli* (ATCC 8739) i *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) poreklom iz American Type Culture Collection. Obe test bakterije su inicijalno kultivisane na hranljivom agaru (NA, Himedia) na temperaturi od 37 °C u trajanju od 24 h. Nakon toga jedna do tri kolonije je inokulisana u 10 ml svežeg hranljivog bujona (NB, Himedia) i inkubirana na 37 °C tokom 24 h. Nakon perioda inkubacije, suspenzija je centrifugisana na 3000×g tokom 5 min, a potom dobijeni talog je resuspendovan u slanom peptonskom rastvoru. Optička gustina suspenzije je podešena pomoću denzitometra DEN-1 (Biosan, Riga, Letonija) i to do vrednosti od 0,5 Mc Farland jedinice (~1,5 × 10⁸ CFU/mL).

Eksperimentalni protokol za određivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost uzoraka je odrađena prema preporukama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI, 2018) uz modifikacije opisane u radu Čabarkapa i sar. (2019). U svaki bunar mikrotitar ploče (Slika 25) sa 96 udubljenja (Microtiter plate, Hillium), izuzev prvog, dodato je po 100 μL Mueller-Hinton bujona (MHB, HiMedia). U prvi bunar dodato je 100 μL PH, dok je u drugi dodato 100 μL PH i 100 μL MHB. Nakon toga usledila je serija duplih razređenja PH, koji su pripremljeni u opsegu od 454,4 do 113,62 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Iz poslednjeg bunara uklonjeno je 100 μL . Nakon toga, u svaki bunar dodato je po 10 μL bakterijske suspenzije. Finalna zapremina svakog bunara je iznosila 110 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sa finalnom koncentracijom bakterija 10^6 CFU/mL. Finalna koncentracija PH u prvom bunaru je bila 909,09 $\mu\text{L}/\text{mL}$. U Tabeli X su prikazane finalne koncentracije u bunarima. Ploča je potom inkubirana na 37°C u periodu od 24h. Test je uključivao i kontrolu rasta bakterija (MHB + test bakterija), kontrolu sterilnosti I (MHB + PH) i kontrolu sterilnosti II (MHB).



Slika 25. Izgled mikrotitar ploče pre procesa inkubiranja

Nakon inkubiranja u svaki bunar dodato je po 10 μ L rastvora resazurina (0,01%) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), nakon čega je inkubiranje nastavljeno narednih 6 h na temperaturi od 37 °C, zaštićeno od svetla. Nakon vizuelne ocene, ploče su dalje inkubirane u trajanju od 18 h. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je determinisana kao najmanja koncentracija PH koje je sprečila prelazak oksidovane u redukovanu formu resazurina, a determinisana je zasejavanjem po 100 μ L rastvora iz svakog udubljenja mikrotitar ploče na površinu Mueller-Hinton agara (MHA, Himedia). Zasejane ploče su inkubirane na 37°C tokom 24 h.

Priprema serijskih razblaženja

Tabela 1. Koncentracija HP u bunarima mikrotitar ploče

Br.	Mueller-Hinton bujon (μ L)	Bakterijska suspenzija (μ L)	Koncentracija (μ L/ml)	Koncentracija (%)
1.	Rastvor HP w/o bujona 100*	10	909,09	90,09
2.	100 rastvor HP + 100**	10	454,25	45,4
3.	100	10	227,25	22,72
4.	100	10	113,62	11,36

*HP- hidrolizat proteina

Baktericidni/bakteriostatski efekat PH na test mikroorganizme određen je primenom Time-kill metode, sprovedene prema preporukama CLSI (1999). PH u količini od 1mL je inokulisan sa 100 μ L bakterijske suspenzije koncentracije 10^6 CFU/mL. Inicijalni broj bakterija je određen neposredno nakon inokulacije bakterijske suspenzije u PH (0h). Uticaj PH na preživljavanje ispitivanih mikroorganizama određivan je nakon 24 h korišćenjem standardne metode brojanja kolonija na Hranljivom agaru (NA, Himedia). Dobijeni rezultati su izraženi kao log CFU (Coloni Forming Unit).

4.3 Obrada rezultata

4.3.1 Statistička obrada rezultata

Statistička obrada rezultata je određena pomoću softverskog programa STATISTICA 10 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

4.3.2 Analiza glavnih komponenti (PCA) analiza

Analiza glavnih komponenti (PCA) je korišćena u identifikaciji zajedničkih karakteristika različitih promenljivih, čime je smanjen broj promenljivih koji se odnose na istu dimenziju i ne pružaju dodatne informacije. Na ovaj način grupisani su i klasifikovani posmatrani rezultati u faktorskoj ravni.

4.3.3 Veštačka neuronska mreža ANN model

U cilju ispitivanja relativnog uticaja (%) vrste insekta, uslova gajenja (supstrata i vremena gajenja) na nutritivni sastav brašna insekata, korištena je simulacijala veštačkim neuronskim mrežama (ANN model). Četvorostruki višeslojni perceptron model (multi-layer perceptron models, MLP) koji se sastojao od tri sloja: ulaznog, skrivenog i izlaznog je korišten u proračunima ANN modela. Ovaj oblik ANN modela je cenjen zbog svoje sposobnosti prisvajanja nelinearnih funkcija (Eim i sar., 2013; Karlović i sar., 2013; Prevolnik i sar., 2014). Kako bi se poboljšalo „ponašanje“ ANN modela, normalizovani su ulazni i izlazni podaci, poput „Min-max“ metode normalizacije. Tokom izračunavanja ANN ulazni podaci su više puta uvedeni u neto rad, a sam trenažni proces mreže je ponavljen 100.000 puta, testirajući različite topologije sa različitim brojem neurona u skrivenim i izlaznim slojevima (5-20), različitim funkcijama aktivacije, kao i sa nasumičnim početnim vrednostima težine koeficijenta i pristrasnosti (Pezo i sar., 2013; Zanetti i sar., 2015).

Za izračunavanje relativnog uticaja ulaznih parametara na izlazne promenljive, korištena je Yoon-ova једначина глобалне осетљивости (Yoon, 1993):

$$RI_{ij}(\%) = \frac{\sum_{k=0}^n (w_{ik} \cdot w_{kj})}{\sum_{i=0}^m |\sum_{k=0}^n (w_{ik} \cdot w_{kj})|} \cdot 100\% \quad (4)$$

Gde : RI - relativan uticaj, w – težinski koeficijent u ANN modelu, i - ulazna promenljiva, j - izlazna promenljiva, k - skriveni neuron, n - broj skrivenih neurona, m - broj ulaza

Prvi razvijeni ANN model je služio za optimizaciju i predviđanje prinosa, sadržaja proteina, masti, pepela, sirovih vlakama i svarljivosti proteina brašna od insekata. Drugi ANN model je služio za optimizaciju i predviđanje sadržaja esencijalnih AK (treonin, valin, leucin, izoleucin, fenilalanin, metionin, histidin i lizin) i nesencijalne (tirozin). Treći ANN model je razvijen u cilju optimizacije i predviđanja mineralnih komponenti (Ca, K, Mg, Na i P), dok je četvrti ANN model služio za optimizaciju i predviđanje esencijalnih masnih kiselina (C18:2n6c i C18:3n3, kao i njihov odnosa n6/n3).

4.3.4 Višeciljna optimizacija MOO (*Multi-objective optimization*)

Razvijeni ANN modeli su dalje korišćeni za višeciljnu optimizaciju brašna od insekata, prilagođenu upotrebi u ishrani životinja. Rezultat MOO optimizacije je imao za cilj dobijanje maksimalanog prinosa, sadržaja proteina, masti, sirovih vlakana, svarljivosti proteina, sadržaja amino kiselina, masnih kiselina i minerala; i minimalanog sadržaja pepela i odnosa n6/n3 masnih kiselina u brašnu od insekata.

Rešenje MOO optimizacije se baziralo na *Pareto optimalnim vektorima*, koji omogućuje određivanje potencijalnog rešenja, gde se poboljšanjem jednog rešenja ne narušavaju druga (Kojić i sar., 2018). Genetski algoritam je korišten za pronalaženje MOO rešenja, jer istovremeno radi na pronalaženju čitavih populacija rešenja, a ne samo jednog. Ovaj algoritam je zasnovan na stohastičkoj tehnici evolutivnih algoritama (Goldberg i sar., 1989).

5. Rezultati i diskusija

5.1 Dužina larvi crva brašnara, super crva i popaca nakon perioda uzgoja

Na osnovu rezultata merenja dužine insekata, koji su prikazani u Tabeli 2, najveće vrednosti su izmerene kod super crva i to u rasponu od 44,84 do 48,11 mm.

Tabela 2. Izmerene vrednosti dužine jedinki brašnara (TM), super crva (ZM) i popaca (AD)

Vrsta insekta	Supstrat	Vreme gajenja	Dužina (mm)
TM	M	1	23,21 ± 1,14 ^{a,b}
TM	K	1	24,67 ± 1,44 ^a
TM	S	1	24,47 ± 1,06 ^{a,b}
TM	M	2	24,81 ± 1,84 ^{a,b}
TM	K	2	25,40 ± 1,68 ^{a,b}
TM	S	2	24,70 ± 1,35 ^{a,b}
TM	M	3	24,14 ± 1,59 ^b
TM	K	3	26,66 ± 1,56 ^{a,b}
TM	S	3	24,67 ± 0,49 ^{a,b}
ZM	M	1	45,64 ± 1,38 ^{a,b}
ZM	K	1	46,20 ± 1,52 ^a
ZM	S	1	47,02 ± 2,01 ^{a,b}
ZM	M	2	46,37 ± 1,27 ^{a,b}
ZM	K	2	48,11 ± 1,35 ^{a,b}
ZM	S	2	47,40 ± 1,04 ^{a,b}
ZM	M	3	44,87 ± 0,58 ^b
ZM	K	3	46,21 ± 1,74 ^{a,b}
ZM	S	3	47,60 ± 0,95 ^{a,b}
AD	M	1*	19,21 ± 1,54 ^{c,d}
AD	K	1*	21,31 ± 1,68 ^{c,d}
AD	S	1*	18,45 ± 1,84 ^{c,d}
AD	M	2*	19,45 ± 1,35 ^d
AD	K	2*	20,14 ± 1,59 ^{c,d}
AD	S	2*	19,10 ± 1,13 ^{c,d}
AD	M	3*	18,91 ± 0,95 ^{c,d}
AD	K	3*	18,78 ± 1,47 ^c
AD	S	3*	20,15 ± 0,97 ^{c,d}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti (n=10) ± standardna devijacija, različita slova u okviru iste kolone ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05)

TM - *Tenebrio molitor*; ZM - *Zophobas morio*; AD- *Acheta domesticus*; M - miks koji se sastojao od šargarepe, kupusa i semena lana ; K - kupus ; S - šargarepa; * Vreme gajenje 1, 2 i 3 predstavlja 90, 97 i 104 dana; 1*, 2* i 3* predstavlja 60, 67 i 74 dana

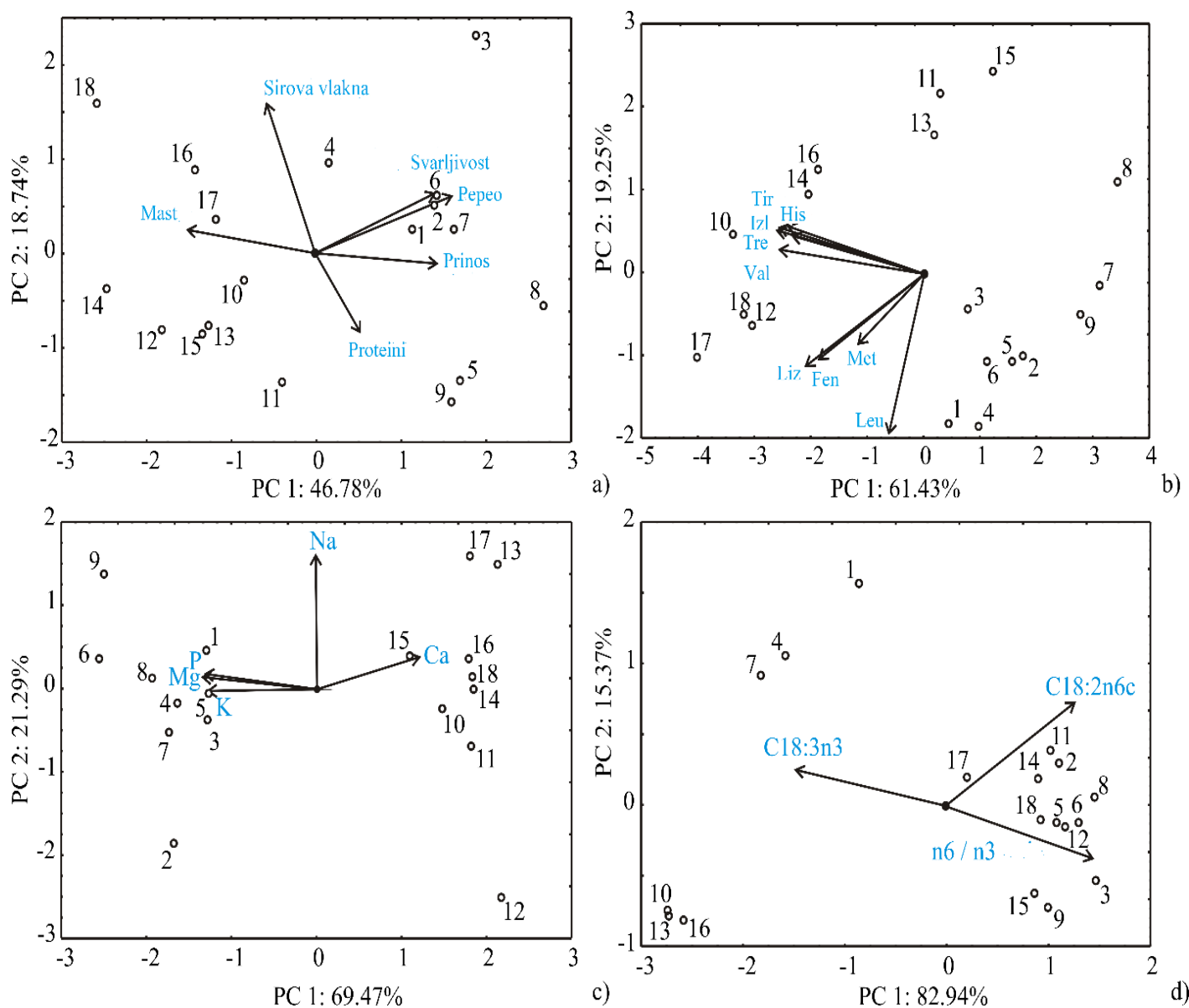
Dužine tela larvi crva brašnara su se kretale u intervalu od 23,21 do 24,64 mm, super crva od 44,80 do 48,11 mm, a za popca od 18,78 do 21,31 mm. Na osnovu izmerenih vrednosti se može zapaziti da dužina jedinki nije zavisila od vrste ishrane već od genetskih osobina vrste. Isto tako, može se pretpostaviti da su jedinke sve tri vrste insekata dostigla maksimalan rast pre prvog vremena inaktivacije, pa se stoga dužina jedinki u tri vremenska perioda uzgoja nije značajno menjala. Dobijeni rezultati su bili u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima drugi autora (Finke i sar., 2002; Fernandez-Cassi i sar., 2019; Rumbos i Athanassiou, 2021).

U sledećim poglavljima koja se odnose na nutritivni, aminokiselinski, mineralni i masnokiselinski sastav brašna od insekata, rezultati su grupisani u dve celine. U prvom delu, izvršeno je poređenje rezultata, PCA analiza i ANN modela crva brašnara i super crva. S obzirom da oba insekta pripadaju taksonomski istom redu (Coleoptera: Tenebridae), u rezultatima su prikazani zajedno radi lakšeg poređenja. U drugom delu su prikazani rezultati za brašno od popaca, koji pripadaju drugom redu (Orthoptera: Gryllidae), s obzirom da imaju drugačije osobine i da su im uslovi uzgoja bili drugačiji.

5.2 PCA analiza

Na slici 26 i 27 su prikazani dobijeni PCA grafici za kvalitet brašna od sve tri vrste insekata, koji je podrazumevao osnovni hemijski, aminokiselinski, masnokiselinski i mineralni sastav. Blizine tačaka na ovim graficima ukazuju na sličnost obrazaca koje reprezentuju. Orijentacija vektora koji opisuje promenljivu u faktoru prostora ukazuje na sve veći trend uticaja ovih promenljivih, a dužina vektora je proporcionalna kvadratu korelacije vrednosti između uklapajuće vrednosti za promenljivu i same promenljive. Uglovi između promenljivih su obrnuto proporcionalni stepenu njihovih korelacija, tj. što je ugao manji, to je veći stepen korelacije.

5.2.1 PCA analiza brašna od crva brašnjara i super crva



Slika 26. Uticaj uslova gajenja super crva i crva brašnjara na: a) osnovni hemijski sastav; b) amino kiseline, c) mineralni sastav; d) masne kiseline

*1-TM1, 2-TK1, 3-TS1, 4-TM2, 5-TK2, 6-TS2, 7-TM3, 8-TK3, 9-TS3, 10-ZM1, 11-ZK1, 12-ZS1, 13-ZM2, 14-ZK2, 15-ZS2, 16-ZM3, 17-ZK3, 18-ZS3

Na osnovu rezultata PCA analize, koja je prikazana na Slici 26(a) uočava se da prve dve faktorske koordinate prikazuju 65,52% ukupne varijabilnosti (46,78 i 18,74%) u okviru šest promenljivih. Analizom PCA grafika, prinos, sadržaj proteina i svarljivost proteina imaju pozitivan uticaj na izračunavanje prve glavne komponente, dok su promenljive: sirova vlakna i

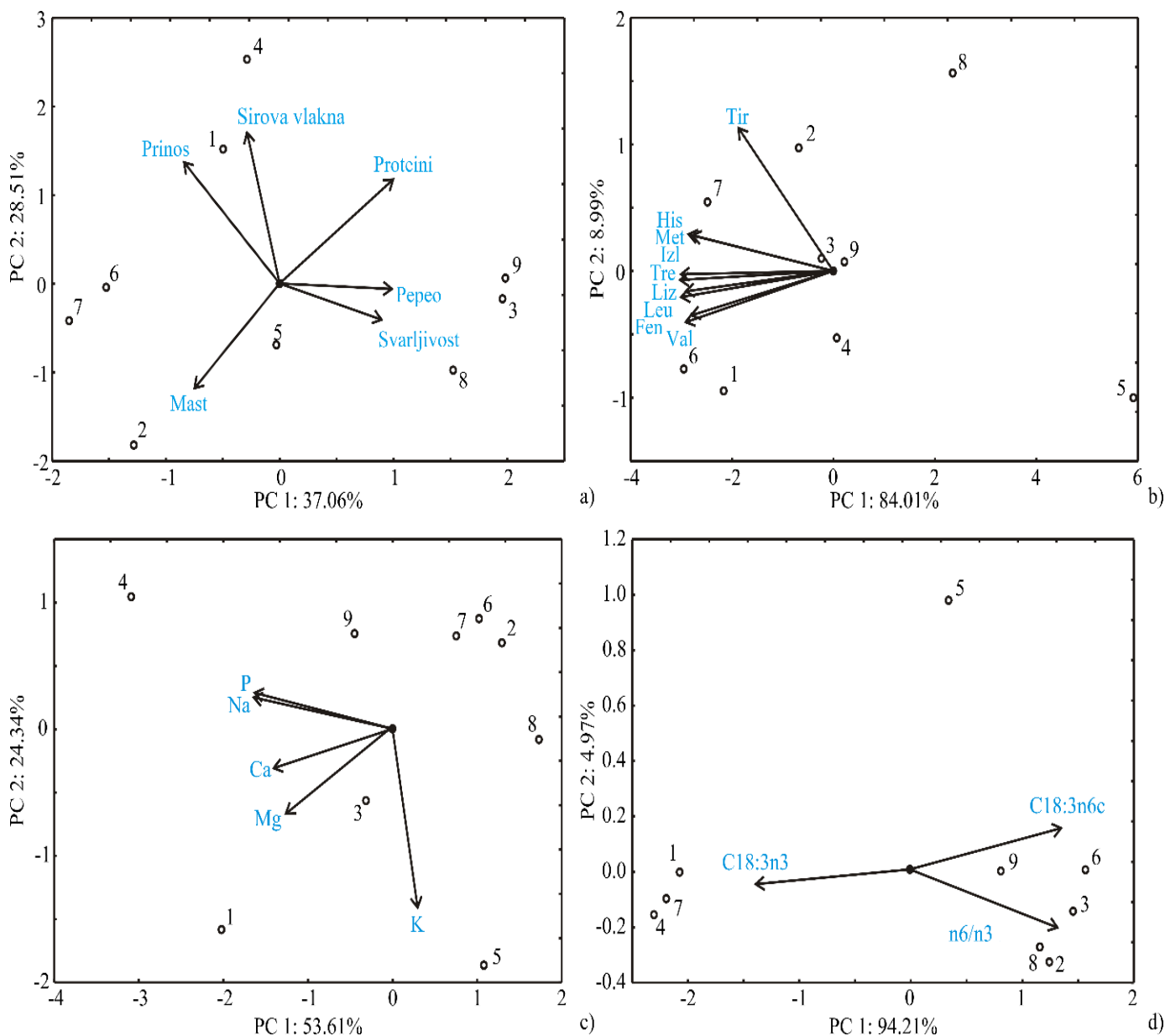
mast pokazale negativan uticaj. Na grafiku se takođe može uočiti da pozitivan uticaj na račun druge glavne komponente ima sadržaj sirovih vlakana dok negativan uticaj ima sadržaj proteina.

Dobijenti rezultati za PCA analizu aminokiselina, koja se može uočiti na Slici 26(b), ukazuju prisustvo dve faktorske koordinate u iznosu od 80,68% ukupne varijabilnosti (61,43 i 19,25%). Negativan uticaj na prvu glavnu komponentu imaju sve aminokiseline, dok na drugu glavnu komponentu negativan uticaj imaju: metionin, leucin, fenilalanin i lizin. Pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu imaju sledeće aminokiseline: treonin, valin, izoleucin, tirozin i histidin.

Na Slici 26(c) prikazan je PCA grafik za sadržaj mineralnih materija. Prve dve faktorske koordinate predstavljaju 90,76% ukupne varijabilnost (69,74 i 21,29%). Na osnovu rezultata, uočava se da pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu ima sadržaj Ca, dok negativan uticaj imaju K, Mg i P. Pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu ima sadržaj Na.

Rezultati za PCA analizu masnih kiselina prikazani su na Slici 26(d). Na osnovu obrađenih rezultata može se uočiti da prve dve faktorske koordinate predstavljaju 98,31% ukupne varijabilnosti (82,94 i 15,37%). Pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu je zapažen u slučaju sadržaja C18:2n6c i odnosa n6/n3, dok je negativan uticaj zapažen u slučaju sadržaja C18:3n3. Pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu imaju obe masne kiseline, C18:3n3 i C18:2n6c, dok negativan uticaj ima odnos n6/n3.

5.2.2 PCA analiza brašna od popaca



Slika 27. Uticaj uslova gajenja popaca na: a) osnovni hemijski sastav; b) amino kiseline, mineralni sastav; d) masne kiseline

*1-AM1, 2-AK1, 3-AS1, 4-AM2, 5-AK2, 6-AS2, 7-AM3, 8-AK3, 9-AS3

Na Slici 27. prikazana je PCA analiza uticaja uslova gajenja popaca na nutritivni sastav brašna od popaca. Kako je prikazano na Slici 27(a) prve dve faktorske koordinate prikazuju 65,57% (37,06 i 28,51%) ukupne varijabilnosti. Pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu imaju sledeće promenljive: proteini, pepeo i svarljivost proteina, dok negativan uticaj imaju sirova

vlakna, sadržaj masti i prinos. Pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu imaju sledeće promenljive: sadržaj proteina, sirovih vlakana i prinos, a negativan uticaj: sadržaj pepela, masti i svarljivost proteina.

Rezultati dobijeni PCA analizom aminokiselina su prikazane na Slici 27(b). Prve dve faktorske koordinate prikazuju 93% ukupne varijabilnosti (84,01 i 8,99%). Sve amino kiseline imaju negativan uticaj na prvu glavnu komponentu, dok pozitivan uticaj na drugu glavnu komponentu imaju sledeće amino kiseline: Metionin, histidin i tirozin. Negativan uticaj na drugu glavnu komponentu imaju amino kiseline: lizin, leucin, fenilalanin i valin.

Na slici 27(c) se mogu uočiti prve dve faktorske koordinate PCA analize za minerale, koja prikazuju 77,95% (53,61 i 24,34%) ukupne varijabilnosti. Pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu uočen je za sadržaj K, dok je negativan uticaj uočen za sadržaj Na, Ca, Mg i P. Na drugu glavnu komponentu pozitivan uticaj je zapažen u slučaju sadržaja P i Mg, dok je negativan u slučaju sadržaja Ca, K i Mg.

Rezultati dobijeni PCA analizom za masne kiseline u brašnu popaca su prikazani na Slici 27(d). Prve dve faktorske koordinate prikazuju 99,18% (94,21 i 4,97%) ukupne varijabilnosti. Pozitivan uticaj na prvu glavnu komponentu imaju promenljive C18:2n6c i n6/n3, dok je negativan uticaj zapažen u slučaju C18:3n3. Na drugu glavnu komponentu negativan uticaj imaju promenljive C18:3n3 i odnos n6/n3, dok pozitivan uticaj ima sadržaj C18:2n6c.

Na osnovu svih rezultata PCA analiza, može se zaključiti da je PCA analiza pogodna za dobijanje prve impresije o rezultatima istraživanja. Odnosno PCA analiza je omogućila razdvajanje uzoraka na osnovu njihovih osobina i smanjila je broj promenljivih. Ovim rezultatima omogućena je dobra osnova za dalje matematičke modele kao što su ANN modeli i višeciljne optimizacija.

5.3 Nutritivni sastav brašna crva brašnara i super crva

Pored crne vojničke muve ili Black soldier fly (*Hermetia illucens*), crv brašnar, odnosno brašno dobijeno od njega, je jedna od najispitivanijih alternativnih sirovina u ishrani životinja . (Hong i sar., 2020). Za razliku od ove vrste, o super crvu se još uvek ne zna mnogo sa aspekta uzgoja i upotrebe u ishrani ljudi i životinja (Kim i sar., 2015; Van Broekhoven 2015; Harsányi i sar., 2020). S obzirom da oba insekta taksonomski pripadaju istom redu, u rezultatima su prikazani zajedno radi lakšeg poređenja. U Tabeli 3 prikazan je nutritivni sastav crva brašnara i super crva, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost izračunata na suhu materiju.

5.3.1 Prinos crva brašnara i super crva

Prinos larvi se kretao u vrednostima od 178,41-323,68 g u slučaju crva brašnara i od 130,00-177,03 g za slučaj super crva (Tabela 3). Veći prinos u slučaju crva brašnara je očekivan, jer se tokom gajenja crv brašnar razmnožavao i bilo ga je moguće naći u sva četiri razvojna stadijuma (jaje, larva, lutka i imago). Nasuprot njemu, super crv zahteva specifične uslove za prelazak u stadijum lutke, odnosno neophodno je da se larve fizički izoluju iz supstrata kako bi prešle u stadijum lutke, a potom i u odraslu jedinku. Super crv ostaje u stanju larve i do godinu dana, ukoliko se fizički ne odvoji od supstrata i ne izoluje (Dossey i sar., 2016). S tim u vezi, crv brašnar se tokom eksperimenta razmnožavao i polagao jaja tokom čitavog vremena gajenja, čime se i njegova brojnost značajno povećavala. Kim i sar. (2014) su u svojim istraživanjima otkrili da je najintenzivniji rast crva brašnara u periodu od 77-125 dana, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Takođe, istraživanja koja su sproveli Liu i sar. (2019) su pokazala da obogaćene pšenične mekinje sa kupusom i šargarepom dovode do povećanja mase larve i do 40%, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Na Slici 28a prikazan je relativan uticaj vrste insekata, vremena gajenja i supstrata na prinos crva brašnara i super crva. Na osnovu rezultata može se uočiti da je najbolji prinos u slučaju crva brašnara postignut u periodu od 104 dana, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Kim i sar., 2014; Harsany i sar., 2020). Što je veća gustina larvi sve je manja šansa za prelazak larve u stanje lutke, ovo se najverovatnije dešava kao prirodna odbrana od kanibalizma, koji je široko rasprostranjen u ponašanju insekata (Quennedey i sar., 1995). S tim u vezi brojnost crva

brašnara se znatno povećala usled razmnožavanja odraslih jedinki, dok je u slučaju super crva ona ostala ista, jer su se jedinke nalazile isključivo u stadijumu larve.

5.3.2 Sadržaj proteina u brašnu crva brašnara i super crva

Načelno, brašno od obe inskatske vrste se može posmatrati kao nutritivno bogata proteinska sirovina. Sadržaj proteina u obe vrste brašna je sličan i kreće se u vrednostima od 48,94 do 55,60% u slučaju crva brašnara, dok je u slučaju super crva u opsegu od 44,57 do 56,22% (Tabela 3), u zavisnosti od hranljivog supstrata. Dobijeni rezultati su bili slični ili nešto veći u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima (Kim i sar., 2014; Rumbos i sar., 2020; Prachom i sar., 2021).

Najbolja optimizacija u sadržaju proteina je postignuta u slučaju kada je super crv gajen na supstratu sa dodatkom kupusa u periodu od 97 dana (Slika 28(b)). Kupus je povrće izuzetno bogato mikronutrijentima poput askorbinske kisleline, koja pospešuje rast i fertinost insekata, tako što smanjuje oksidativni stres. Sa kupus je nutritivno siromašan u pogledu makronutrijenata poput proteina i masti i stoga verovatno ne utiče na povećanje sadržaja proteina u brašnu insekata (Liu i sar., 2019). Međutim, dobijeni rezultatu su pokazali da interakcija ishrane i vremena gajenja utiče na povećanje sadržaja proteina u brašnu crva brašnara.

Tabela 3. Nutritivni sastav brašna od insekata

Vrsta	Supstrat	Vreme gajenja	Prinos (g)	Sirovi proteini (%)	Mast (%)	Pepeo (%)	Sirova vlakna (%)	Svarljivost protiena (%)
TM	M	1	221,20	48,94±0,05 ^c	31,87±0,09 ^{g,h,i}	5,02±0,23 ^{c,d,e,f,g}	6,17±0,49 ^{a,b}	84,93±0,31 ^h
TM	K	1	178,41	53,66±0,25 ^f	28,46±0,09 ^{e,f}	5,73±0,02 ^h	7,34±0,42 ^{a,b,c,d}	84,67±0,05 ^{f,g,h}
TM	S	1	206,57	49,84±0,12 ^d	31,03±0,03 ^{g,h}	6,84±0,51 ⁱ	8,51±0,42 ^{a,b,c,d}	85,59±0,21 ^{g,h}
TM	M	2	291,16	48,98±0,0 ^{c,d}	33,54±0,68 ^{ij}	4,80±0,16 ^{c,d,e,f}	8,36±0,37 ^{a,b,c,d}	83,05±0,09 ^{c,d,e,f,g}
TM	K	2	273,38	55,02±0,17 ^{h,i}	30,23±1,84 ^{f,g}	4,79±0,18 ^{c,d,e,f}	5,28±0,60 ^a	84,30±0,11 ^{f,g}
TM	S	2	226,90	55,60±0,09 ^{ij,k}	28,85±0,33 ^{e,f}	5,13±0,23 ^{d,e,f,g,h}	8,12±0,48 ^{a,b,c,d}	84,66±0,07 ^{f,g,h}
TM	M	3	302,40	52,03±0,04 ^e	33,53±0,13 ^{ij}	4,91±0,03 ^{c,d,e,f,g}	6,72±0,37 ^{a,b,c}	85,06±0,21 ^{f,g,h}
TM	K	3	323,68	55,29±0,19 ^{ij}	27,16±0,17 ^e	5,27±0,021 ^{f,g,h}	6,33±0,11 ^{a,b}	84,80±0,24 ^{f,g,h}
TM	S	3	226,90	55,33±0,07 ^{ij,k}	24,83±0,29 ^d	5,16±0,02 ^{e,f,g,h}	5,53±0,5 ^a	83,32±0,28 ^{d,e,f,g}
ZM	M	1	130,00	47,29±0,04 ^b	33,69±0,09 ^{ij}	3,76±0,05 ^b	5,95±0,03 ^{a,b}	83,77±0,05 ^{e,f,g}
ZM	K	1	166,12	54,31±0,0 ^{g,h}	33,13±0,09 ^{ij}	2,89±0,06 ^a	5,73±0,01 ^a	84,05±0,11 ^{f,g}
ZM	S	1	167,08	44,57±0,10 ^a	33,41±0,21 ^{ij}	2,99±0,05 ^a	5,89±0,30 ^{a,b}	82,05±0,54 ^{b,c,d,e,f}
ZM	M	2	132,03	55,49±0,11 ^{ij,k}	37,58±0,05 ^k	2,88±0,01 ^a	6,72±0,09 ^{a,b,c}	83,92±0,11 ^{e,f,g}
ZM	K	2	177,02	56,22±0,07 ^{j,k}	44,48±0,08 ^m	3,21±0,03 ^{a,b}	7,96±0,06 ^{a,b,c,d}	82,23±0,37 ^{b,c,d,g}
ZM	S	2	136,74	56,21±0,02 ^{o,p}	36,50±0,18 ^k	3,22±0,05 ^{a,b}	7,00±0,20 ^{a,b,c,d}	83,18±0,22 ^{d,e,f,g}
ZM	M	3	139,83	51,98±0,07 ^e	32,35±0,41 ^{h,i}	2,69±0,11 ^a	9,12±1,47 ^a	83,61±0,45 ^{e,f,g}
ZM	K	3	177,03	49,21±0,05 ^{c,d}	34,47±0,24 ^j	3,00±0,08 ^a	7,70±1,00 ^{a,b,c,d}	83,56±0,29 ^{e,f,g}
ZM	S	3	111,88	47,20±0,03 ^b	40,81±0,05 ^l	3,13±0,03 ^{a,b}	8,91±0,56 ^{a,b,c,d}	83,45±0,22 ^{d,e,f,g}
AD	M	1*	203,52	70,89±0,09 ^k	19,84±0,24 ^{b,c}	4,78±0,06 ^{c,d,e,f}	10,80±0,13 ^{c,d}	78,29±0,13 ^a
AD	K	1*	177,88	64,67±0,02 ^l	24,44±0,34 ^d	4,65±0,21 ^{c,d,e,f}	7,04±0,12 ^{a,b,c,d}	79,18±0,48 ^{a,b}
AD	S	1*	166,92	68,87±0,07 ⁿ	17,05±0,37 ^a	5,52±0,28 ^{g,h}	7,80±0,25 ^{a,b,c,d}	80,03±0,15 ^{a,b,c}
AD	M	2*	241,50	71,37±0,06 ⁿ	17,29±0,18 ^a	4,58±0,13 ^{c,d,e}	11,24±0,57 ^d	80,37±0,34 ^{a,b,c,d}
AD	K	2*	193,93	66,46±0,12 ^m	17,79±0,20 ^a	4,45±0,07 ^c	6,39±1,50 ^{a,b,c}	80,95±0,10 ^{a,b,c,d,e}
AD	S	2*	210,44	64,71±0,07 ^l	18,83±0,32 ^{a,b}	4,46±0,23 ^{c,d}	7,81±0,04 ^{a,b,c,d}	78,36±0,05 ^a
AD	M	3*	184,34	64,10±0,06 ^l	23,27±0,26 ^d	4,56±0,06 ^{c,d,e}	10,15±0,32 ^{b,c,d}	78,59±0,16 ^a
AD	K	3*	151,13	69,89±0,09 ^o	20,99±0,31 ^c	4,81±0,21 ^{c,d,e,f}	8,29±0,88 ^{a,b,c,d}	82,84±0,23 ^{c,d,e,f,g}
AD	S	3*	140,01	73,81±0,08 ^q	17,82±0,52 ^a	4,89±0,10 ^{c,d,e,f,g}	8,21±0,37 ^{a,b,c,d}	80,14±0,04 ^{a,b,c}

Rezultati su prikazani kao srednja vrednosti (n=2) ± standardna devijacija, Izraženi su na suhu materiju. Različita slova u okviru iste kolone ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05). TM - *Tenebrio molitor*; ZM - *Zophobas morio*; AD- *Acheta domesticus*; M - miks koji se sastojao od šargarepe, kupusa i semena lana ; K - kupus ; S - šargarepa;

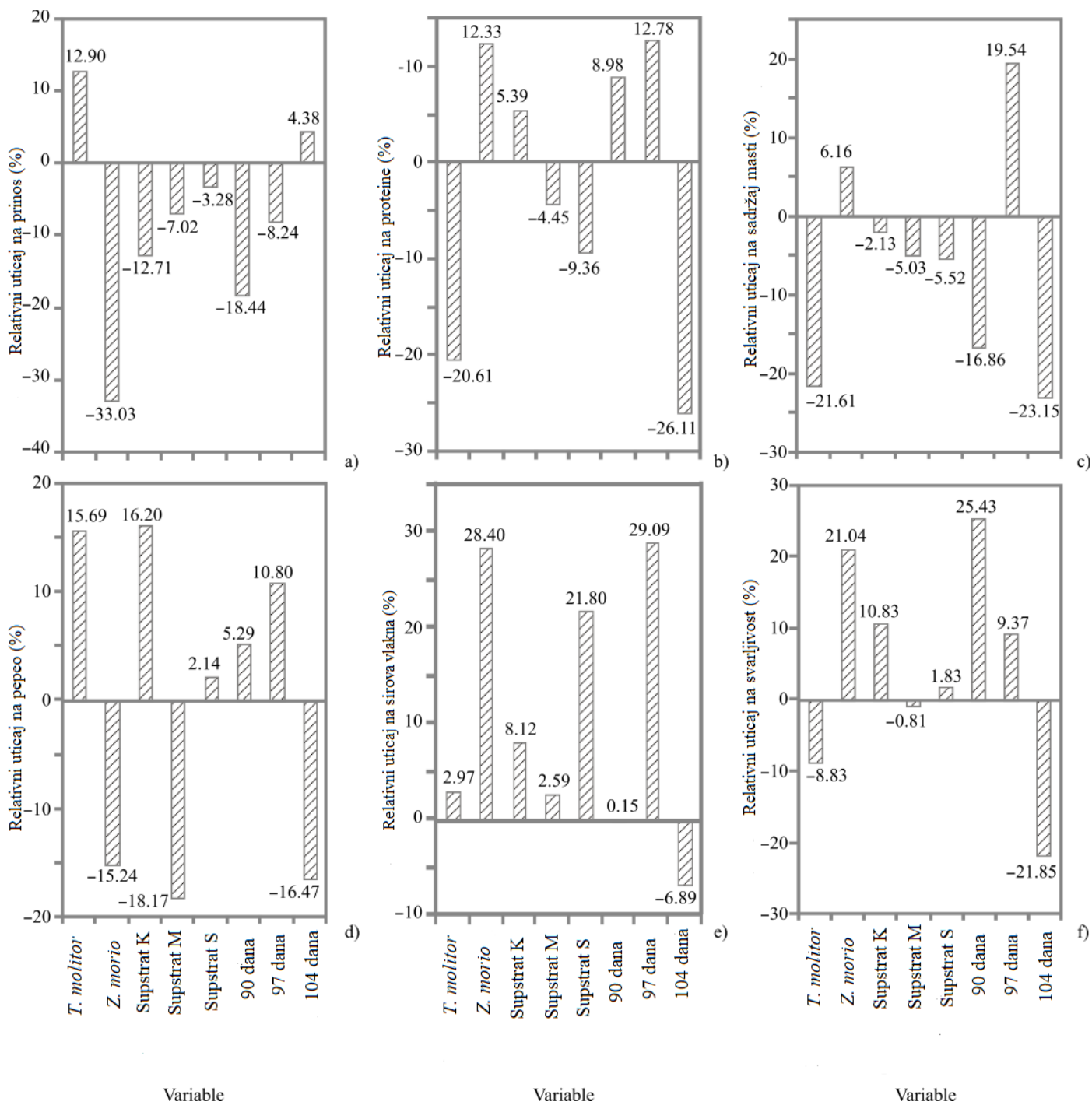
* Vreme gajenje 1, 2 i 3 predstavlja 90, 97 i 104 dana; 1*, 2* i 3* predstavlja 60, 67 i 74 dana

Faktor za preračunavanje proteina kp 6,25

Hrana bogata vlaknima poput pšeničnih mekinja, doprinosi stvaranju većeg sadržaja proteina u odnosu na mast, jer limitiran sastav ovakvih sirovina vodi ka potrošnji sopstvenih masti za normalne fiziološke funkcije, čime se ukupan sadržaj masti larve znatno smanjuje (Benzertiha i sar., 2020). U poređenju sa konvencionalnim proteinskim sirovina u industrijskoj proizvodnji hrane za životinje, poput ribljeg brašna i sojine sačme, oba brašna od insekata se mogu smatrati za proteinski bogate sirovine u ishrani životinja (Marco i sar., 2015; Yoo i sar., 2019). Sojina sačma u proseku sadrži između 49 i 56% proteina, što je veoma slično dobijenim rezultatima za oba brašna, dok riblje brašno ima nešto viši sadržaj proteina, i iznosi preko 60% (Yoo i sar., 2019). Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da oba brašna delimično ili potpuno, u zavisnosti od vrste životinje, mogu da zamene riblje brašno i sojinu sačmu u novim formulacijama hrane za životinje (Makkar i sar., 2014).

5.3.3 Sadržaj masti u brašnu crva brašnara i super crva

U tabeli 3 prikazan je sadržaj masti za obe vrste brašna dobijenog od crva, koji su gajeni na različitim podlogama u tri različita vremenska perioda. Rezultati ukazuju da sadržaj masti varira od 24,83 do 33,54% u slučaju brašna od crva brašnara, dok je u slučaju super crva taj sadržaj nešto viši i iznosi između 32,35 i 44,48%. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane Veldkamp i sar. (2015), Kar i sar. (2016) i Boulos i sar. (2020), dok su nešto manji u poređenju sa larvama super crva koji su gajeni sa povrćem i biljnim otpacima (Harsany i sar., 2020). Posmatranjem uticaja procesa gajenja na sadržaj masti u brašnu od insekata uočeno je da je dodatak šargarepe uticao na smanjenje sadržaja masti u brašnu od crva brašnara u periodu od 104 dana gajenja, što je prikazano na Slici 28(c). Iako pretežno prepoznati kao proteinske sirovine, dobijena brašna od larvi obe insektske vrste mogu se posmatrati i kao sirovine bogate mastima. U poređenju sa sojinom sačmom (3-5% masti) i ribljim brašnom (oko 10% masti), obe vrste brašna sadrže veće količine masti (Kar i sar., 2016).



Slika 28. Relativni uticaj (%) vrste insekta, supstrata i vremena gajenja na nutritivni sastava brašna: **a)** prinos; **b)** sadržaj proteina; **c)** sadržaj masti; **d)** pepeo; **e)** sirova vlakna; **f)** svarljivost proteina

Vrednosti u sadržaju proteina i masti su relativno konstantne u poređenju sa vrstom hranljivog supstrata koji je korišten u uzgoju insekata. U prilog tome idu i rezultati objavljeni od strane Van Broekhoven i sar. (2015), gde je uočeno da je u larvama sadržaj masti i proteina bio relativno konstantan, iako su larve bile hranjene supstratima koji su se u pogledu sadržaja proteina značajno razlikovali. I druga istraživanja su pokazala da se makrokomponente poput sadržaja proteina, masti i vode ne razlikuju u larvama crva brašnara gajenim na različitim vrstama žitarica (Oonincx i sar., 2015).

5.3.4 Sadržaj pepela i sirovih vlakana u brašnu super crva i crva brašnara

U Tabeli 3 su prikazane vrednosti za sadržaj pepela, koji se kreće od 4,79 do 6,84% za brašno crva brašnara i znatno niže u slučaju super crva (2,69 do 3,76%). Pozitivan uticaj na sadržaj pepela uočen je kada je super crv hranjen supstratom M u periodu od 104 dana (Slika 28(d)). Evropska Regulatorica EC No 767/2009 i Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje (Sl. glasnik RS 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015 i 39/2016) jasno propisuje dozvoljeni sadržaj pepela u sirovinama za ishranu životinja. Svi uzorci brašna od insekata su sadržali manje pepela u poređenju sa sadržajem pepela u ribljem brašnu i sojinoj sačmi.

Vrednosti za sirova vlakna u oba uzorka su prikazana u Tabeli 3. Vrednosti su slične za oba uzorka i kreću su se u opsegu od 5,28 do 9,12%. Pozitivan uticaj na sirova vlakna uočava se kod larvi ove insekatske vrste, koje su hranjene supstratom S u periodu od 97 dana (Slika 28(e)). U poređenju sa sojinom sačmom i ribljim brašnom, oba brašna imaju sličan sadržaj sa sojinom sačmom i nešto viši u poređenju sa ribljim brašnom (Kar i sar., 2016). U osnovi sirovih vlakana pretežno se nalazi hitin, koji ima pozitivno dejstvo na probavni trakt životinja (Selenius i sar., 2018). Digestivni trakt životinja može da razgradi hitin samo do određenih delova, međutim veruje se da hitin ima prebiotsko dejstvo (Hussain i sar., 2017). Takođe, pojedina istraživanja ukazuju da hitin ima antimikrobno, antivirusno i antifugalno dejstvo, a u biološkim ogledima na ribama i živini pokazano je da ima pozitivan uticaj na imunološko stanje životinja (Sánchez-Muros i sar., 2014; Piccolo i sar., 2017).

5.3.5 Svarljivost proteina u brašnu crva brašnara i super crva

Svarljivost proteina u brašnu crva brašnara i super crva prikazano je u Tabeli 3. Vrednosti svarljivosti proteina su pretežno ujednačene i kreću se u opsegu od 82,05 do 85,59% u oba brašna i nisu se menjale u zavisnosti od vrste supstrata. Međutim slično kao i za sadržaj proteina, potvrđeno je da suplementacija kupusom i period gajenja od 97 dana može pozitivno da utiče na svarljivost proteina (Slika 28(f)). Svarljivost proteina je veoma slična vrednostima dobijenim za sojinu sačmu i nešto niža u odnosu na riblje brašno (Dossey i sar., 2016; Hussain i sar., 2017). U skladu sa prethodno objavljenim istraživanjima, pokazano je da i sam način procesuiranja brašna u mnogome utiče na svarljivost proteina. Tako su dobijeni rezultati veći u odnosu na rezultate objavljene od strane Bosch i sar. (2014), čiji su uzorci larvi sušeni na višim temperaturama (65,5-66,7%), ali isto tako nešto manji u odnosu na larve super crva (93%) i crva brašnara (91,3%) koji su inaktivirani zamrzavanjem (Oonincx i sar., 2015).

5.4 Nutritivni sastav brašna popaca

Popci (*Acheta domesticus*), predstavljaju insekte koji su pored crva brašnara i super crva možda jedni od najistraženijih kao potencijalna hrana budućnosti (Fernandez-Cassi, 2019). U sledećim poglavljima prikazani su dobijeni rezultati za brašno od popaca. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost i iskazani su na suhu materiju.

5.4.1 Prinos popaca

U Tabeli 3 su prikazane vrednosti za dobijeni prinos popaca. Prinos se kreće od 140,01 do 241,50 g. U poređenju sa crvom brašnarom i super crvom, popci su imali veći prinos za kraće vreme gajenja. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Harsany i sar. (2020), koji su takođe poredili ova tri insekta, ali za kraće vreme gajenja (45 dana). Morfologija popaca je u potpunosti drugačija u odnosu na crva brašnara i super crva, pa su iz tog razloga i rezultati uticaja parametara gajenja na nutritivni sastav prikazani odvojeno. Na Slici 29(a) se može uočiti da je supstrat M i vreme gajenja od 67 dana pozitivno uticao na prinos popaca. Dostupne količine vode u toku gajenja popaca utiču na povećanje suve materije popaca i do 59% (McCluney i Rishabh, 2008). Najintenzivniji rast popaca je postignut između 40-og i 60-og dana gajenja, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenom literaturom (Fernandez-Cassi, 2019).

Niže vrednosti za prinos nakon 74 dana gajenja popaca mogu se objasniti pojavom kanibalizma kod ove vrste insekata, koja nastaje usled neadekvatne raspoloživosti hrane ili tokom uticaja drugih spoljašnjih faktora poput nehigijenskih uslova, vlažnosti vazduha ili temperature (Collavo i sar., 2005).

5.4.2 Sadržaj proteina u brašnu popaca

Procenat proteina u brašnu od popaca se kretao od 64,10 do 73,81%. (Tabela 3) Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane Ghosh i sar. (2017), Barroso i sar. (2014). U poređenju sa rezultatima dobijenim za crva brašnara i super crva, brašno popaca sadrži najviše proteina.

Pozitivan uticaj na količinu proteina imao je dodatak supstrata S i M i period gajenja od 74 dana (Slika 29(b)). Na sadržaj proteina brašna od popaca osim vrste ishrane i starosti jedinke utiče još i pol. Uočeno je da muške jedinke popaca sadrže veću količinu proteina u poređenju sa ženskim jedinkama (Kulma i sar., 2019). U poređenju sa konvencionalnim proteinskim sirovinama u ishrani životinja, može se reći da od sve tri vrste brašna, jedino brašno popca može da bude konkurento sa ribljim brašnom, jer je sadržaj proteina viši ili sličan ribljem brašnu (Kar i sar., 2016). Istraživanja koja su sprovedli Jansen i sar. (2017) su pokazala da sadržaj proteina u larvama insekata (*Tenebrio molitor*, *Hermetia illucens* i *Acheta dubia*) može biti nerealno veliki, usled prisustva hitina, koji je prirodni polisaharid i koji u svom sastavu sadrži azot. Iz tog razloga, neki autori su predložili da prilikom izračunavanja sadržaja sirovih proteina treba koristiti sledeće korigovane faktore: 4,75, 4,86 i 4,67 (Jansen i sar., 2017; Jonas-Levi i Martinez, 2017). Međutim, novija istraživanja su pokazala da je sadržaj hitina u jedinkama popaca oko 1%, računato na suhu materiju, i da ova količina ne može utiče značajno na ukupan sadržaj sirovih proteina. Stoga je u ovoj doktorskoj disertaciji korišćen faktor od 6,25; za koji autori novijih radova, veruju da je prilično verodostojan u prikazu ukupnog sadržaja proteina kod većine larvi insekata i da male količine hitina ne mogu značajno da utiču na nerealnu sliku o količini proteina u većini insekata (Finke i sar., 2015; Kulma i sar., 2019).

5.4.3 Sadržaj masti u brašnu popaca

Sadržaj masti u brašnu popaca se kreće u intervalu od 17,05 do 24,44% (Tabela 3). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim objavljenim rezultatima pojedinih autora (Ghosh i sar., 2017; Udosomal i sar., 2019). U poređenju sa crvom brašnarom i super crvom, brašno popaca se može smatrati za brašno sa niskim sadržajem masti. U industriji hrane za životinje, ovo se može posmatrati kao prednost, jer manja količina masti znači veću stabilnost proizvoda, a time i dužu skladišnu stabilnost. Takođe u pojedinim tehnološkim procesima u industriji hrane za životinje, poput ekstrudiranja, nije poželjna veća količina masti, koja izaziva probleme u silama smicanja tokom proizvodnje, a potom i tokom ekspanzije samog proizvoda (Čolović i sar., 2010).

Uticaj parametara gajenja popaca na sadržaj masti brašna od popaca prikazan je na Slici 29(c), gde se vidi da je pozitivan uticaj na sadržaj masti imao supstrat K. U istraživanjima Morales-Rasmus i sar. (2020) zaključeno je da povrće bogato vitaminom C i sterolima, poput kupusa, u značajnoj meri povećavaju krajnju biomasu popaca, koja može biti povezana i sa povećanjem sadržaja masti. Suprotno ovim rezultatima, Oonincx i van der Poel (2011) su zaključili da dodatak pšeničnih mekinja i šargarepe utiče na povećanje sadržaja masti i smanjenje sadržaja proteina u brašnu popaca.

5.4.4 Sadržaj pepela i sirovih vlakana u brašnu popaca

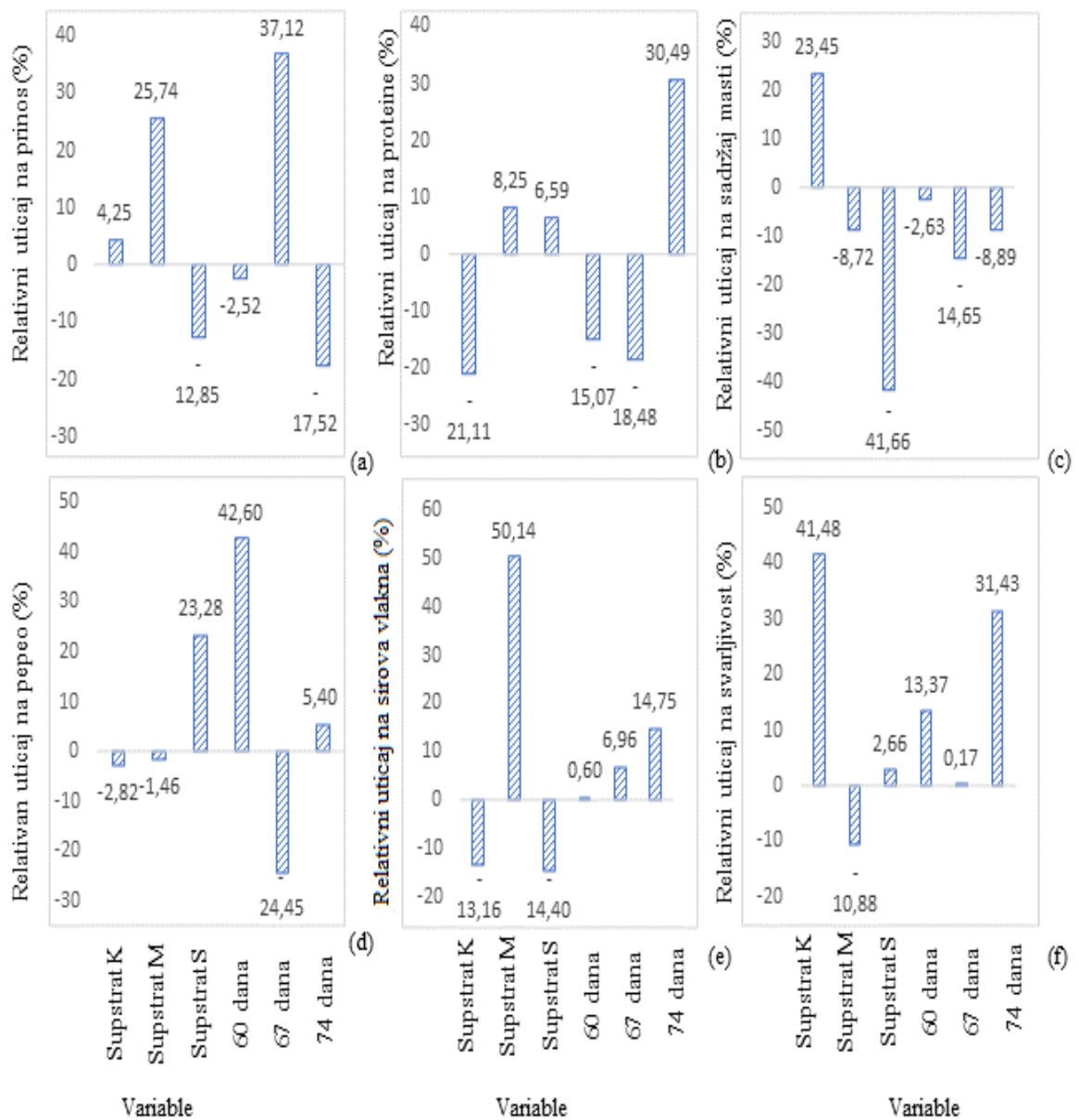
Sadržaj pepela u brašnu popaca prilično je bio ujednačen u svim uzorcima i vrednosti su varirale od 4,45 do 4,52% (Tabela x). Svi uzorci su sadržali nižu količinu pepela od konvencionalnih sirovina poput sojine sačme i ribljeg brašna, čime se mogu smatrati kao pogodne sirovine u ishrani za životinje (Hong i sar., 2015). Negativan uticaj na sadržaj pepela u brašnu popaca imao je supstrat S i period gajenja od 60 dana, što se može uočiti na Slici 29(d).

U Tabeli 3 su prikazane vrednosti za sirova vlakna brašna od popaca. Vrednosti variraju u zavisnosti od uslova gajenja i kreću su se u opsegu od 6,39 do 11,24%. U poređenju sa brašnom crva brašnara i super crva, sadržaj sirovih vlakana je dvostruko viši u brašnu popaca. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama (Ndiritu i sar., 2017), izuzev u slučaju kada je ishrana popaca uključivali supstrat M, gde su vrednosti bile znatno veće. Ovakvi rezultati idu u prilog činjenici da nutritivni sastav insekata nije konstantan i da na njega u velikoj meri utiču hranljivi supstrat i drugi uslovi gajenja (Finke i sar., 2002; Sánchez-Muros i sar., 2014; Oonincx i

sar.,2015). Kao što je prikazano i na Slici 29(f), supstrat M je u sva tri vremenska perioda gajenja imao pozitivan uticaj na sadržaj vlakana. Može se pretpostaviti da seme lana ima uticaj na povećanje sadržaja, ali tačan uticaj još uvek nije dovoljno istražen. Kao i u prethodnom slučaju za brašno crva brašnara i super crva, i ovde je neophodno istaći da se pod pojmom „sirova vlakna“ generalno se misli na sadržaj hitina i njegovih derivata.

5.4.5 Svarljivost proteina u brašnu popaca

Vrednosti za svarljivost proteina u brašnu popaca su se kretale od 78,29 do 82,84% (Tabela 3), što je nešto niže u odnosu na vrednosti u brašnu crva brašnara i super crva. Ove vrednosti za svarljivost proteina u brašnu od popaca su nešto više od prethodno objavljenih rezultata (Areerat i sar., 2021). U istraživanjima Areerat i sar. (2021) koristili su komercijalno dostupne popce, koje su inaktivirali zamrzavanjem, a potom ih sušili. Razlika u rezultatima se može objasniti razlikama u ishrani popaca, kao i tehnološkom procesu dobijanja brašna, koje u značajnoj meri imaju uticaj na svarljivost proteina (Bosch i sar., 2014; Oonicx i sar., 2015). Slično kao i u slučaju sa super crvom i kod popaca je utvrđeno da supstrat K i duži period uzgajanja (74 dana), pozitivno utiču na svarljivost proteina (Slika x). U poređenju sa konvencionalnim izvorima proteina, svarljivost proteina brašna popaca je nešto niža u odnosu na riblje brašno i sojinu sačmu (Dossey i sar., 2016; Hussain i sar., 2017).



Slika 29. Relativni uticaj (%) supstrata i vremena gajenja na nutritivni sastav brašna od popaca: **a)** prinos; **b)** sadržaj proteina; **c)** sadržaj masti; **d)** pepeo; **e)** sirova vlakna; **f)** svarljivost proteina

5.5 Aminokiselinski sastav brašna crva brašnara i super crva

Aminokiselinski (AK) sastav brašna crva brašnara i super crva prikazan je u Tabeli 4. U svim uzorcima su detektovane sve aminokiseline, izuzev triptofana, čiji sadržaj zbog različite metodologije u odnosu na ostale amino kiseline nije određen. Larve super crva i crva brašnara predstavljaju potencijalno visokokvalitetnu proteinsku sirovinu u ishrani životinja. U izboru sirovina u industriji hrane za životinje, osim kvantitativnog pokazatelja, važan je i kvalitativni pokazatelj proteina (Kovitvadi i sar., 2019). Jedan od kvalitativnih pokazatelja je upravo aminokiselinski sastav proteina.

U obe vrste brašna najzastupljenije esencijalne AK su leucin, lizin i valin, dok je najmanje zastupljen metionin. Udeo esencijalnih AK u ukupnim (17 amino kiselina) je 38,52 do 40,04% za brašno super crva i 39,1 do 39,67% u slučaju brašna od crva brašnara. U poređenju sa biljnim sirovinama koje su mahom deficitarne u pogledu esencijalnih AK (Fathollahy i sar., 2021), ove vrednosti su značajno više. Dobijeni rezultati su slični rezultatima dobijenim u istraživanjima Prachom i sar. (2021) i Boulos i sar. (2020). U poređenju sa konvencionalnim proteinima u ishrani životinja, oba brašna sadrže veću količinu esencijalnih AK od sojine sačme i slična su profilu ribljeg i mesnog brašna (Siemianowska i sar., 2013).

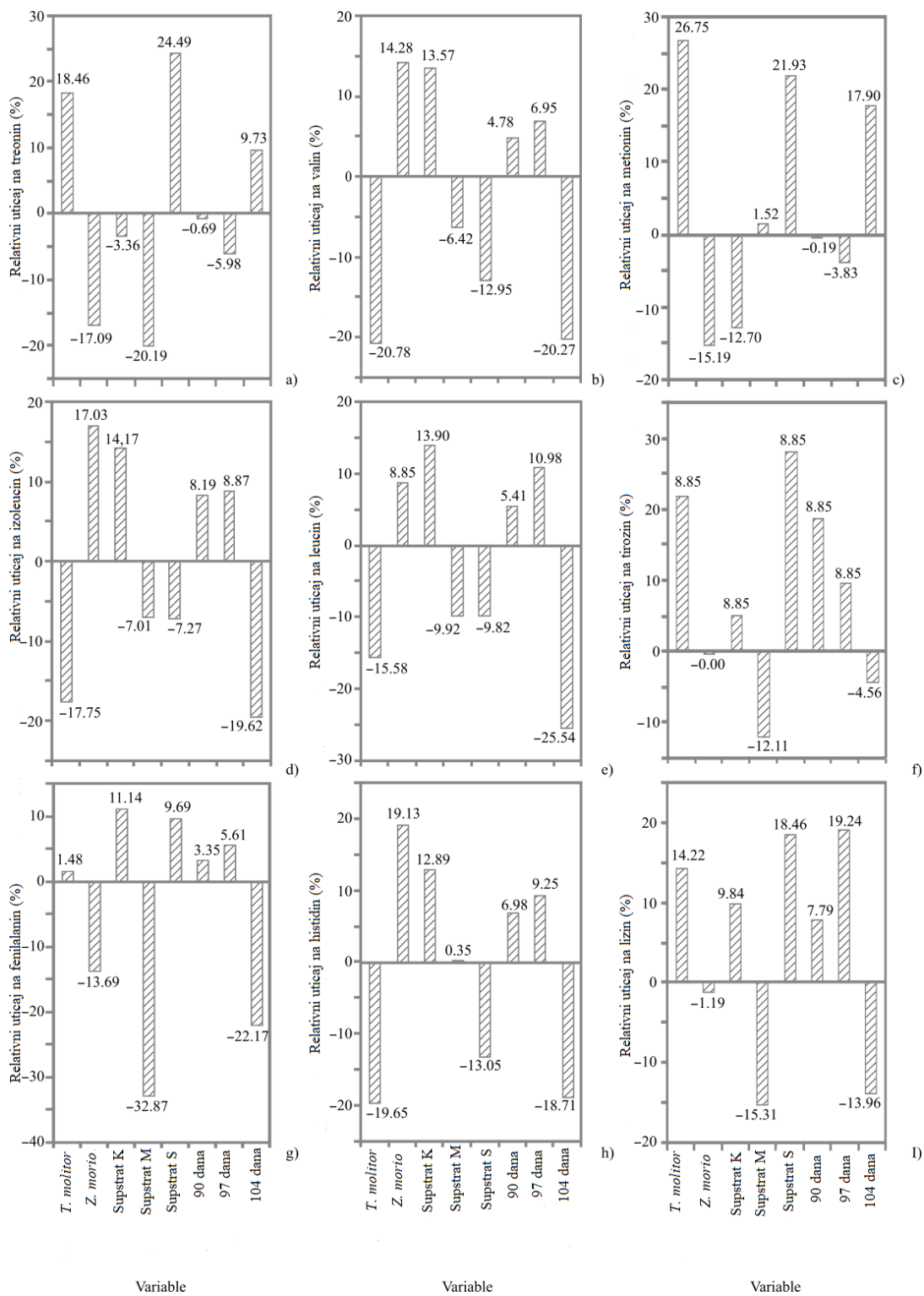
Jedan od limitirajućih faktora u potencijalnoj primeni ovog brašna u ishrani životinja je mali sadržaj metionina i lizina. Međutim uz adekvatnu suplementaciju u recepturi sadržaj obe AK je moguće povećati (Makkar i sar., 2014). Takođe, neki autori predlažu i korišćenje genetskih metoda, poput hibridizacije i genske selekcije insekata u cilju poboljšanja rasta i nutritivnog sastava (Eriksson i Pickard, 2021; Rumbos i sar., 2021). Sadržaj metionina i lizina je nešto veći u odnosu na rezultate dobijene u istraživanjima Jabir i sar. (2012) i nešto manji u odnosu na sadržaj u radu Rumpold-a and Schlüter-a (2013). Tirozin, prolin, asparaginska i glutaminska kiselina su najzastupljenije neesencijalne AK u svim uzorcima

Tabela 4. Aminokiselinski sastav brašna od insekata

Vrsta insekta	Supstrat	Vreme gajenja	Asp	Tir	Arg	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val		Met	Isl	Leu	Thr	Phe	His	Lys	
			Neesencijalne									Esencijalne									
g/100g proteina																					
TM	M	1	6,84	7,37	5,19	3,02	9,44	7,70	3,72	4,79	1,11	4,51	1,41	3,93	6,11	3,48	3,81	3,18	5,08		
TM	K	1	6,45	7,34	5,23	2,94	8,56	8,17	3,39	4,28	0,97	4,14	1,46	3,84	5,68	2,76	3,53	3,3	4,96		
TM	S	1	6,54	7,68	5,37	3,04	8,66	8,58	3,41	3,40	1,01	4,16	1,55	4,03	5,52	3,04	3,35	3,56	5,12		
TM	M	2	7,42	7,36	5,41	3,18	9,97	7,99	3,98	4,06	1,14	4,68	1,36	4,03	6,24	2,84	3,3	3,33	5,32		
TM	K	2	6,60	6,97	4,62	2,82	8,69	7,14	3,41	3,39	1,04	3,98	1,33	3,61	5,47	3,33	3,63	3,04	5,46		
TM	S	2	6,87	7,17	5,13	3,01	9,17	7,96	3,68	3,71	1,15	4,27	1,36	3,85	5,75	3,27	3,78	3,24	5,04		
TM	M	3	6,29	6,78	4,54	2,76	8,54	6,98	3,44	3,49	1,08	4,07	1,26	3,51	5,55	3,06	3,32	2,93	4,77		
TM	K	3	6,26	6,67	4,73	2,79	8,21	7,25	3,22	3,25	0,98	3,81	1,24	3,50	5,14	3,21	3,20	3,05	4,63		
TM	S	3	6,53	6,68	4,67	2,83	8,63	7,19	3,41	3,45	1,09	4,08	1,27	3,58	5,57	3,09	3,62	2,95	4,76		
ZM	M	1	7,11	9,23	6,20	3,68	10,29	8,07	4,14	5,09	0,00	5,35	1,46	5,24	5,55	3,88	3,73	3,93	5,50		
ZM	K	1	6,21	8,34	5,61	3,17	8,82	7,13	3,69	4,65	0,00	4,82	1,35	4,56	5,08	3,43	3,13	3,52	4,78		
ZM	S	1	7,22	8,67	5,98	3,59	10,56	7,67	4,28	5,53	0,00	5,48	1,54	5,13	5,68	3,78	4,03	3,64	5,43		
ZM	M	2	6,18	8,07	5,76	3,19	8,87	6,94	3,53	4,41	0,00	4,62	1,43	4,62	5,21	3,45	3,07	3,61	4,88		
ZM	K	2	7,09	8,43	6,23	3,63	10,18	7,53	4,08	5,20	0,00	5,29	1,26	4,93	5,52	3,81	3,68	3,86	5,29		
ZM	S	2	6,03	7,95	5,35	3,08	8,51	6,47	3,47	4,39	0,00	4,59	1,32	4,35	4,87	3,31	3,19	3,39	4,63		
ZM	M	3	7,01	8,82	5,56	3,71	10,37	7,82	4,36	5,66	0,00	5,61	1,10	4,91	5,51	3,66	3,96	3,71	5,06		
ZM	K	3	7,54	9,13	6,50	3,72	10,97	7,64	4,32	5,51	0,00	5,51	1,54	5,31	5,85	3,92	4,12	3,77	5,66		
ZM	S	3	7,14	8,90	6,21	3,72	10,42	7,88	4,31	5,58	0,00	5,48	1,52	5,09	5,68	3,77	4,01	3,72	5,48		
AD	M	1*	6,40	5,16	6,61	3,39	7,89	6,75	3,67	4,67	0,00	4,33	1,80	4,19	4,98	3,18	3,18	2,73	4,67		
AD	K	1*	5,60	5,93	6,41	3,01	7,57	6,65	3,43	4,18	0,00	4,01	1,71	3,91	4,69	3,08	2,95	2,67	4,66		
AD	S	1*	5,81	5,27	6,47	3,17	7,48	6,67	3,35	4,19	0,00	4,07	1,71	3,92	4,64	3,11	2,75	2,75	4,55		
AD	M	2*	5,94	4,99	6,31	3,22	7,47	6,55	3,36	4,21	0,00	4,04	1,70	3,94	4,65	3,05	2,88	2,68	4,48		
AD	K	2*	5,47	4,36	5,41	2,88	6,78	5,58	3,05	3,81	0,00	3,55	1,37	3,26	4,04	2,65	2,44	2,12	3,95		
AD	S	2*	6,92	5,52	6,85	3,64	8,58	7,07	3,86	4,83	0,00	4,47	1,73	4,15	5,12	3,35	3,10	2,70	5,01		
AD	M	3*	6,21	5,80	6,63	3,35	7,97	6,52	3,59	4,42	0,00	4,18	1,86	4,21	4,97	3,21	3,11	2,80	4,69		
AD	K	3*	5,14	5,73	5,90	2,72	6,79	6,20	3,04	3,72	0,00	3,72	1,62	3,66	4,34	2,89	2,48	2,51	4,16		
AD	S	3*	5,83	5,55	6,31	3,08	7,67	6,44	3,49	4,34	0,00	4,06	1,55	3,74	4,53	3,08	2,98	2,63	4,63		

Rezultati su izraženi kao g/100g proteina, TM - *Tenebrio molitor*; ZM - *Zophobas morio*; AD- *Acheta domesticus*; * Vreme gajenje 1, 2 i 3 predstavlja 90, 97 i 104 dana; 1*, 2* i 3* predstavlja 60, 67 i 74 dana M - miksi koji se sastojao od šargarepe, kupusa i semena lana; K - kupus; S - šargarepa;

Kao što se može videti na Slici 30, supstrat S je pozitivno uticao na sadržaj treonina, metionina, lizina i tirozina, dok je negativan efekat imao na sadržaj valina, leucina, izoleucina i histidina u brašnu crva brašnara. Pozitivan uticaj na sadržaj leucina, histidina, valina i izoleucina se mogao opaziti u brašnu super crva, kada su larve hranjene supstratom K u periodu od 97 dana. Sa druge strane, negativan uticaj na sadržaj metionina i treonina u brašnu super crva je zabeležen kada su larve hranjene supstratom K i M, u periodu od 97 dana. Pozitivan uticaj na sadržaj fenilalanina u brašnu crva brašnara je zabeležen kada su larve hranjene supstratom K u periodu od 97 dana. Prethodna istraživanja su pokazala da je AK sastav insekata uniforman i da predstavlja karakteristiku vrste, pri čemu najverovatnije nije u vezi sa uslovima gajenja, niti sa životnom fazom insekta (Ooninx i Finke, 2021).

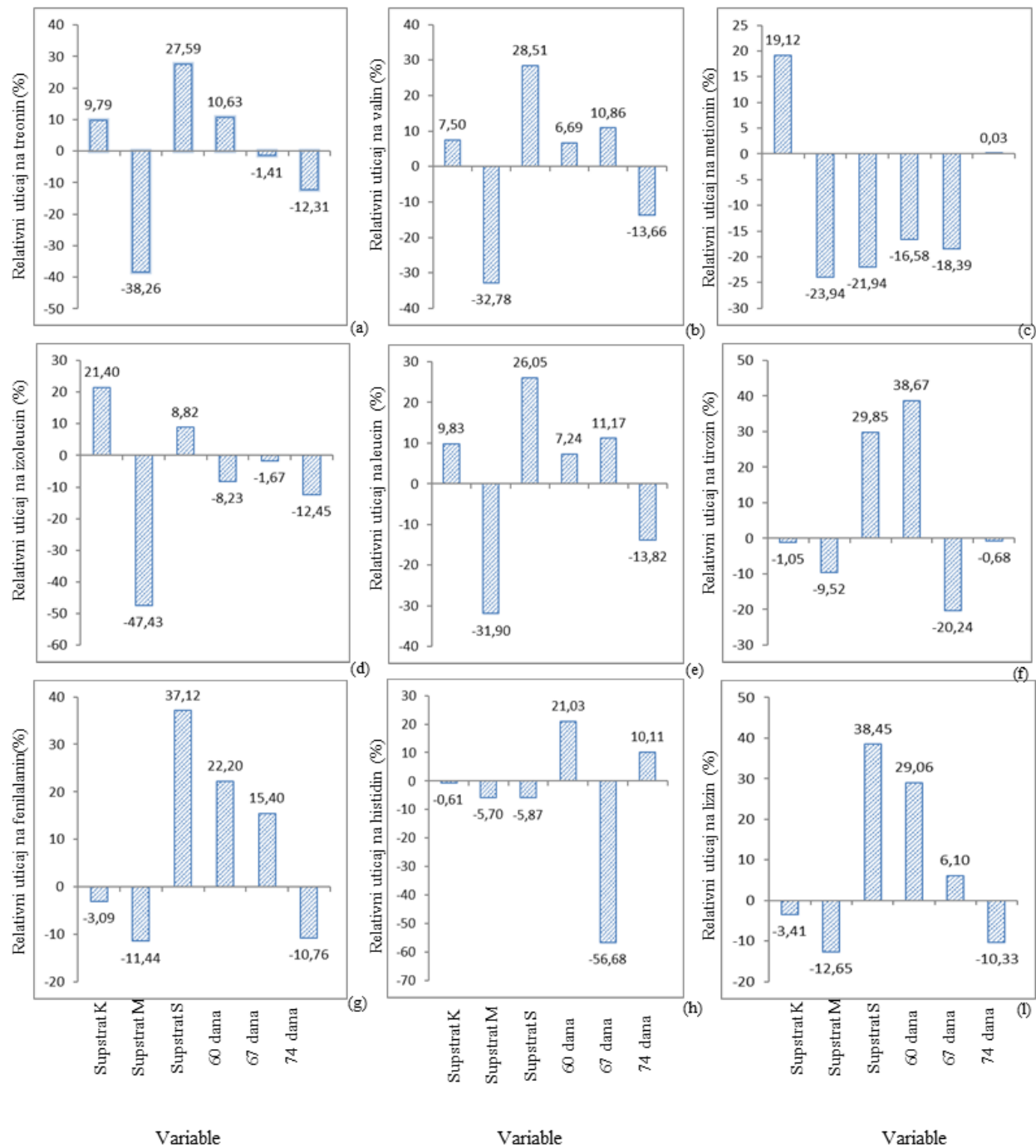


Slika 30. Relativni uticaj (%) vrste insekta, supstrata i vremena gajenja na sadržaj amino kiselina: **a)** treonin; **b)** valin; **c)** metionin; **d)** izoleucin; **e)** leucin; **f)** tirozin; **g)** fenilalanin; **h)** histidin; **i)** lizin

5.6 Aminokiselinski sastav u brašnu popaca

Sadržaj AK u brašnu od popaca prikazan je u Tabeli 4. Sve esencijalne amino kiseline su detektovane u svim uzorcima brašna od popaca. Najzastupljenije esencijalne AK su bile valin, leucin, izoleucin i lizin, dok su deficitarne slično kao i u prethodna dva brašna vrednosti dobijene za metionin i histidin. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane Finke i sar. (2007), dok su vrednosti za valin nešto niže u poređenju sa rezultatima Udomsil i sar. (2019). Iako je sadržaj histidina bio nizak u poređenju sa drugim vrednostima AK, količina od 1,58 g/100g uzorka je sasvim dovoljna da zadovolji potrebe za maksimalan rast većine vrste riba (Khan i Abidi, 2014). Metionin bi i u ovom brašnu bila limitirajuća AK i formulacija za ishranu životinja bi zahtevala dodatak ili sintetičkog metionina ili neke druge sirovine sa većim sadržajem ove AK.

Udeo esencijalnih AK u ukupnom sadržaju AK se kreće od 34,14 do 35,15%. Idealan udeo ovih AK je 50% ili bi odnos esencijalnih/neesencijalnih trebalo da iznosi 1 (Nogales Merida i sar., 2018). Međutim, imajući u vidu da triptofan, koja je takođe esencijalna AK nije određivana ovom metodologijom, možemo reći da je realan udeo nešto veći od predstavljenog. U svakom slučaju, prilikom izrade receptura za određenu vrstu i kategoriju životinja, dodatkom sintetičkih amino kiselina ili obogaćivanjem recepture sirovinama bogatim deficitarnim AK u značajnoj meri se može poboljšati AK sastav (Nogales Merida i sar., 2018). Dobijeni rezultati su slični rezultatima dobijenim Finke i sar. (2007). Najzastupljenije među neesencijalnim AK su glutaminska, prolin i asparaginska kiselina. Važno je istaći da pojedine životinje poput živine zahtevaju veći sadržaj arginina u svojoj ishrani. Tako npr. za živinu neophodan odnos arginin/lizin treba da bude 1,18, za somove 0,84, dok za pacove treba da bude 0,47 (NRC, 1993; NRC, 1994; NRC, 1995). Odnos ove dve AK se kreće oko 1,4, tako da se može zaključiti da je ovo brašno pogodno za živinu u sadržaju ove dve AK i njihovog odnosa.



Slika 31. Relativni uticaj (%) supstrata i vremena gajenja u brašnu popaca na sadržaj amino kiselina: **a)** treonin; **b)** valin; **c)** metionin; **d)** izoleucin; **e)** leucin; **f)** tirozin; **g)** fenilalanin; **h)** histidin; **l)** lizin

Uticaj uslova gajenja na sadržaj AK prikazan je na Slici 31. Kao što se može videti, supstrat S je pozitivno uticao na sadržaj treonina, valina, leucina, tirozina, lizina i fenilalanina u periodu od 60 dana, dok je negativno uticao na sadržaj histidina u periodu od 67 dana gajenja. Supstrat K je pozitivno uticao na sadržaj metionina i izoleucina. Iako brojni autori pretpostavljaju da AK profil predstavlja specifičnu karakteristiku za određenu vrstu insekta i da je više genetski uslovljen, razlika u dobijenim rezultatima za pojedine AK, može da ukazuje da uslovi gajenja ipak mogu da utiču na sadržaj pojedinih AK (Oonincx i Finke, 2021).

5.7 Mineralni sastav brašna od crva brašnara i super crva

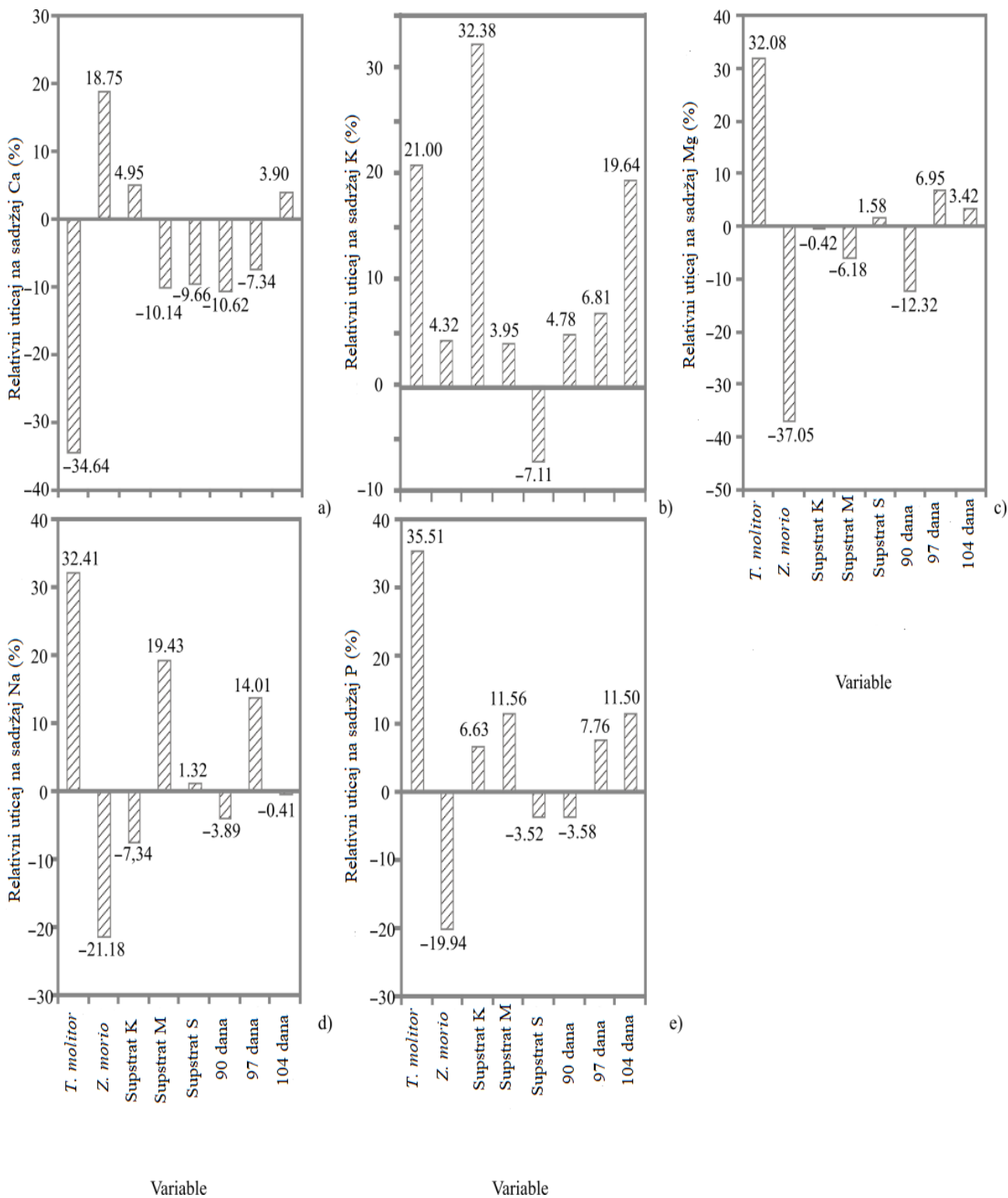
Mineralni sastav brašna crva brašnara i super crva prikazan je u Tabeli 5. U poređenju sa brašnom crva brašnara, brašno super crva sadrži veću količinu Ca, ali manju količinu K, Mg i Zn. Sadržaj Ca se kreće u opsegu od 24,30 do 32,28 mg/100g u brašnu crva brašnara i od 38,68 do 66,85 mg/100g u brašnu super crva. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Makkar i sar., 2014; Hong i sar., 2020). U poređenju sa istraživanjima Siemianowska i sar. (2013) sadržaj K, Ca i P u brašnu crva brašnara je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima, dok je sadržaj Na i Mg nešto viši u odnosu na njihove rezultate. Takođe, Araújo i sar. (2019) su ustanovili niži sadržaj Ca i Mg u brašnu super crva, koji je bio gajen pomoću pšenice, kukuruza, sojine sačme, voća i povrća. Ove razlike u mineralnom sastavu brašna se mogu objasniti time što su korištene različite vrste biljnih supstrata u ishrani larvi.

Tabela 5. Mineralni sastav brašna insekata

Vrsta insekta	Supstrat	Vreme gajenja	Ca	K	Mg	Na	Fe	Zn	Mn	Cu	P
			mg/100g								
1TM	M	1	24,30±0,08 ^a	827,42±0,04 ^k	181,19±0,06 ^o	168,72±0,13 ^d	5,05±0,01 ^b	12,04±0,03 ^{g,h}	0,82±0,02 ^a	1,51±0,02 ^c	753,23±0,04 ^e
2TM	K	1	26,82±0,01 ^{d,e}	878,14±0,13 ^{o,p}	192,70±0,01 ^p	117,72±0,11 ^e	4,22±0,02 ^d	13,59±0,30 ^k	1,30±0,03 ^c	1,89±0,02 ^d	794,90±0,14 ^{e,f}
3TM	S	1	25,95±0,12 ^c	741,74±0,11 ^h	205,82±0,26 ^q	148,67±0,01 ^f	4,16±0,01 ^a	12,48±0,01 ^{h,i}	1,07±0,03 ^{b,c,d}	1,83±0,07 ^d	800,28±0,02 ^g
4TM	M	2	26,60±0,14 ^d	862,89±0,07 ^m	216,83±0,03 ^r	153,61±0,11 ^{b,c}	4,27±0,04 ^a	11,42±0,04 ^{f,g}	0,88±0,02 ^{a,b}	2,02±0,06 ^{d,e}	754,81±0,30 ^e
5TM	K	2	32,28±0,09 ^g	762,27±0,06 ⁱ	227,71±0,59 ^s	153,27±0,12 ^{a,b}	5,20±0,01 ^{b,c}	13,76±0,01 ^{j,k}	1,14±0,02 ^{c,d}	2,35±0,1 ^{e,f}	782,99±0,10 ^{f,g}
6TM	S	2	27,28±0,12 ^c	863,09±0,04 ^m	267,77±0,06 ^v	160,52±0,30 ^g	5,88±0,30 ^{c,d,e}	15,60±0,11 ^l	1,63±0,06 ^c	2,75±0,06 ^g	888,77±0,31 ^{i,j}
7TM	M	3	29,54±0,13 ^f	868,59±0,09 ^{m,n}	240,66±0,35 ^u	144,86±0,20 ^h	5,39±0,17 ^{b,c,d}	11,04±0,01 ^f	0,97±0,05 ^{a,b,c}	1,84±0,10 ^d	751,56±0,82 ^e
8TM	K	3	29,02±0,21 ^f	831,48±0,01 ^k	238,46±0,34 ^t	157,12±0,09 ⁱ	6,66±0,11 ^{h,i}	13,11±0,01 ^{i,j}	1,23±0,08 ^d	2,29±0,06 ^{e,f}	833,68±0,04 ^h
9TM	S	3	24,89±0,15 ^b	786,33±0,15 ^j	277,14±0,22 ^w	181,96±0,11 ^j	5,38±0,01 ^{b,c,d}	16,05±0,28 ^m	1,95±0,04 ^f	2,37±0,02 ^f	915,80±0,31 ^{k,l}
10ZM	M	1	38,68±0,04 ^h	601,40±0,02 ^d	98,12±0,02 ^g	155,86±0,04 ^k	8,91±0,38 ⁱ	7,48±0,03 ^{d,e}	0,85±0,04 ^a	1,04±0,01 ^{a,b}	547,11±1,21 ^{a,b}
11ZM	K	1	59,54±0,42 ^l	590,27±0,06 ^c	91,16±0,27 ^d	138,51±0,03 ^l	6,24±0,02 ^{f,g,h}	5,69±0,17 ^a	0,97±0,1 ^{a,b,c}	1,27±0,07 ^{b,c}	628,47±0,11 ^{c,d}
12ZM	S	1	39,56±0,08 ⁱ	493,19±0,06 ^a	71,95±0,21 ^a	108,00±0,36 ^m	6,02±0,02 ^{e,f,g}	5,31±0,07 ^a	1,03±0,08 ^{b,c,d}	0,94±0,04 ^a	541,14±0,01 ^a
13ZM	M	2	66,85±0,12 ^p	615,97±0,07 ^c	95,52±0,05 ^f	183,47±0,04 ⁿ	11,58±0,06 ^l	7,49±0,25 ^e	0,97±0,01 ^{a,b,c}	1,20±0,03 ^b	570,06±0,15 ^b
14ZM	K	2	64,25±0,07 ^m	665,71±0,02 ^g	100,23±0,09 ^h	152,55±0,08 ⁿ	4,29±0,11 ^{b,c,d}	7,26±0,06 ^{c,d,e}	1,13±0,01 ^{b,c,d}	1,31±0,04 ^{b,c}	566,04±1,29 ^{a,b}
15ZM	S	2	40,74±0,11 ^j	643,96±0,01 ^f	100,98±0,28 ^{h,i}	167,23±0,44 ^o	6,65±0,06 ^{h,i}	7,03±0,016 ^{c,d,e}	1,19±0,03 ^{c,d}	1,21±0,01 ^b	605,15±0,14 ^c
16ZM	M	3	65,21±0,08 ⁿ	615,27±0,11 ^e	90,68±0,12 ^d	158,66±0,21 ^p	3,98±0,11 ^a	6,84±0,10 ^{b,c,d}	0,98±0,01 ^{a,b,c}	1,11±0,02 ^{a,b}	651,15±0,49 ^d
17ZM	K	3	55,92±0,14 ^k	552,36±0,04 ^b	99,87±0,09 ^h	187,70±0,35 ^q	10,77±0,06 ^k	6,41±0,04 ^b	1,20±0,07 ^d	1,32±0,03 ^{b,c}	625,99±0,09 ^{c,d}
18ZM	S	3	65,81±0,10 ^o	641,58±0,10 ^f	95,16±0,01 ^{e,f}	154,43±0,16 ^c	4,20±0,16 ^a	6,70±0,28 ^{b,c}	0,94±0,03 ^{a,b,c}	1,05±0,03 ^{a,b}	612,89±0,69 ^c
19AD	M	1*	98,21±0,10 ^w	1006,60±5,48 ^s	117,99±0,32 ^l	495,18±0,04 ^r	5,68±0,16 ^{d,e,f}	24,92±0,13 ^t	4,01±0,17 ^k	3,77±0,04 ^k	993,35±0,63 ^m
20AD	K	2*	82,43±0,15 ^u	881,82±0,35 ^p	85,81±0,47 ^c	388,99±0,09 ^s	4,07±0,04 ^a	25,37±0,07 ^u	3,25±0,07 ^g	2,65±0,01 ^g	892,04±0,02 ^{i,j,k}
21AD	S	3*	78,40±0,1 ^s	968,36±0,15 ^e	106,33±0,08 ^k	445,75±0,45 ^t	5,62±0,04 ^{c,d,e,f}	24,00±0,06 ^q	4,25±0,03 ^k	2,81±0,14 ^g	977,66±0,06 ^m
22AD	M	1*	87,89±0,09 ^v	846,10±0,46 ^l	120,17±0,29 ^m	601,83±0,01 ^u	6,19±0,16 ^{c,f,g,h}	22,49±0,07 ^p	4,60±0,08 ^l	3,73±0,12 ^{i,j}	1024,99±0,09 ⁿ
23AD	K	2*	69,17±0,06 ^q	1013,59±9,29 ^s	121,86±0,04 ^o	414,57±0,23 ^v	6,24±0,11 ^{g,h}	25,68±0,08 ^v	3,86±0,08 ^{i,j}	3,53±0,21 ⁱ	868,40±0,51 ⁱ
24AD	S	3*	66,09±0,18 ^{o,p}	867,73±3,19 ^{m,n,o}	101,86±0,44 ⁱ	430,34±0,09 ^w	5,64±0,25 ^{c,d,e,f}	20,43±0,08 ⁿ	4,16±0,06 ^k	3,08±0,32 ^h	908,33±0,30 ^{k,l}
25AD	M	1*	66,47±0,03 ^p	903,63±1,48 ^q	94,51±0,28 ^e	465,33±0,04 ^s	7,18±0,31 ⁱ	24,35±0,06 ^r	3,96±0,05 ^{i,j}	2,97±0,21 ^{g,h}	929,99±0,09 ^l
26AD	K	2*	71,78±0,03 ^r	971,51±0,57 ^r	80,33±0,06 ^b	400,94±0,06 ^w	5,23±0,47 ^{b,c,d}	24,64±0,06	3,46±0,06 ^h	3,05±0,54 ^h	913,95±0,64 ^{k,l}
27AD	S	3*	79,36±0,06 ^t	874,97±0,17 ^{m,o,p}	104,00±0,37 ^j	427,05±0,05 ^r	6,05±0,25 ^{e,f,g}	21,75±0,06 ^o	3,64±0,06 ^{h,i}	3,33±0,17 ⁱ	995,89±0,11 ^m

Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja (n=2) i izraženi su kao mg/100g suve materije. Različita slova u okviru iste kolone ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05). TM - *Tenebrio molitor*; ZM - *Zophobas morio*; AD- *Acheta domesticus*; * Vreme gajenja 1, 2 i 3 predstavlja 90, 97 i 104 dana; 1*, 2* i 3* predstavlja 60, 67 i 74 dana; M - miks koji se sastojao od šargarepe, kupusa i semena lana; K - kupus; S - šargarepa;

Na slici 32(a) se može uočiti da je supstrat K pozitivno uticao na sadržaj Ca u ishrani super crva tokom 104 dana gajenja. U brašnu crva brašnara sadržaj K varira u vrednostima od 741,74 do 878,14 mg/100g, dok vrednosti u brašnu super crva variraju u opsegu od 493,19 do 665,71 mg/100g. Na sadržaj K u oba brašna pozitivno je uticao supstrat K u periodu od 104 dana (Slika 32(b)). Sadržaj Mg je nešto veći u brašnu crva brašnara i varira od 181,19 do 277,14 mg/100g, dok su u brašnu super crva utvrđene količine od 71,95 do 100,98 mg/100g. Na Slici 32(c) prikazan je uticaj uslova gajenja na sadržaj Mg i može se uočiti da je supstrat M negativno uticao na sadržaj Mg u ishrani super crva u periodu od 90 dana. U brašnu crva brašnara određen je sadržaj P, koji se kreće u rasponu od 751,56 do 915,80 mg/100g, dok su vrednosti u brašnu super crva u intervalu od 541,14 do 651,15 mg/100g. Pozitivan uticaj na sadržaj P uočava se kod crva brašnara hranjenog supstratom M tokom 104 dana (Slika 32(d)). Oba brašna imaju sličan sadržaj Na (od 108,00 do 187,80 mg/100g), Fe (od 3,98 do 11,58 mg/100g), Mn (od 0,82 do 1,95 mg/100g) i Cu (1,05 do 2,75 mg/100g). Na sadržaj Na i P u brašnu crva brašnara, pozitivno je uticao dodatak supstrata M u periodu od 97 dana (Slika 32(e)).



Slika 32. Relativni uticaj (%) vrste insekta, supstrata i vremena gajenja na sadržaj minerala: **a)** Ca; **b)** sadržaj K; **c)** sadržaj Mg; **d)** sadržaj Na; **e)** sadržaj P

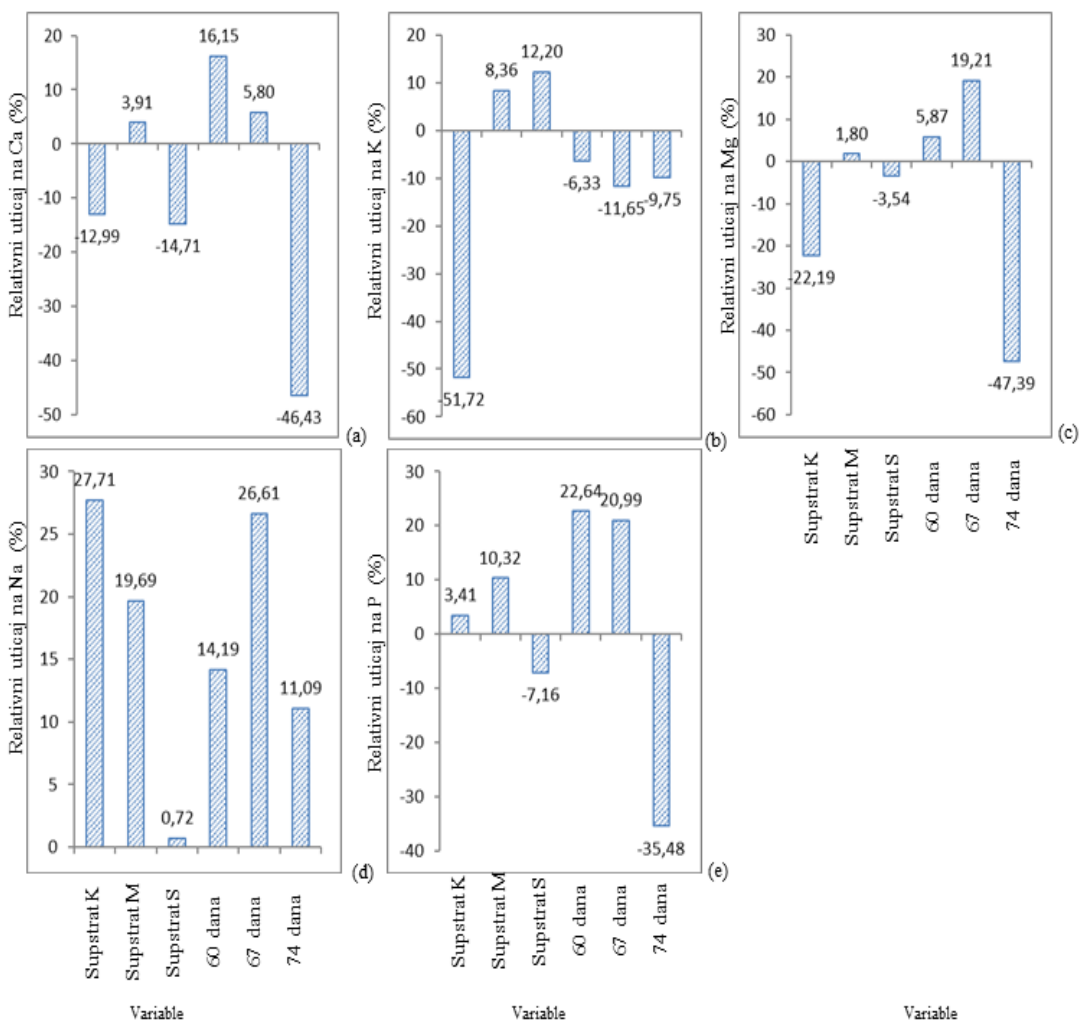
Generalno, insekti se u pogledu sastava minerala mogu posmatrati kao sirovine bogate P ali siromašne u pogledu sadržaja Ca i K. Nizak sadržaj Ca predstavlja nedostatak kod obe vrste brašna, jer u ishrani životinja niske koncentracije Ca u hranivima mogu da prouzrokuju brojne probleme povezane sa razvojem kostiju životinja (Makkar i sar., 2014). Jedno od rešenja, kao i u slučaju limitiranih AK je suplementacija Ca kroz dodatak krede ili mono- i di-kalcijum fosfata u recepturi za ishranu životinja, što je uobičajena praksa.

5.8 Mineralni sastav brašna od popaca

Mineralni sastav brašna od popaca prikazan je u Tabeli 5. U poređenju sa mineralnim sastavom brašna od crva brašnara i super crva, brašno od popaca je bilo bogatije u sadržaju gotovo svih minerala. Najzastupljeniji minerali su bili K, Na i P. Sadržaj K se kreće u rasponu od 846,10 do 1013,59 mg/100g, sadržaj Na od 388,99 do 601,83 mg/100g, sadržaj Mg od 80,33 do 121,86, dok je sadržaj P sličan u poređenju sa prethodna dva brašna i kreće se u intervalu između 868,40 do 1024,99 mg/100g. U poređenju sa brašnom crva brašnara i super crva, sadržaj Na u brašnu popaca je veći 4 puta. Sadržaj Ca se kreće od 66,09 do 98,21 mg/100g i najveći je u poređenju sa ostala dva brašna. Sadržaj Fe, Cu i Mn se u mnogome ne razlikuje od druga dva brašna i ne prelazi vrednosti od 7 mg/100g, dok je sadržaj Zn duplo veći i kreće se od 20,43 do 25,68 mg/100g. Dobijeni rezultati su u saglasnosti u pogledu sadržaja P, Fe, Cu, Mn, Mg i Zn, dok je sadržaj Ca, Na i K veći u poređenju sa prethodnim istraživanjima (Udomsil i sar., 2019). Rezultati istraživanja sprovedenog na Tajlandu, pokazali su da se sadržaj mineralnih materija popaca sakupljenih iz prirode i gajenih u kontrolisanim uslovima u mnogome razlikuju (Köhler i sar., 2018). Ovakav rezultat je najverovatnije povezan sa načinom ishrane, jer se u kontrolisanim uslovima, mineralni sastav može poboljšati (Köhler i sar., 2019).

Na Slici 33 prikazan je uticaj uslova gajenja na sadržaj minerala. Na osnovu rezultata ANN modela, može se uočiti da je supstrat M imao pozitivan uticaj na sadržaj Ca, Mg i P u periodu od 60 i 67 dana gajenja. Kupus i seme lana su prirodno bogati sadržajem Ca, Mg i P pa je verovatno usled ishrane ovim supstratom, povećan i sadržaj ovih makro elementa u brašnu popaca (Septembre- Malaterre i sar., 2018). Na sadržaj Na pozitivan uticaj je imao supstrat K i 67 dana gajenja, dok su na sadržaj K pozitivno uticali supstrat M i S, što je u saglasnosti sa činjenicom da je najzastupljeniji mineral u šargarepi kalijum (Que i sar., 2019). Hunt i sar. (2001) su pokazali da

sirovine bogate Ca mogu da povećaju sadržaj Ca u brašnu insekata, ali samo do određenog sadržaja. Istraživanja su pokazala da popci nisu u stanju da usvajaju velike količine minerala i da je zbog toga neophodno da se optimizuje količina minerala u supstratu koja bi bila u skladu sa njihovim potrebama (Pastell i sar., 2021). Makro i mikro minerali imaju veliki uticaj na normalan razvoj i fiziološke funkcije ljudi i životinja i zbog toga se unose kroz hranu kako bi se zadovoljila njihova potreba za ovim mineralima (Alonso i sar., 2001).



Slika 33. Relativni uticaj (%) supstrata i vremena gajenja u brašnu popaca na sadržaj minerala: **a)** Ca; **b)** K; **c)** Mg; **d)** Na; **e)** P

5.9 Masnokiselinski sastav brašna crva brašnara i super crva

Sadržaj masnih kiselina u brašnu crva brašnara i super crva prikazan je u Tabeli 6. Bez obzira na uslove gajenja, brašno super crva sadržalo je veću količinu zasićenih masnih kiselina (SFA) i manji sadržaj mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) u poređenju sa brašnom crva brašnara. Sadržaj SFA u brašnu super crva se kretao u intervalu od 21,8 do 26,3% dok je u brašnu super crva utvrđen udeo između 34,9 do 43,4%. U obe vrste brašna, najzastupljenija SFA masna kiselina je palmitinska, C16:0. Udeo palmitinske kiseline se kretao od 16,2 do 18,9% u brašnu crva brašnara, dok se veća količina nalazila u brašnu super crva i to od 26,0 do 32,8 g/100g. Sadržaj MUFA kiselina varirao je između 41,0 do 49,6% u brašnu crva brašnara, dok je nešto niži sadržaj utvrđen u brašnu super crva (30,9 do 34,2%). Oleinska kiselina, C18:1n9c je najzastupljenija MUFA kiselina, čiji se sadržaj kretao od 40,3 do 48,7% u brašnu crva brašnara i nešto je niži u brašnu super crva, od 28,6 do 30,7%.

Sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) je varirao u vrednostima između 24,1 i 36,9% u obe vrste brašna. Razlike u sadržaju masnih kiselina, mogu biti uzrokovane vrstom i fiziološkom zrelošću insekata, kao i vrstom supstrata (Paul i sar., 2017). Bez obzira na vrstu insekta i vreme gajenja, najveći sadržaj PUFA kiselina je ustanovljen u slučaju kada su larve bile hranjene semenom lana. U oba brašna, najzastupljenija kiselina u okviru PUFA masnih kiselina je linolna (C18:2n6c), čije su se vrednosti kretale od 18,1 do 25,6%. Prikazani rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima Ravzanaadii i sar. (2012) i Tzompa-Sosa i sar. (2014).

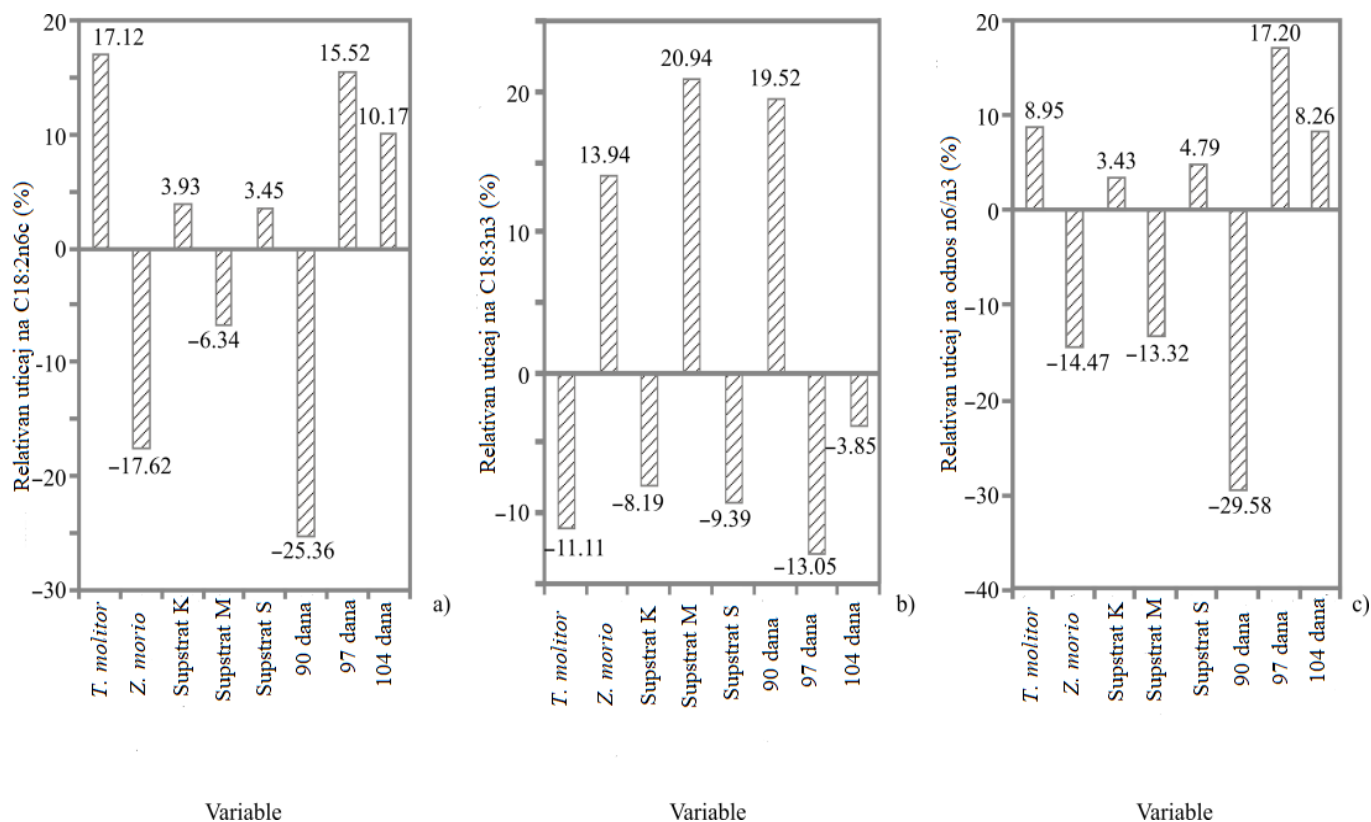
Tabela 6. Masnokiselinski sastav brašna od insekata

Tip insekta	Sustrat	Vreme	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C20:0	C18:3n3	C20:1	SFA	MUF A	PUF A	n6/n3
TM	M	1	0,00	0,00	0,20	2,00	0,10	16,20	0,60	1,40	0,00	3,00	40,30	25,60	0,00	10,50	0,00	22,94	40,96	36,10	2,44
TM	K	1	0,00	0,00	0,30	2,10	0,10	18,80	0,80	1,60	0,00	2,90	46,70	25,40	0,00	1,40	0,00	25,70	47,42	26,80	18,14
TM	S	1	0,00	0,00	0,30	2,80	0,10	18,20	0,90	1,70	0,00	3,10	47,70	24,20	0,00	0,90	0,00	26,19	48,65	25,16	26,89
TM	M	2	0,00	0,00	0,20	2,10	0,10	15,50	0,60	1,60	0,00	2,50	41,00	23,60	0,00	12,90	0,00	21,88	41,56	36,56	1,83
TM	K	2	0,00	0,00	0,30	2,20	0,10	18,20	0,70	1,80	0,00	2,30	48,70	24,50	0,00	1,20	0,00	24,89	49,39	25,72	20,42
TM	S	2	0,00	0,00	0,30	2,50	0,10	18,60	0,80	1,90	0,00	2,60	47,10	24,80	0,00	1,10	0,00	26,10	47,99	25,91	22,55
TM	M	3	0,00	0,00	0,20	2,20	0,10	15,30	0,70	1,50	0,00	2,50	40,60	23,00	0,00	13,90	0,00	21,83	41,30	36,86	1,65
TM	K	3	0,00	0,00	0,30	2,40	0,20	18,30	0,70	2,00	0,00	2,90	46,80	25,40	0,00	1,10	0,00	26,03	47,50	26,47	23,09
TM	S	3	0,00	0,00	0,30	2,70	0,20	18,90	0,90	2,00	0,00	2,20	48,60	23,10	0,00	1,00	0,00	26,32	49,58	24,10	23,10
ZM	M	1	0,61	0,07	0,05	1,17	0,27	25,98	2,77	0,69	0,46	5,82	30,64	18,14	0,21	13,11	0,00	34,88	33,87	31,25	1,38
ZM	K	1	0,54	0,09	0,06	1,19	0,32	30,41	2,38	0,91	0,52	7,67	28,69	25,48	0,21	1,52	0,00	41,40	31,60	27,00	16,72
ZM	S	1	0,63	0,10	0,06	1,28	0,29	31,63	2,43	0,83	0,50	7,32	29,04	24,56	0,19	1,14	0,00	42,33	31,96	25,71	21,45
ZM	M	2	0,66	0,08	0,06	1,24	0,27	26,06	2,99	0,73	0,47	5,67	30,63	18,06	0,22	12,86	0,00	34,99	34,09	30,92	1,40
ZM	K	2	0,62	0,09	0,07	1,29	0,35	31,04	2,68	0,92	0,57	7,12	28,70	24,87	0,20	1,49	0,00	41,70	31,95	26,35	16,73
ZM	S	2	0,61	0,09	0,06	1,40	0,32	32,82	2,63	0,86	0,48	6,91	29,44	23,12	0,17	1,10	0,00	43,24	32,54	24,22	21,09
ZM	M	3	0,63	0,08	0,05	1,29	0,29	26,61	3,00	0,82	0,51	5,83	30,71	18,18	0,21	11,80	0,00	35,81	34,22	29,97	1,54
ZM	K	3	0,67	0,10	0,08	1,41	0,40	31,09	3,00	1,02	0,68	6,50	28,64	23,92	0,19	2,32	0,00	41,45	32,32	26,24	10,33
ZM	S	3	0,72	0,11	0,06	1,40	0,30	32,60	0,80	0,90	0,51	7,20	29,60	24,30	0,15	1,30	0,00	43,44	30,91	25,60	18,69
AD	M	1	0,00	0,00	0,05	0,26	0,07	14,18	0,94	0,26	0,20	6,90	21,14	25,21	0,37	30,43	0,00	22,09	22,27	55,63	0,83
AD	K	1	0,00	0,00	0,06	0,50	0,13	26,60	1,50	0,30	0,60	7,80	22,80	37,40	0,22	1,70	0,39	35,61	25,29	39,10	22,00
AD	S	1	0,00	0,00	0,08	0,44	0,09	26,21	1,52	0,25	0,22	8,12	20,69	39,98	0,30	1,80	0,28	35,50	22,72	41,78	22,17
AD	M	2	0,00	0,00	0,05	0,32	0,06	15,26	0,50	0,22	0,14	4,86	22,02	23,55	0,27	32,75	0,00	21,03	22,67	56,31	0,72
AD	K	2	0,00	0,00	0,07	0,39	0,09	22,91	1,48	0,25	0,26	7,82	20,84	39,24	0,30	6,03	0,32	31,84	22,90	45,26	6,51
AD	S	2	0,00	0,00	0,09	0,43	0,12	25,40	1,50	0,20	0,50	7,80	19,60	41,70	0,30	1,90	0,30	34,34	21,90	43,60	21,95
AD	M	3	0,00	0,00	0,04	0,28	0,06	15,18	0,96	0,20	0,14	5,41	22,46	24,01	0,28	30,97	0,00	21,45	23,57	54,98	0,78
AD	K	3	0,00	0,00	0,10	0,50	0,09	27,21	1,67	0,24	0,08	7,33	23,37	37,09	0,23	1,77	0,31	35,70	25,43	38,86	20,96
AD	S	3	0,00	0,00	0,07	0,53	0,10	27,21	1,58	0,26	0,26	7,21	23,94	36,07	0,26	2,19	0,32	35,64	26,10	38,27	16,45

Rezultati predstavljaju srednju vrednost merenja (n=2) i izraženi su % na ukupne masne kiseline, TM - *Tenebrio molitor*; ZM - *Zophobas morio*; AD - *Acheta domestica*; * Vreme gajenje 1, 2 i 3 predstavlja 90, 97 i 104 dana; 1*, 2* i 3* predstavlja 60, 67 i 74 dana; M - miks koji se sastojao od šargarepe, kupusa i semena lana; K - kupus; S - šargarepa

Na sadržaj linolenske kiseline, C18:3n3, u najznačajnijoj meri je uticao supstrat kojim su larve hranjene. Larve koje su hranjene semenom lana, sadržale su 10 puta veću količinu C18:3n3 kiseline, dok je odnos n6/n3 za većinu uzoraka bio ispod 2, što se smatra za poželjne vrednosti u ljudskoj ishrani (Kralik i sar., 2008; Spasevski i sar., 2016). Vrednosti koje su dobili Sánchez-Muros i sar. (2014) i Boulous i sar. (2020), a koje su se odnosile na sadržaj esencijalnih masnih kiselina, su bile manje u odnosu na prikazane rezultate. Dalja istraživanja koja su sproveli Oonincx i sar. (2015), u kojima su u ishrani insekata korišteni sporedni proizvodi i otpad iz prehrambene industrije, nisu dovela do značajnog povećanja C18:3n3 kiseline, kao i smanjenu odnosa n6/n3. Upotrebom semena ili ulja lana u ishrani insekata u mnogome se može povećati sadržaj esencijalne linolenske kiseline u brašnu insekata, što potvrđuju i Volek i sar. (2021). Ishranom *Hermetia illucens* koja je uključivala 1% ulja semena lana, došlo je do smanjenja odnosa n6/n3 sa 18 na 3, dok je dodatak od 2% semena lana smanjilo isti odnos sa 22 na 4 (Oonincx i sar., 2019). Takođe, ishrana obogaćena ribljim uljem, koje je takođe poznato kao bogat izvor C18:3n3 može da utiče na sadržaj ove kiseline u gotovom brašnu insekata (St-Hilaire i Cranfill, 2007). Ovakva istraživanja ukazuju na to da se obogaćivanjem supstrata za ishranu insekata, koji su prirodno bogati C18:3n3 kiselinom, doprinosi povećanju sadržaja ove esencijalne kiseline u brašnu od insekata.

Na Slici 34 prikazan je relativan uticaj vrste insekata i uslova gajenja na sadržaj esencijalnih masnih kiselina, linolnu, C18:2n6c, linolensku C18:3n3, kao i na njihov odnos. Pozitivan uticaj na sadržaj C18:2n6c je ustanovljen kod crva brašnara hranjenog supstratom K i S tokom 97 i 104 dana gajenja. Na sadržaj C18:3n3, kao i na odnos n6/n3 najveći pozitivan uticaj je utvrđen kod super crva hranjenog supstratom M u periodu od 90 dana. Rezultati dobijeni pomoću ANN modela su takođe u saglasnosti sa prethodnim studijama, koja govore da supstrat obogaćen prirodnim izvorima C18:3n3 može poboljšati sadržaj ove kiseline u brašnu od insekata (Finke, 2002; St-Hilaire i Cranfill, 2007; Oonincx i sar., 2019).



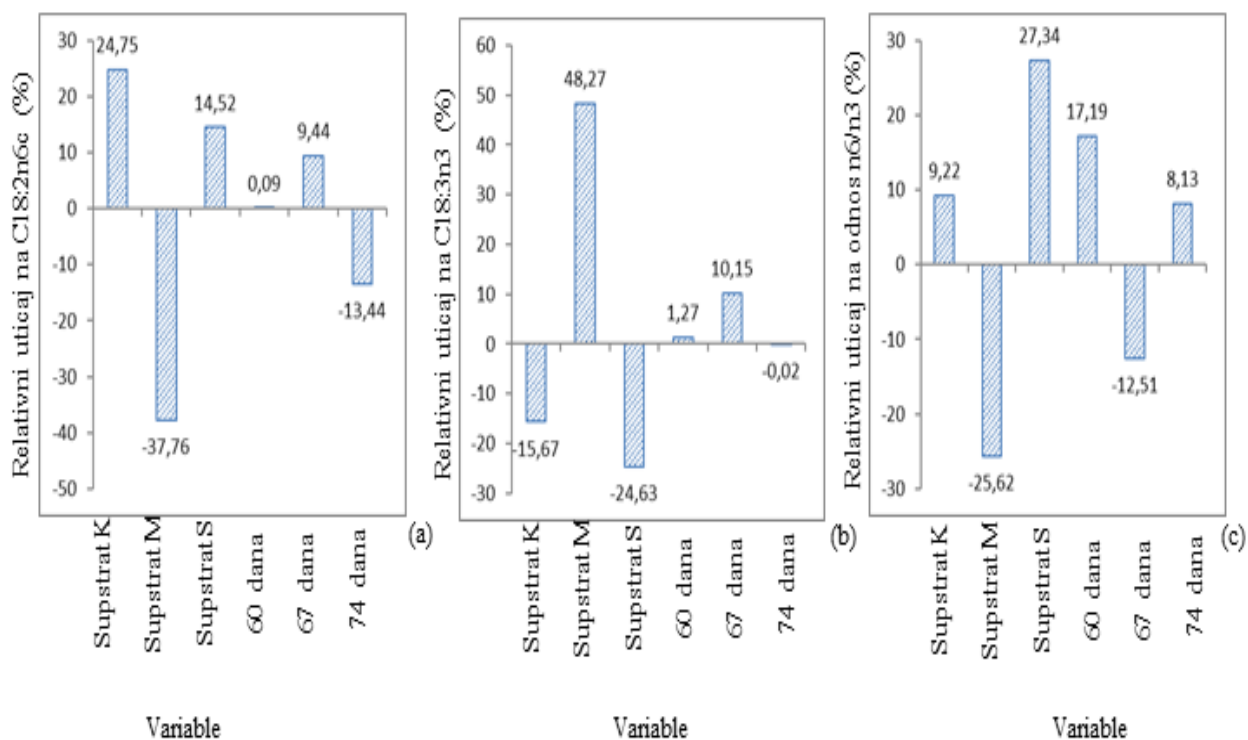
Slika 34. Relativni uticaj (%) vrste insekta (*T. molitor* i *Z. morio*), supstrata (K-kupusa, M-miksa kupusa, šargarepe i semena lana i S-šargarepe), vremena gajenja (90,97 i 104 dana) na: a) sadržaj C18:2n6c; b) sadržaj C18:3n3; c) n6/n3 odnos

5.10 Masnokiselinski sastav brašna popaca

Sadržaj masnih kiselina u brašnu popaca prikazan je u Tabeli 6. Najzastupljenija grupa masnih kiselina u brašnu popaca su PUFA masne kiseline, sa sadržajem od 38,27 do 56,31%. Nakon njih, slede MUFA kiseline u intervalu od 21,90 do 26,10% i SFA kiseline od 21,03 do 35,64%. Ovakav sastav masnih kiselina čini ulje od popaca visokokvalitetnim, jer sve esencijalne masne kiseline pripadaju PUFA masnim kiselinama. U poređenju sa brašnom crva brašnara i super crva, brašno popaca sadrži veći procenat PUFA i manji procenat MUFA u odnosu na oba brašna. Vrednosti za SFA su manje u odnosu na brašno super crva i nešto više u odnosu na brašno crva brašnara. Sadržaj SFA u istraživanjima sprovedenim od strane Udomsil i sar. (2019) je bio veći, dok je sadržaj PUFA bio manji u poređenju sa dobijenim rezultatima. Ovo još jednom potvrđuje

pretpostavke da je masnokiselinski sastav insekata u mnogome uslovljen spoljašnjim faktorima i ishranom insekata (Ghosh i sar., 2017)

Najveći sadržaj iz grupe SFA masnih kiselina imala je palmitinska kiselina i to u vrednostima od 14,8 do 27,21%, koje su slične vrednostima u crvu brašnar i niže u odnosu na brašno super crva. Iz grupe MUFA masnih kiselina, najzastupljenija masna kiselina je i u ovom slučaju oleinska kiselina sa sadržajem od 19,60 do 23,94%. Ove vrednosti su nešto niže u poređenju sa druge dve vrste brašna. Iz grupe PUFA masnih kiselina, vrednosti za linolnu kiselinu, C18:2n6c, kretale su se od 23,55 do 41,70%, dok je sadržaj linolenske kiseline C18:3n3 u mnogome zavisio od vrste supstrata koji je korišten u ishrani popaca. U uzorcima brašna, gde je u ishrani larvi korišteno seme lana, došlo je do povećanja sadržaja C18:3n3 čak i do 30 puta, dok se odnos n6/n3 smanjio na vrednosti ispod 1. Dobijene vrednosti su bile veće u odnosu na rezultate dobijene u istraživanjima Oonincx i sar. (2019), gde je zaključeno da se upotrebom lanenog ulja sadržaj C18:3n3 povećao za 10-20 puta u brašnu popaca. U poslednjih pet decenija, odnos n6/n3 se u mnogome poremetio, jer su se za potrebe životinjske ishrane najčešće koristile žitarice bogate C18:2n6c masnim kiselinama (Spasevski, 2018). Sa druge strane, disbalans u ovom odnosu u ishrani čoveka dovodi do niza zdravstvenih problema koji su povezani sa srčanim bolestima, raznim upalama, pa čak i do razvića težih oboljenja poput kancera (Simopoulos i sar., 2009). Stoga, jedno od rešenja za budućnost bi mogla da bude upotreba punomasnog brašna od insekata ili ulja insekata dobijenog ekstrakcijom, koje bi moglo da poboljša masno kiselinski sastav proizvoda animalnog porekla, poput jaja.



Slika 35. Relativni uticaj (%) supstrata (K-kupusa, M-miksa kupusa, šargarepe i semena lana i S-šargarepe), vremena gajenja (90,97 i 104 dana) na: a) sadržaj C18:2n6c; b) sadržaj C18:3n3; c) n6/n3 odnos u brašnu od popaca

ANN model je ukazuje da je pozitivan uticaj na sadržaj C18:3n3 u brašnu popaca imao supstrat M u periodu od 67 dana. Dok su supstrat K i S pozitivno uticali na sadržaj C18:2n6c u brašnu popaca u periodu od 60 i 74 dana gajenja (Slika 35).

5.11 Optimizacija uslova gajenja insekata

U Tabeli 7 i 8 prikazani su optimalni parametri dobijeni pomoću MOO optimizacije. Vrednosti su dobijene korišćenjem programa Matlab. Broj generacija u okviru MOO optimizacije dostigao je 873 jedinki, dok je veličina populacije bila postavljena na 100 jedinki za svaku ulaznu promenljivu. Broj tačaka na Pareto frontu bio je 34. Rezultati višeciljne optimizacije su pokazali da je optimalan sastav brašna od larvi insekata dobijen u slučaju kada je super crv hranjen sa mešavinom kupusa, šargarepe i semena lana u periodu od 104 dana gajenja. Dok je optimalno brašno od popaca dobijeno u slučaju kada su popci hranjeni sa mešavinom kupusa, šargarepe i semena lana u periodu od 60 dana gajenja

Tabela 7. Parametri dobijeni višeciljnom MOO optimizacijom brašna crva brašnara i super crva

	Hemijski sastav (%)	Amino kiseline (%)	Minerali (mg/100g)			Masne kiseline (%)	
Prinos (g)	302,40	Treonin	3,78	Ca	24,89	C18:2n6c	25,60
Proteini	52,03	Valin	5,43	K	786,33	C18:3n3	10,50
Mast	33,53	Metionin	1,54	Mg	277,14	Odnos n6/n3	2,44
Pepeo	4,91	Izoleucin	5,12	Na	181,96		
Sirova vlakna	6,72	Leucin	5,70	P	915,80		
S. proteina	85,06	Tirozin	8,68				
		Fenilalanin	4,04				
		Histidin	3,64				
		Lizin	5,42				

Tabela 8. Parametri dobijeni višeciljnom MOO optimizacijom brašna od popaca

Hemijski sastav		Amino kiseline (%)		Minerali (mg/100g)		Masne kiseline (%)	
Prinos (g)	241,50	Treonin	3,35	Ca	98,21	C18:2n6c	25,20
Proteini (%)	71,37	Valin	4,47	K	1006,59	C18:3n3	30,43
Mast (%)	17,28	Metionin	1,73	Mg	117,99	n6/n3	0,83
Pepeo (%)	4,58	Izoleucin	4,14	Na	495,18		
Sirova vlakna (%)	11,24	Leucin	5,11	P	993,35		
Svarljivost proteina	80,37	Tirozin	5,51				
		Fenilalanin	3,10				
		Histidin	2,70				
		Lizin	5,00				

5.12 Mikrobiološke analize brašna od insekata

U Tabeli 9 su prikazani rezultati mikrobioloških ispitivanja brašna crva brašnara, super crva i popca. Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da sve tri vrste brašna odgovaraju Pravilniku o kvalitetu hrane za životinje („Sl. glasnik RS”, br. 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017). Dobijeni rezultati ukazuju na mikrobiološku ispravnost sve tri vrste brašna i pogodnost za dalju upotrebu u ishrani životinja, bez obzira na starosnu dob životinje.

Inaktivacija larvi ima veliki uticaj na mikrobiološko stanje brašna od larvi. U poslednje vreme u radovima se najčešće pominje tehnika inaktivacije zamrzavanjem, iako je poprilično skupa i energetski neefikasna (Leni i sar., 2019). Istraživanja su pokazala da zamrzavanjem larvi ne dolazi do sprečavanja delovanja štetnih enzima poput lipaze, dolazi do pojave „tamnjenja“ brašna i da ovaj proces ima negativan uticaj na hemijske i fizičke karakteristike proteina (Caligiani, 2019). Takođe, zamrzavanje je vrlo neefikasno u pogledu smanjenja rasta mikroorganizama, jer na većinu ne utiče ni inhibitorno ni letalno. U istraživanjima Larouche i sar. (2019) pokazano je da ovom metodom nije došlo do značajnog smanjenja rasta *Pseudomonas* spp, kvasaca i plesni, *Clostridia* i enterobakterija, dok u 25 g nije pronađeno *Sallmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*.

Tabela 9. Mikrobiološka ispravnost brašna od insekata

Vrsta brašna	Ukupan br. m.o. (cfu/g)	Koagulaza pozitivne stafiloške (cfu/g)	<i>Clostridium perfringens</i> (cfu/g)	<i>Sallmonella</i> spp. u 50g	Kvasci i plesni (cfu/g)
<i>Tenebrio molitor</i>	150	<100	<10	nije nađeno	<100
<i>Zophobas morio</i>	130	<100	<10	nije nađeno	<100
<i>Acheta domesticus</i>	120	<100	<10	nije nađeno	<100

Preporuka *European Food Safety Agency* i *Canadian Food Inspection Agency* je da se u toku proizvodnje brašna od insekata uključe i termički tretmani kako bi se mikrobiološko stanje brašna dovelo do prihvatljivog i bezbednog nivoa za ljudsku i životinjsku upotrebu (EFSA, 2015; CFIA, 2018). Osim metode zamrzavanja i inaktivacije ključalom vodom, u cilju inaktivacije insekata mogu da se koriste i druge metode poput nekih mehničkih metoda i inaktivacije u struji CO₂ i N₂. Metoda inaktivacije larvi u ključaloj vodi se pokazala kao najpogodnija za inaktivaciju insekata, jer obezbeđuje mikrobiološku stabilnost brašna, inaktivira enzim lipazu, brza je i ne utiče značajno na stabilnost i na nutritivni sastav brašna (Caligiani i sar., 2019; Larouche i sar., 2019). S druge strane, tokom procesa prerade važno je sagledati i tehnološki i ekonomski aspekt, pa potom doneti odluku koja je metoda u datom slučaju najoptimalnija (Đuragić i sar., 2017).

5.13 Izolacija i karakterizacija proteina insekata

U poslednjih nekoliko godina, brašno od insekata je prepoznato kao proteinska sirovina koja ima veliki potencijal u ishrani ljudi i životinja. S tim u vezi, veliki broj istraživanja je fokusiran na omasovljavanje uzgoja insekta. Međutim, veoma malo istraživanja je sprovedeno na temu tehnofunkcionalnih i bioloških svojstava proteina izolovanih iz insekata. Ovakva istraživanja su neophodna kako bi industrija hrane za životinje i prehrambena industrija dobila više informacija o proteinima i načinu kako bi pojedini tehnološki procesi i skladištenje uticali na njih (Adebiyi i Aluko, 2011). Iz tog razloga, deo istraživanja je bio usmeren i na, izolaciju proteina iz brašna insekata i njihovu karakterizaciju.

5.13.1 Hemijski sastav brašna od insekata

Proteini iz brašna crva brašnara, super crva i popaca su izolovani alkalnom ekstrakcijom. U Tabeli 10 prikazan je hemijski sastav brašna iz kojih su izolovani proteini.

Tabela 10. Hemijski sastav brašna od različite vrste insekata

Vrsta brašna	Proteini (%)	Mast (%)	Pepeo (%)	Sirova vlakna (%)
<i>Tenebrio molitor</i>	48,94±0,05 ^a	31,87±0,09 ^a	5,02±0,23 ^a	6,17±0,49 ^a
<i>Zophobas morio</i>	47,29±0,04 ^a	33,69±0,09 ^a	3,76±0,05 ^b	5,95±0,03 ^a
<i>Acheta domesticus</i>	64,10±0,06 ^b	23,27±0,26 ^b	4,56±0,06 ^{ab}	10,15±0,32 ^b

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3) i prikazani su na suhu materiju, različita brašna sa različitim slovima u koloni ukazuju na statistički značajnu razliku (p < 0,05)

Najveći sadržaj proteina utvrđen je u brašnu popaca (64,10%), dok je sadržaj proteina u brašnu crva brašnara (48,94%) i super crva (47,29%) bio približno jednak. Najveći sadržaj masti je utvrđen u brašnu super crva (33,69%), dok brašno od popaca sadrži najmanji procenat masti (23,27%). Sadržaj pepela se statistički značajno razlikuje u brašnu crva brašnara i super crva. Sadržaj sirovih vlakana u brašnu crva brašnara i super crva se statistički značajno ne razlikuje dok se od oba značajno razlikuje sadržaj u brašnu popaca (10,15%). Sadržaj proteina u brašnu od insekata može da se poredi sa sadržajem proteina u različitim vrstama uljanih pogača, poput sojine i bundevine (Popović i sar., 2011; Čakarević i sar., 2019). Imajući u vidu da uljane pogače sadrže manju količinu ulja u odnosu na punomasno brašno od insekata, treba istaći da se

obezmašćivanjem brašna od insekta može dobiti veći sadržaj proteina, tako da se ovaj proizvod može koristiti kao visokoproteinsko brašno od insekata. U istraživanjima Bubler i sar. (2016) obezmašćivanjem brašna *T. Molitor* i *H. Illucens* povećan je sadržaj proteina od 7-10%. Obezmašćenjem brašna insekata se osim dobijanja uljane frakcije poboljšavaju i određene funkcionalne karakteristike proteina (L'Hocine i sar, 2006; Lee i sar., 2016). Za obezmašćivanje brašna od insekata, poput brašna crva brašnara najčešće se koristi heksan i metanol, a u poslednje vreme i superkritična ekstrakcija (Yi i sar., 2016; Zhao i sar., 2016).

Zahvaljujući hemijskom sastavu i dodatnom obezmašćivanju punomasnog brašna od insekata, sva tri brašna imaju veliki potencijal kao sirovina za dobijanje proteinskih proizvoda poput visokoproteinskog brašna u ishrani životinja, kao i proteinskih izolata i koncentrata u prehrambenoj industriji.

5.13.2 Modifikacija uslova alkalne ekstrakcije

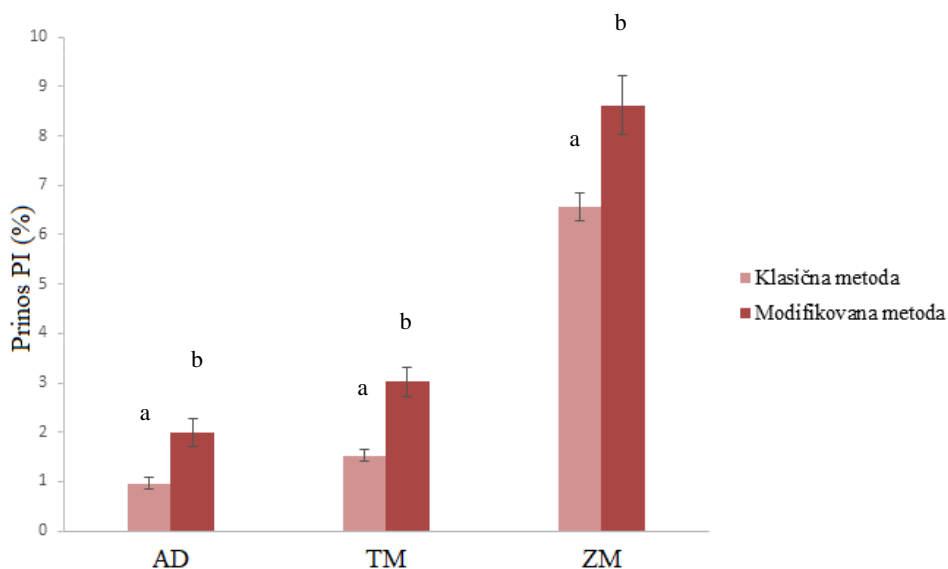
PI insekata, dobijeni su modifikacijom uslova alkalne ekstrakcije opisane u literaturi Azagoh i sar (2016) i Mshayisa i sar. (2022). Modifikacija je podrazumevala:

- promenu pH vrednosti na kojima se izvodi ekstrakcije i precipitacije,
- ponovljena ekstrakcija proteina u cilju dobijanja čistijeg izolata proteina.

Promena pH vrednosti na kojima se izvodi ekstrakcija i precipitacije proteina

Primenom klasične metode ekstrakcije i precipitacije, najmanji prinos PI dobijen je iz brašna popca (1,04%), dok je najveći prinos ustanovljen u brašnu super crva (6,75%). U odnosu na prinose PI iz drugih sirovina poput uljanih pogača, može se zaključiti da je prinos PI iz insekata manji (Čakarević, 2021). Pretpostavka može da bude u tome da je tokom viših temperatura u toku inaktivacije i sušenja larvi insekata došlo do delimične denaturacije i strukturne promene proteina, pa da je stoga i prinos PI manji (Preece i sar., 2017). Takođe, tokom inaktivacije insekata na višim temperaturama može da dođe i do promene u funkcionalnim osobinama proteina (Leni i sar., 2019). U cilju poboljšanja prinosa PI iz brašna insekata mogu da se koriste različite tehnike u toku ekstrakcije poput ultrazvuka i mikrotalasa. Međutim, pojedina istraživanja su pokazala da upotrebom ultrazvuka tokom ekstrakcije, nije značajno došlo do poboljšanja prinosa PI (Tzompa-Sosa i sar., 2014).

Modifikacija alkalne ekstrakcije, koja je podrazumevala promenu pH vrednosti tokom ekstrakcije i precipitacije, dovela je do povećanja prinosa PI u svim uzorcima (Slika 36). Na osnovu krive rastvorljivosti, odabrane su sledeće pH vrednosti: za ekstrakciju proteina pH 11, a za precipitaciju pH 4. U slučaju brašna popaca prinos je povećan za 47,27%, u slučaju brašna crva brašnara za 50%, dok je za brašno super crva prinos povećan za 74,67%. U toku postupka dobijanja PI, podešavanje adekvatnih pH vredosti tokom ekstrakcije i precipitacije proteina je veoma važno. U zavisnosti od vrste insekta u prehrambenoj industriji se za ekstrakciju proteina najčešće koriste vodeni rastvori, kojima se pH vrednosti menjaju od 8-10 za proces ekstrakcije, dok se za precipitaciju proteina pH vrednosti podešavaju u opsegu od 4-5 (Zhao i sar., 2016; Mishyna i sar., 2021).

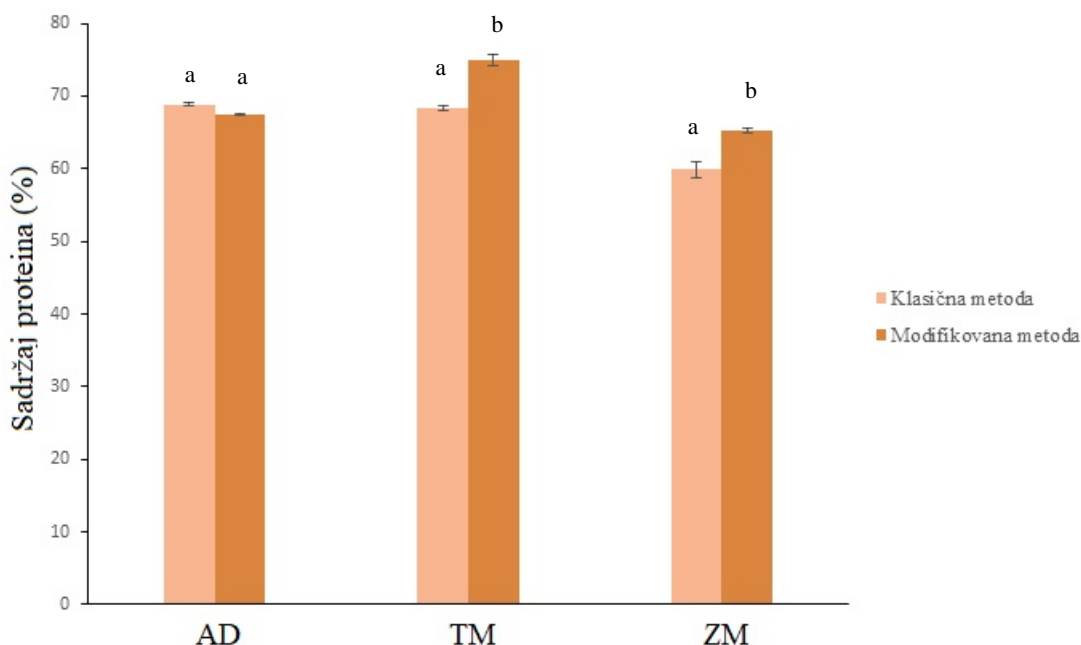


Slika 36. Dobijeni prinos proteinskog izolata (PI) iz brašna AD (*Acheta domesticus*), TM (*Tenebrio molitor*) i ZM (*Zophobas morio*) klasičnom i modifikovanom metodom alkalne ekstrakcije, različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da pH vrednost ima uticaj na prinos dobijenog PI iz brašna insekata i da se optimalnim podešavanjem pH vrednosti, prinosi PI mogu povećati za 50-70%. Optimalne vrednosti u slučaju izolacije proteina iz brašna popaca, super crva i crva brašnara, pH vrednosti ekstrakcije i precipitacije proteina iznose 11 i 4, respektivno.

Prečišćavanje proteina

Nakon optimizacije pH vrednosti ekstrakcije i precipitacije, drugi deo modifikacije uslova alkalne ekstrakcije je bilo prečišćavanje dobijenog taloga. Nakon taloženja proteina, PI je još jednom rastvoren, profiltriran, a potom opet istaložen, tako da se što više uklone potencijalne nečistoće i da se dobije što veći sadržaj proteina. Na Slici 37 prikazan je sadržaj proteina u PI insektima pre i nakon prečišćavanja taloga.



Slika 37. Sadržaj proteina u PI dobijenim iz brašna AD (*Acheta domesticus*), TM (*Tenebrio molitor*) i ZM (*Zophobas morio*) klasičnom i modifikovanim metodom alkalne ekstrakcije, različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)

Sadržaj proteina u posmatrnim PI insekata kretao se u vrednostima od 59,85 do 68,88%. Procesom prečišćavanja PI u svim uzorcima, izuzev PI popaca, povećan je sadržaj proteina. Tako da se modifikacijom klasične metode sadržaj proteina povećao za 6,6% u slučaju PI crva brašnara (74,98%), za 5,4% u slučaju PI super crva (65,29%), dok je u slučaju PI popaca sadržaj proteina ostao nepromenjen (68,88%). Dobijeni rezultati su bili veći od prethodno objavljenih. Rumpold i Schlüter su objavili da je sadržaj proteina u PI popaca iznosio oko 55-65%, dok je u PI crva brašnara pronađeno između 47 i 60% proteina (Rumpold i Schlüter, 2013).

U poređenju sa sadržajem proteina PI nekog biljnog izvora poput graška, sočiva i leblebija, dobijeni sadržaj proteina insekata je sličan ili veći u odnosu na sočivo i leblebiju, dok je nešto manji u odnosu na grašak (Boye i sar., 2010; Stone i sar., 2015).

Dobijeni sadržaj proteina u PI insekata je verovatno nešto veći u odnosu na realan sadržaj, zbog prisustva hitina, hitozana ili prisustva uree i amonijaka (Weihrauch i sar., 2012). Sva ova jedinjenja u svojoj strukturi sadrže azot, koji se koristi tokom proračuna sirovih proteina, pa može da poveća ukupan sadržaj u odnosu na realan. U telu insekata, hitin se nalazi u kompleksnoj strukturalnoj vezi sa proteinima i mastima i ne nalazi se samostalno (Finke, 2007). Enzimski ili neki mehanički predtretmani bi u budućnosti mogli da se koriste, kako bi se protein oslobodio od hitina i povećao prinos PI (Laroche i sar., 2019). Na ovaj način bi PI insekata mogli da postanu konkurenti ostalim proteinskim proizvodima u prehrambenoj industriji.

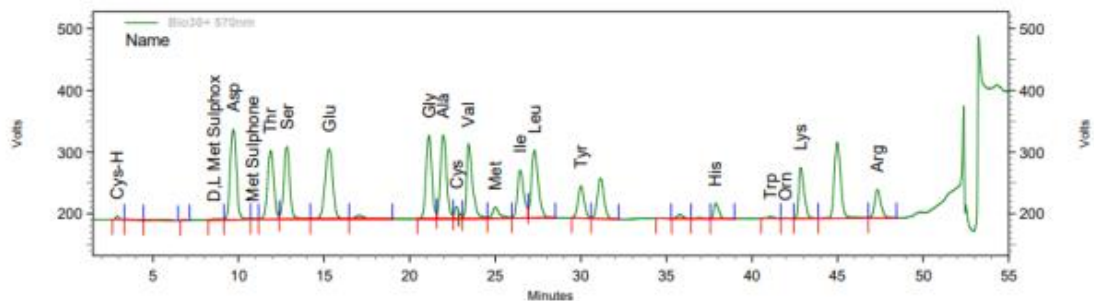
5.13.3 Karakterizacija PI insekata

5.13.3.1 Aminokiselinski sastav PI insekata

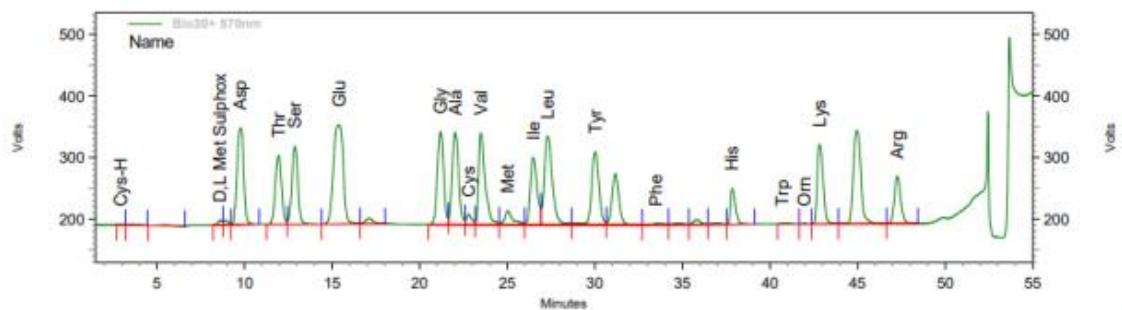
Aminokiselinski sastav je veoma važan u ishrani ljudi i životinja. U prehrambenoj i industriji hrane za životinje aminokiselinski sastav je pokazatelj kvaliteta proteina. Jedan od najznačajnijih parametara je svakako sadržaj esencijalnih aminokiselina (Đuragić i sar., 2021). Ove aminokiseline su od posebne važnosti, jer telo čoveka i životinja nije sposobno da ih sintetiše i zbog toga ih je neophodno nadomestiti unosom proteina, koji se pod dejstvom enzima razgrađuju, a potom oslobađaju (Džamić, 1990). Esencijalne aminokiseline služe kao prekursor ostalih vitalnih metabolita i po potrebi služe i kao izvor energije (Cabarello i sar., 2003). Sa druge strane, neesencijalne amino kiseline poput: glutamina, glutaminske kiseline, asparagina i glicina imaju ulogu neurotransmitera, a tirozin predstavlja prekursor hormona štitne žlezde tiroksina i trijodtironina (Cabarello i sar., 2003; Wu, 2013). Na osnovu svega navedenog, veoma važno je bilo da se ispita aminokiselinski sastav PI insekata, kako bi kvalitativno mogli da se uporede sa komercijalno dostupnim proteinskim proizvodima.

Na Slici 38 prikazani su hromatogrami dobijeni nakon analiziranja amino kiseline iz PI insekata. Nakon kisele hidrolize u 6M HCl dolazi do deamidacije asparagina i glutamina, što rezultira nastajanjem asparaginske i glutaminske kiseline, respektivno. Što znači da nakon analiziranja aminokiselina, dobijene vrednosti za asparaginsku kiselinu predstavlja zbir asparagin

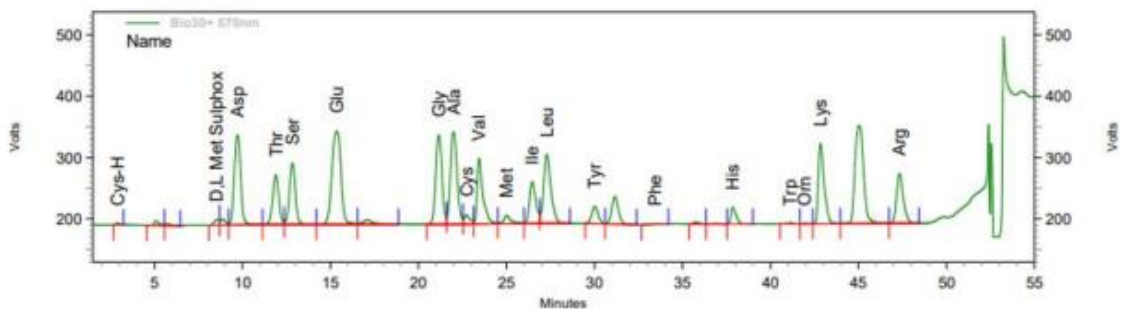
i asparaginske kiseline, a za glutaminsku zbir glutamina i glutaminske kiseline. Gubitak triptofana, asparagina i glutamina tokom kisele hidrolize ograničava kvantifikaciju aminokiselina na 17 aminokiselina. Kao što se može videti na Slici 38, sve amino kiseline u uzorcima su detektovane izuzev fenilalanina.



(a)



(b)



(c)

Slika 38. Hromatogrami dobijeni nakon razdvajanja aminokiselina jonoizmenjivačkom hromatografijom iz PI: a) crva brašnara; b) super crva; c) popaca

Najveći sadržaj aminokiselina pronađen je u izolatu super crva (76,55%), dok je najmanji sadržaj pronađen u izolatu popaca (44,80%) (Tabela 11). Najveći sadržaj esencijalnih aminokiselina je nađen u PI super crva (31,99%), dok je skoro duplo manje pronađeno u PI popaca (16,59%). Najzastupljenije neesencijalne amino kiseline su asparaginska i glutaminska u svim uzorcima, dok je tirozin najzastupljenija u PI super crva u odnosu na druga dva PI. Najzastupljenije esencijalne amino kiseline su valin, leucin, izoleucin i lizin u svim izolatima. Limitirajuća amino kiselina kao i u slučaju brašna od insekata je metionin. Međutim, za razliku od brašna insekata, fenilalanin nije detektovan ni u jednom uzorku. S obzirom na to da je u brašnu insekata detektovan fenilalanin, može se pretpostaviti da je alkalna ekstrakcija uticala na smanjenje količine fenilalanina. Uzimajući u obzir da većina autora tirozin i fenilalanin prikazuju kao zbir ove dve kiseline, zbog svojih sličnih strukturalnih i bioloških funkcija, dobijeni rezultati su bili veći u odnosu na prethodno objavljene (Rumpold and Schlüter, 2013; Yi et al., 2016; Myshina i sar., 2021).

U poređenju sa komercijalno dostupnim izolatima, proteini insekata su visokokvalitetni u pogledu aminokiselinskog sastava i njihova upotreba može u potpunosti da zadovolji potrebe za amino kiselinama u ljudskoj i ishrani nekih riba, poput lososa (Ducept i sar., 2016). Količina esencijalnih amino kiselina iz proteina crva brašnara i super crva se može porediti sa količinom ovih kiselina u proteinima soje, dok je sadržaj esencijalnih amino kiselina u kazeinu veći od sva tri posmatrana PI (Yi i sar., 2013). PI ovih insekata bi mogli u budućnosti da se koriste u suplementaciji ishrane ljudi i životinja. Poznato je da je ishrana na bazi kukuruza siromašna u sadržaju triptofana i lizina, suplementacijom PI iz super crva i popaca bi se umnogome poboljšao kvalitet ove ishrane (Cabarello i sar., 2003). Takođe, u ishrani životinja se kao proteinsko hranivo često koristi suncokretova sačma, koja je deficitarna u sadržaju lizina (Banjac, 2016). Dodatkom PI insekata bi se poboljšao sadržaj ove esencijalne amino kiseline. Međutim, treba imati u vidu da je metionin limitirajuća amino kiselina u sva tri PI, te bi zbog ovoga bilo neophodno da se doda sintetički metionin (Lević i sar., 2005).

Tabela 11. Aminokiselinski sastav PI insekata

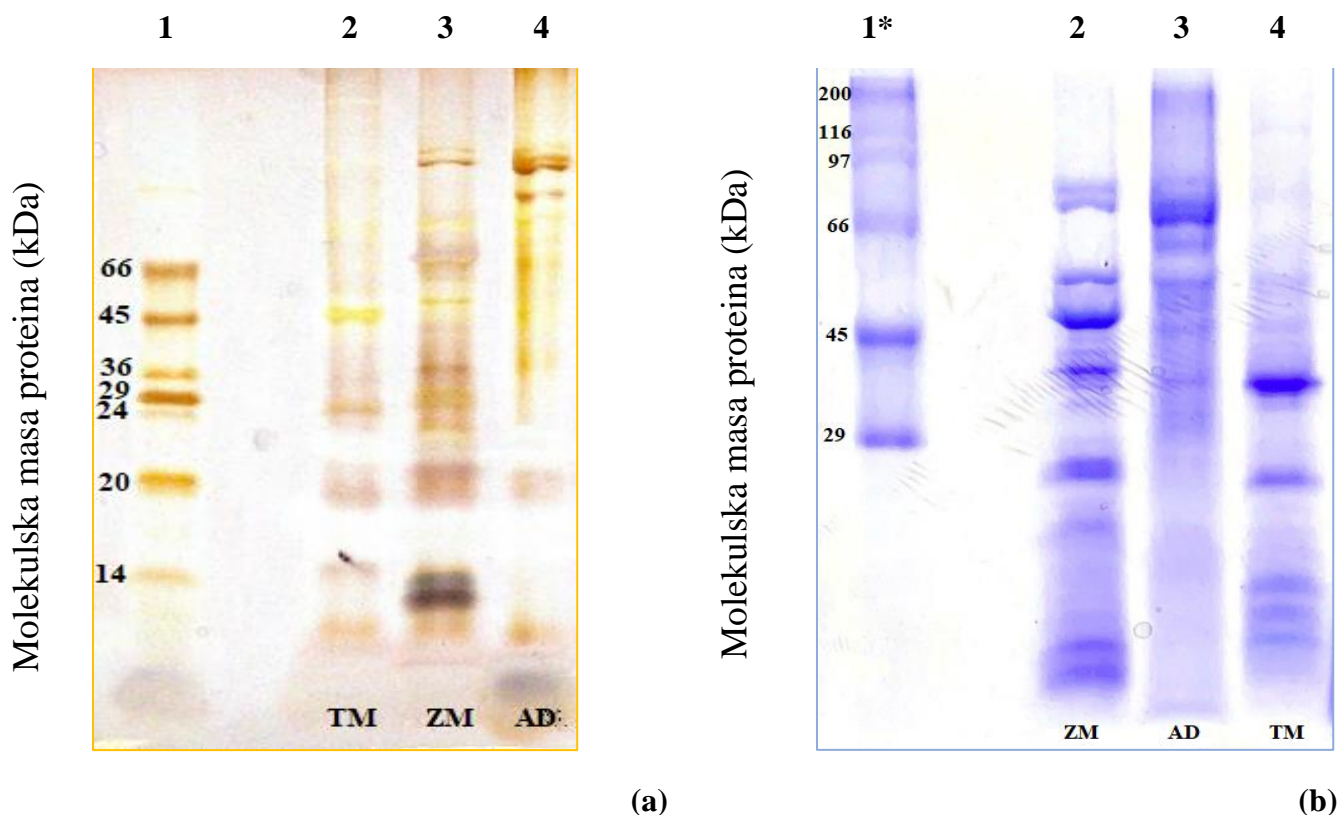
Na 100g proteina (%)	AD	TM	ZM
Neesencijalne	28,21	37,54	44,56
Asparaginska kis.	5,59	6,86	8,65
Tirozin	2,62	8,25	10,20
Arginin	4,09	4,34	5,44
Serin	2,05	3,29	3,51
Glutaminska kis	4,61	6,49	7,96
Prolin	2,83	0,07	0,24
Glicin	3,16	4,78	4,52
Alanin	3,13	3,33	3,88
Cistin	0,12	0,13	0,15
Esencijalne	16,59	23,24	31,99
Valin	2,64	4,36	5,61
Metionin	1,08	0,91	1,60
Izoleucin	2,39	4,15	5,44
Leucin	3,23	5,25	6,45
Treonin	2,03	2,91	3,97
Fenilalanin	ND	ND	ND
Histidin	1,11	1,77	3,09
Lizin	4,11	3,88	5,83
Ukupne AK	44,80	60,78	76,55

*nd nije detektovana, AD (*Acheta domesticus*), TM (*Tenebrio molitor*) i ZM (*Zophobas morio*)

5.13.3.2 SDS gel elektroforeza

Razdvajanjem proteinskih frakcija pomoću SDS-gel elektroforeze rezultovalo je u formiranju traka ili podjedinica širokog opsega molekulskih masa (Slika 39). Kako je dobijeni opseg molekulskih masa bio širok, dva standarda su korišćena, kako bi mogli da se identifikuju i male (Slika 39(a)) i velike proteinske frakcije (Slika 39(b)).

Na liniji 1 mogu se uočiti raspored molekulskih masa od 14 do 66 kDa (Slika 39(a)) i od 29 do 200 kDa (Slika 39(b)). U svim uzorcima proteinskih izolata jasno se može uočiti traka ispod 14 kDa i oko 20 kDa. Dobijeni elektroforetski profil je sličan PI crva brašnara i super crva, dok se oba razlikuju od profila PI popaca. Ovo može da ima veze sa genetskim profilom insekata, jer crv brašnar i super crv pripadaju istoj familiji Tenebrionidae.



Slika 39. Elektroforetski profil proteinskih izolata crva brašnara, super crva i popca u opsegu od 14 do 66 kDa (a) i od 29 do 200 kDa (b)

U uzorku PI crva brašnara mogu se uočiti pet intenzivnih traka. Prva je ispod 14 kDa, druga oko 14 kDa, zatim oko 20 kDa, pa između 24 i 29 kDa, dok je peta oko 45 kDa. Proteini molekulske mase ispod 14 kDa mogu da predstavljaju hemolimfne proteine, koji imaju molekulsku masu oko 12 kDa (Graham i sar., 2001). Od miofibrilarnih proteini, miozin je najzastupljeniji u proteinskoj frakciji crva brašnara. U zavisnosti od vrste uzorka, molekule mase miozina se kreću za velike proteinske lance oko 205, 31 i 23 kDa, a za kraće lance 16 i 17,5 kDa (Prakash, 2006). S obzirom da je identifikovano da protein molekulske mase od 16,8 kDa predstavlja miozin u PI crva brašnara, može se pretpostaviti da traka oko 14 kDa upravo predstavlja ovaj protein (Yi i sar., 2016). Proteini molekulskih masa između 14 i 32 kDa su najverovatnije iz kutikule crva brašnara, poput himotripsina, čija je molekulska masa 24 kDa (Elpidina i sar., 2005). Proteini oko 45 kDa mogu biti povezani sa različitim enzimima poput melanizacioni inhibitornih enzima molekulske mase od 43 kDa (Yi i sar., 2013).

U uzorku PI super crva mogu se uočiti takođe 5 intenzivnih traka. Prva je oko 14 kDa, druga je na 20 kDa, treća je između 24 i 36 kDa, četvrta je između 45 i 66 kDa. Sa Slike Xa se može uočiti da su najtamnije trake bile ispod 14 kDa. Ovi proteini niskih molekulskih masa mogu da imaju niz bioloških funkcija poput antimikrobnih i antioksidativnih (Popović, 2012). Raspored molekulskih frakcija je veoma sličan sa rasporedom u PI crva brašnara. Jedina frakcija koja je pronađena u PI super crva, a da nije prisutna u PI crva brašnara, je u opsegu između 66 i 97 kDa.

Na Slici 39 se može uočiti da je u PI popaca pronađeno takođe pet traka, od kojih je najintenzivnija bila između 66 i 97 kDa. Slično kao i u PI crva brašnara i super crva, na elektroforetskom profilu mogu se uočiti dve trake ispod 14 kDa i jedna oko 20 kDa. Zatim traka između 36 i 49 kDa i između 66 i 97 kDa. Prema Lee i sar. (2000) molekulske mase, koje su veće od 95 kDa mogu da pripadaju proteinima vitelogenin. Ovi proteini su veoma važni za oogenezu u životnom stadijumu insekata (Herfelder i sar., 2000).

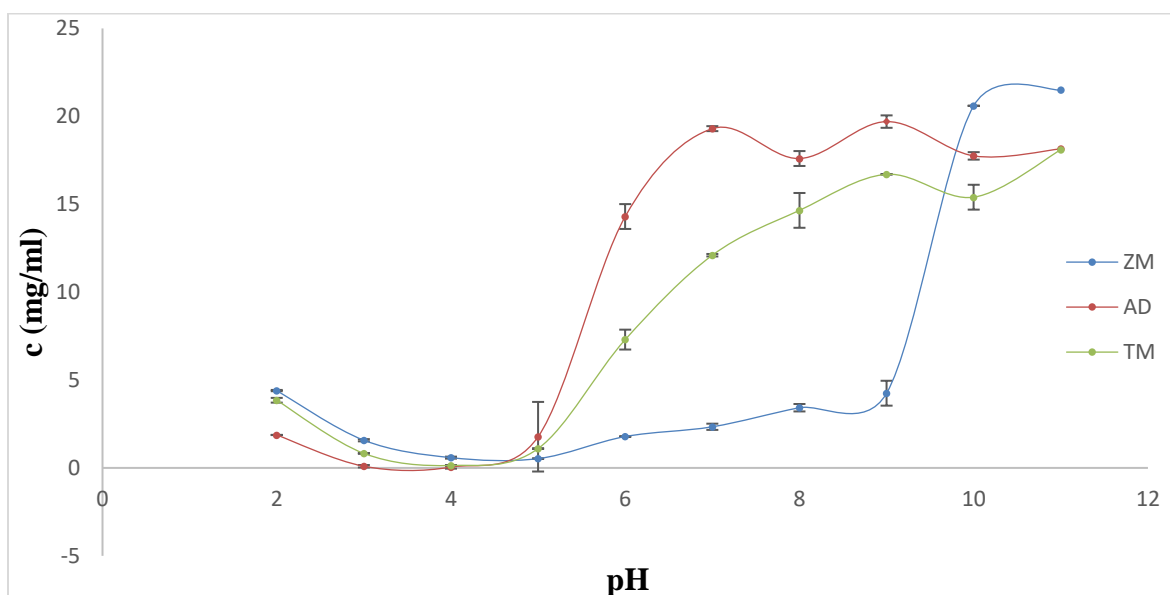
Pored pomenutih proteinskih frakcija i proteina, u telu popaca mogu se naći i proteini velikih molekulskih masa, preko 400 kDa, koji imaju funkciju gradivnih proteina u mišićnoj strukturi. Ovi proteini učestvuju u izgradnji mišića ekstremiteta i nazivaju se ketin proteini (Lakey i sar., 1990). PI crva brašnara i super crva su dobijeni iz stadijuma larve, tako da ovi proteini nisu prisutni u pomenutim PI.

5.13.4 Funkcionalne osobine PI

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su sledeće funkcionalne osobine PI: rastvorljivost i kapacitet upijanja vode i ulja.

5.13.4.1 Rastvorljivost PI insekata

Jedna od najvažnijih funkcionalnih osobina proteina je rastvorljivost i predstavlja procenat rastvorenih proteina pri određenim uslovima (Popović, 2012). Rastvorljivost proteina zavisi od mnogobrojnih faktora, koji su povezani sa molekulskom strukturom proteina, ali isto tako i sa velikim brojem spoljašnjih faktora (Sedlar i sar., 2021). U prehrambenoj industriji, rastvorljivost proteina utiče na praktičnu primenu PI, kao i na njihovu digestiju (Čakarević i sar., 2019).



Slika 40. Krive rastvorljivosti za PI i crva brašnara (TM), super crva (ZM) i popca (AD)

Rastvorljivost proteina iz PI insekata je praćeno na pH vrednostima u opsegu od 2-12 i prikazane su na Slici 40. U kiseljoj sredini sva tri PI su, može se reći, slabo rastvorljiva, dok su u alkalnoj veoma rastvorljiva. Krive rastvorljivosti za PI crva brašnara i popaca su veoma slične, dok je u slučaju popaca kriva rastvorljivosti nešto drugačija. Najveća razlika je u alkalnoj sredini, gde su proteini super crva manje rastvorljivi. Najmanja rastvorljivost za sva tri PI primećena je u opsegu vrednosti od pH 3 do pH 5. Pri čemu je za vrednosti od pH 3 do pH 4 najmanja

rastvorljivost za proteine crva brašnara i popaca, dok je u opsegu od pH 4 do pH 5 najmanja rastvorljivost zabeležena za proteine super crva. Slične rezultate su dobili i Bußler i sar. (2016), koji su objavili da se izoelektrična tačka za većinu proteina insekata kretala u opsegu od pH 3 do pH 5. Kada se šire posmatraju sva tri PI, može se reći da su najmanje vrednosti za rastvorljivost proteina postignute na pH 4. Značajno povećanje rastvorljivosti proteina se može uočiti oko pH 8 u slučaju proteina popaca (17,7 mg/ml) i crva brašnara (14,6 mg/ml). U slučaju krive rastvorljivosti za PI super crva, sa Slike 40 se može uočiti da je na vrednosti od pH 10 došlo do značajnog povećanja rastvorljivosti proteina super crva. Najveća rastvorljivost proteina za sva tri PI je postignuta na pH 11 i to 21,50 mg/ml za proteine super crva, zatim 18,15 mg/ml za proteine popaca i 18,10 mg/ml za proteine crva brašnara. Na rastvorljivost proteina pored mnoštva drugih faktora, između ostalog utiče i vrsta insekta (Bußler i sar., 2016).

Dobijeni rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane Zhao i sar. (2016) i Zielińska i sar. (2018). Glavna razlika se ogleda u rastvorljivosti PI u kiseloj sredini, jer je u prethodno objavljenim rezultatima rastvorljivost proteina u kiseloj sredini bila veća u odnosu na dobijene rezultate u ovoj doktorske disertacije. Smanjena rastvorljivost proteina u kiseloj sredini može biti povezana sa prethodnim tehnološkim procesima dobijanja brašna insekata. Proces inaktivacija i sušenje larvi i popaca, koji su podrazumevali upotrebu viših temperatura mogli su da utiču na smanjenje prinosa i smanjenu rastvorljivost proteina (Azagoh i sar., 2016; Stone i sar., 2019). Iako je sama inaktivacija larvi brašnara i popaca trajala veoma kratko (30 s na 100°C), može se pretpostaviti da je došlo do delimične denaturacije proteina, što je dovelo do smanjenja rastvorljivosti istih (Mishyna i sar., 2021). Međutim, treba naglasiti da je rastvorljivost sva tri PI bila veoma dobra u alkalnoj sredini i da se može porediti sa rastvorljivošću proteina nekih mahunarki (Mundi i sar., 2012; Wani i sar., 2013). U neutralnoj sredini proteini insekata imaju manju rastvorljivost u poređenju sa nekim biljnim proteinima i mahunarkama (Stone i sar., 2016). Ovo se može objasniti vrstom proteina koji ulaze u sastav PI, gde su u PI brašna od insekata mnogo više prisutni proteini sa nepolarnim aminokiselinskim grupama (poput prolamina i glutamina) u odnosu na albumne i globuline koji su rastvorljivi u vodenim rastvorima i rastvorima soli i više su karakteristični za biljne proteine (Popović i sar., 2011; Stone i sar., 2019).

5.13.4.2 Kapacitet vezivanja vode i ulja

Kapacitet vezivanja vode i ulja može da se definiše kao sposobnost PI da veže i zadrži određenu količinu vode tj. ulja. U prehrambenoj industriji jedna od važnih osobina proteina jeste njihova sposobnost vezivanja vode i ulja, koja velikim delom utiče na primenjivost i upotrebu PI izolata. U industriji hrane za životinje ova osobina je takođe veoma važna. Na kraju proizvodnog procesa, nakon termičkih tretmana poput ekstrudiranja i peletiranja (*Post Pelleting Liquid Application*), dodaju se različite vrste tečnosti kako bi se poboljšao kvalitet gotovog proizvoda hrane za životinje (Đuragić i sar., 2012). Ekstrudati su porozne strukture i nakon dodavanja ulja ili nekih vodenih rastvora poput amino i organskih kiselina, aroma i boja može doći do otpuštanja i gubitaka ovih skupih i visokokvalitetnih nutrijenata (Dragojlović i sar., 2019). Stoga je veoma važno naći način da ovi nutrijenti ostanu vezani u strukturi ekstrudata.

Tabela 12. Kapacitet upijanja vode i ulja PI insekata

g/g	TM	ZM	AD
Kapacitet vezivanja ulja	0,61 ± 0,07	0,94 ± 0,05	0,51 ± 0,02
Kapacitet vezivanja vode	1,32 ± 0,05	2,01 ± 0,03	1,51 ± 0,02

AD- popci, TM-crv brašnar i ZM- super crv. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3)

Kao što se može videti u Tabeli 12 najveći kapacitet vezivanja ulja ima PI super crva i to 0,94 g/g. Kapacitet vezivanja ulja PI popaca je najniži i iznosi 0,51 g/g, dok za PI crva brašnara iznosi 0,61 g/g.

Dobijeni rezultati su manji u odnosu na rezultate dobijene od strane Stone i sar. (2019), koji su dobili da je kapacitet vezivanja ulja za PI popaca i super crva veći od 1 g/g. Međutim, važno je napomenuti da su ti rezultati bili izraženi na suvu materiju, tako da se može reći da su dobijeni rezultati bili uporedivi. Kapacitet vezivanja ulja zavisi od količine ulja koja će prodreti u strukturu PI, kao i od broja i vrste nepolarnih lanaca proteina (Al Kathani i sar., 1996). Neka istraživanja su pokazala da enzimskom hidrolizom može značajno doći do poboljšanja kapaciteta vezivanja ulja.

Tokom enzimske hidrolize dolazi do „odmotavanja“ proteinske strukture, u čijoj unutrašnjosti se najviše nalaze nepolarni lanci amino kiselina, koji mogu da poboljšaju vezivanje ulja (Mune i sar., 2015; Leni i sar., 2020). Vrednost za kapacitet vezivanja ulja dobijene za PI super crva je bolji u odnosu na neke biljne proteinske sirovine poput nekih leguminoza: soje (0,84 g/g) i sočiva (0,93 g/g) (Siddiq i sar., 2010). Na osnovu toga može se reći da upotreba ovih proteina ima potencijala za primenu u prehrambenoj industriji, kao zamena soje u prerađevinama od mesa, ali isto tako i u nekim pekarskim proizvodima (Zielińska i sar., 2018).

Kapacitet vezivanja vode se kreće od 1,32 do 2,01 g/g. Kao što se može primetiti u Tabeli 12, najveći kapacitet vezivanja vode zabeležen je za PI super crva i to 2,01 g/g. Najmanji kapacitet vezivanja vode je pronađen u PI super crva 1,32 g/g, dok PI popaca ima 1,51 g/g. Dobijeni rezultati su slični sa prethodno objavljenim rezultatima u literaturi (Zielińska i sar., 2018; Stone i sar., 2019). Dok su u poređenju sa rezultatima Bussler i sar. (2016), nešto veći (0,8 g/g). Razlike u rezultatima najverovatnije potiču od razlike u procesuiranju insekata i postupku ekstrakcije proteina (Omotoso i sar., 2015). Povećani sadržaj hidrofilnih amino kiselina dovode do povećanog kapaciteta vezivanja vode (Zielińska i sar., 2015). U poređenju sa nekim biljnim komercijalnim proteinima, može se reći da po vrednostima kapaciteta vezivanja vode sva tri PI mogu da budu konkurentna komercijalno dostupnim proteinima (Zielińska i sar., 2018). Nasuprot kapacitetu vezivanja ulja, literaturni podaci govore da enzimska hidroliza nema uticaj na poboljšanje kapaciteta upijanja vode (Purschke i sar., 2018). Takođe termički tretmani mogu negativno da deluju na kapacitet vezivanja vode, dok pozitivno utiču na kapacitet vezivanja ulja, jer dolazi do promene u proteinskoj strukturi, gde hidrofobni lanci postaju dominantniji (Myshina i sar., 2021).

Na osnovu dobijenih rezultata za kapacitet vezivanja vode/ulja sva tri PI mogu naći primenu u prehrambenoj industriji, kao alternativa komercijalnim proteinima. Međutim, u industriji hrane za životinje, neophodno je uzeti u obzir sve faktore i ekonomsku isplativost proizvodnje. Na osnovu toga se dalje može zaključiti da li je ekonomski isplativa upotreba PI, ili pak upotreba brašna od insekata može zadovoljiti kvalitativne i ekonomske zahteve proizvodnje i upotrebu u industriji hrane za životinje.

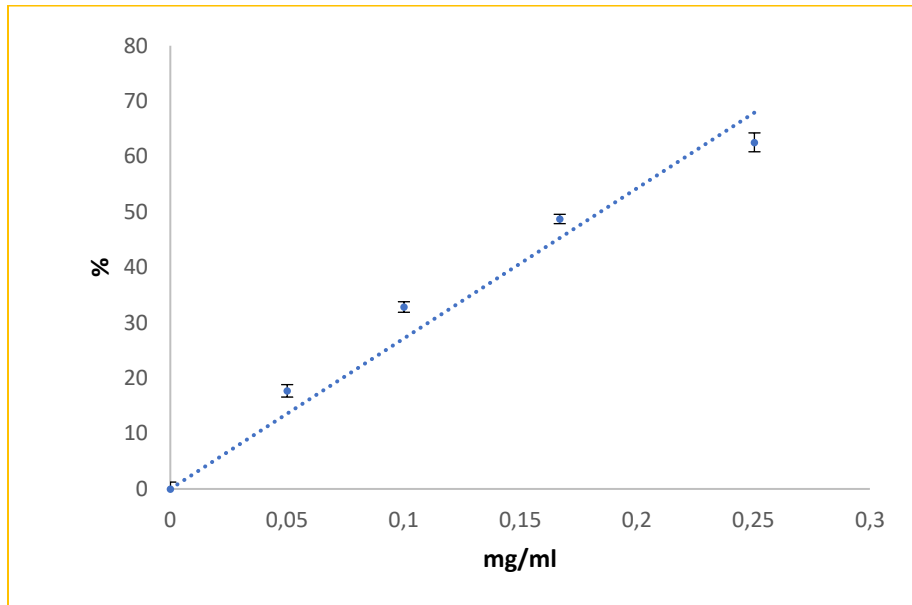
5.13.5 Biološke osobine PI

Biološke osobine proteina su osobine koje su visoko cenjene kako u prehrambenoj, tako i u industriji hrane za životinje, jer poboljšavaju kvalitet i skladišnu stabilnost proizvoda. U okviru doktorske disertacije ispitane su dve biološke osobine, antioksidativna i antimikrobna aktivnost PI. Pri čemu je antimikrobna aktivnost ispitana i u proteinskim hidrolizatima.

5.13.5.1 Antioksidativna aktivnost PI insekata

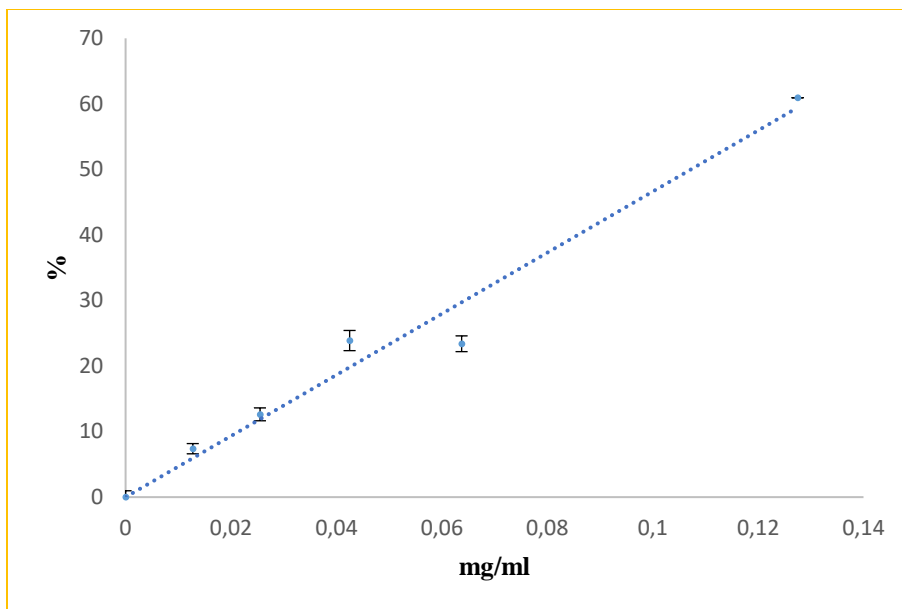
Antioksidansi su jedinjenja koja sprečavaju negativno delovanje slobodnih radikala i na taj način produžavaju skladišnu stabilnost proizvoda. Poznato je da proteini malih molekulskih masa i peptidi imaju antioksidativnu aktivnost, te da se zbog toga najčešće vrši enzimska hidroliza, kako bi se proteini velikih molekulskih masa „cepali“ na manje (Popović, 2012). Hrana za životinje je izuzetno bogata nutrijentima, poput masti i proteina koji su sklorni oksidaciji (Rakita i sar., 2020; Dragojlović i sar., 2021). Do skoro, u industriji hrane za životinje najčešće su se upotrebljavali sintetički antioksidansi poput butilhidroksitoulen (BHT) i butilhidroksianisol (BHA), za koje se pokazalo da imaju toksično dejstvo (Craig, 2021). Stoga je sve veća pažnja usmerena da se ovi antioksidansi izbace iz upotrebe i da se što više upotrebljavaju prirodni antioksidansi, dobijeni iz različitih biljaka ili drugih sirovina.

Antioksidativna aktivnost PI insekata je merena primenom ABTS metode, koja se bazira na merenju sposobnosti PI da „hvata“ $ABTS^{•+}$ radikal katjone. Vrednosti su izražene u procentima, a predstavljaju procenat $ABTS^{•+}$ koji određena koncentracija (mg/ml) PI može da neutrališe.



Slika 41. Antioksidativna aktivnost PI crva brašnara (*Tenebrio molitor*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja (n=3)

Prema rezultatim prikazanim na Slici 41, najveća antioksidativna aktivnost PI crva brašnara iznosila je 62,56%, pri koncentraciji od 0,25 mg/ml PI crva brašnara. Dobijeni rezultati su bili slični rezultatima objavljenim u radu Flores i sar. (2020). U poređenju sa antioksidativnom aktivnošću PI super crva, može se reći da su dobijene vrednosti veoma slične za oba PI. U poređenju sa hidrolizatom crva brašnara, antioksidativna aktivnost PI crva brašnara je manja, što je i očekivano imajući u vidu enzimsku hidrolizu proteina i veći sadržaj bioaktivnih peptida (Zielińska i sar., 2017). U istraživanjima sprovedenim Tang i sar. (2018) dobijeni rezultati su ukazivali da je IC_{50} u proteinskom izolatu bio oko 10 puta veći u odnosu na hidrolizate, dobijene pomoću različitih vrsta enzima. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u ovoj doktorskoj disertaciji.



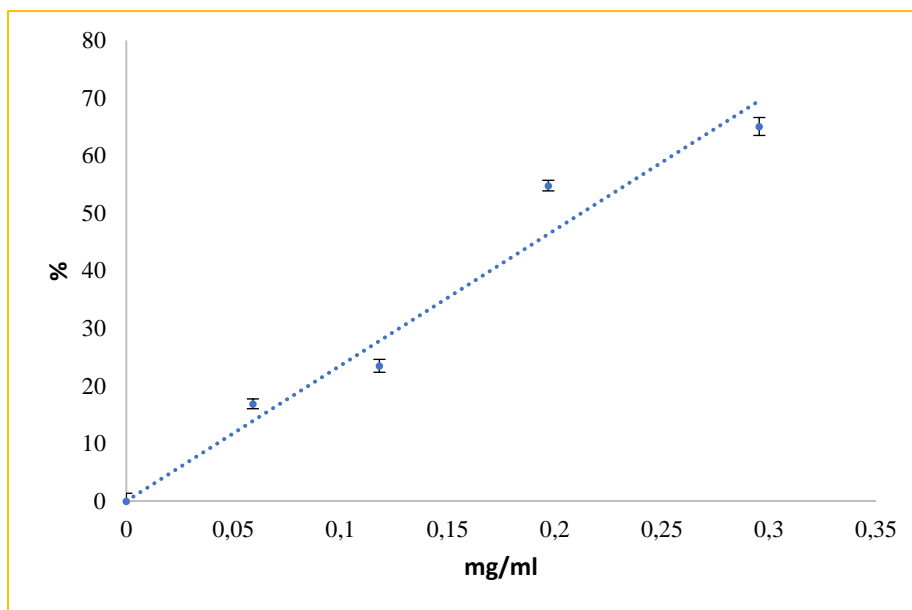
Slika 42. Antioksidativna aktivnost PI super crva (*Zophobas morio*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja (n=3)

Na osnovu dostupnih informacija, veoma mali broj radova je objavljen na temu antioksidativne aktivnosti proteinskih hidrolizata insekata, a da na temu antioksidativne aktivnosti proteinskih izolata gotovo da nema objavljenih radova. Pri čemu se mora istaći da je najviše istraživanja rađeno na proteinskim hidrolizatima insekata *Hermetia illucens* i *Tenebrio molitor* (Wang i sar., 2013; Zielińska i sar., 2017). Na osnovu dostupne literature antioksidativna aktivnost proteina super crva do sada nije rađena.

Prema dobijenim rezultatima, PI super crva prikazana na Slici 42, ispoljili su dobru antioksidativnu aktivnost, s obzirom da je postignuta vrednost od 60,94%, pri koncentraciji od 0,12 mg/ml PI super crva. Ovo se može objasniti i elektroforetskim profilom PI super crva (Slika 39), gde se uočava prisutnost malih molekularnih frakcija proteina, manjih od 14 kDa. Ovakvi molekuli proteina su poznati po svojoj „hvatačkoj“ sposobnosti slobodnih radikala, odnosno visokoj antioksidativnoj aktivnosti. U poređenju sa hidrolizatima proteina insekata *Tenebrio molitor*, *Grylodes sigillatus*, *Schistocerca gregaria*, posmatrani PI ima nešto manju antioksidativnu aktivnost (Zielińska i sar., 2017).

Međutim imajući u vidu da su prikazani rezultati dobijeni iz PI, a ne iz hidrolizata, koji nakon enzimske hidrolize ima mnogo veći sadržaj bioaktivnih peptida i proteina (nižih molekularskih masa) može se reći da PI super crva je imao značajnu antioksidativnu aktivnost.

Kao što se vidi na Slici 43, najveća antioksidativna aktivnost PI popaca je 65,6%, pri koncentraciji od 0,29 mg/ml PI popaca. Postignuta antioksidativna aktivnost je nešto veća u poređenju sa druga dva posmatrana PI. Mali broj literaturnih navoda postoji na temu antioksidativne aktivnosti proteina/hidrolizata popaca. U radu Messeina i sar. (2019) ispitivana je antioksidativna aktivnost hidrolizovanog brašna popaca pomoću DPPH metode. Dobijeni rezultati pomenutog istraživanja su pokazali da je antioksidativna aktivnost hidrolizovanog brašna popaca znatno niža u odnosu na dobijene rezultate u ovom istraživanju. Antioksidativna aktivnost brašna popaca je bila 26,5%, ukoliko se koristila koncentracija od 5 mg/ml ovog hidrolizata. Izneti rezultati pokazuju da proteinski izolati imaju veću antioksidativnu aktivnost od hidrolizovanog brašna popaca, što može da dovede do zaključka da veća koncentracija proteina i ima značajniji uticaj na antioksidativnu aktivnost proteina.



Slika 43. Antioksidativna aktivnost PI popaca (*Acheta domesticus*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost merenja (n=3)

Dobijeni rezultati za sva tri PI dobijena iz insekata pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost. Elektroforetskim profilom je pokazano da sva tri PI sadrže proteine i peptide molekulskih masa ispod 14 kDa (Slika 39). Ovi proteini i peptidi su poznati po svojim bioaktivnim osobinama, poput antioksidativne aktivnosti (Thiansilakul i sar., 2007; Raghavan i sar., 2008, Picot i sar., 2010).

Takođe, objašnjenje visoke antioksidativne aktivnosti sva tri PI se nalazi i u načinu procesuiranja samog brašna, a potom i izolata. S tim u vezi, u nekoliko istraživanja pokazano je da termički tretmani mogu da poboljšaju antioksidativnu aktivnost peptida. Zielińska i sar. (2017) su zaključili da inaktivacija insekata na višim temperaturama dovodi do stvaranja nižih molekulskih masa proteina, ispod 10 kDa. Takođe, u istraživanjima Wang i sar. (2013) i Zhu i sar. (2021) pokazano je da više temperature dovode do formiranja većeg sadržaja hidrofobnih aminokiselina, a da one imaju veliku „hvatačku“ sposobnost slobodnih radikala. Odnosno, peptidi sa hidrofobnim lancima amino kiselina se ponašaju kao donori elektrona, čime sprečavaju negativno dejstvo slobodnih radikala (Dong i sar., 2008). U ovim istraživanjima korišteni su termički tretmani prilikom inaktivacije insekata, kao i tokom sušenja, pa se može pretpostaviti da je time došlo do poboljšanja antioksidativne aktivnosti PI.

PI posmatranih insekata imaju značajniju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa nekim biljnim proteinskim hidrolizatima, dobijenim iz poljoprivrednog otpada, poput lišća različitih biljnih vrsta (Sedlar i sar., 2020). Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da visoka antioksidativna aktivnost PI svrstava ove insekte u prirodne izvore antioksidativnih proteina i peptida, koji mogu naći široku primenu u prehrambenoj, industriji hrane za životinje, pa i farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

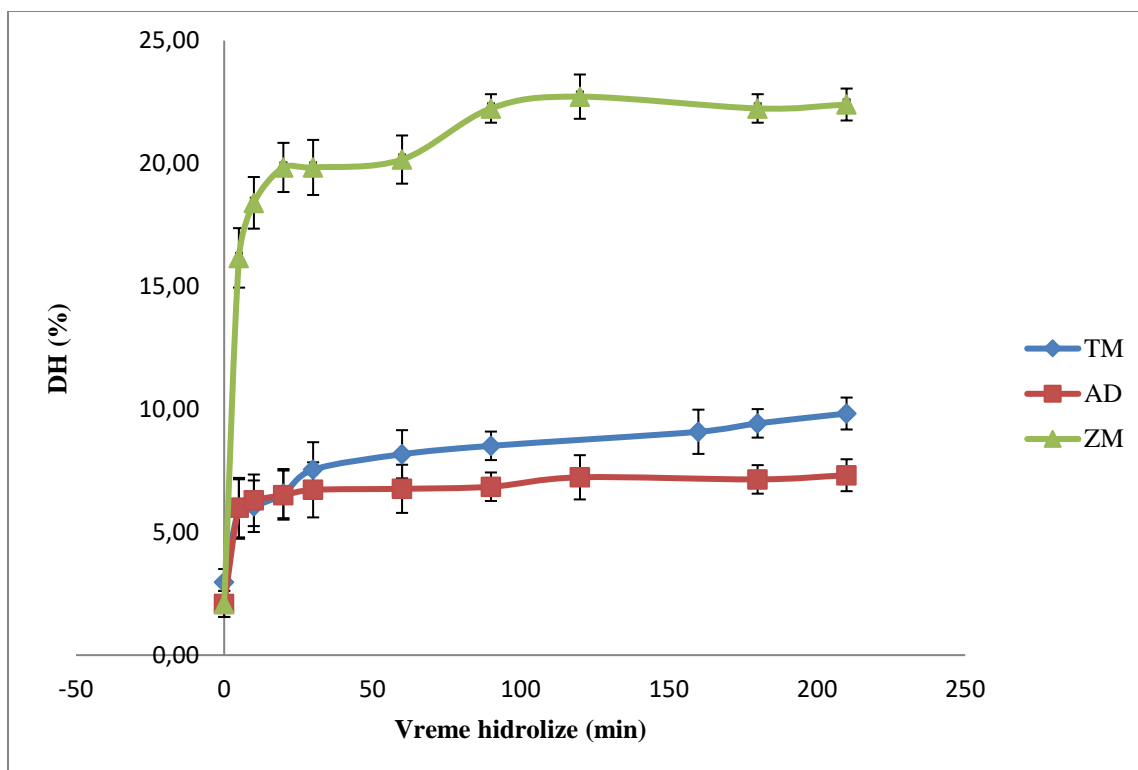
5.13.5.2 Antimikrobna aktivnost PI

Na osnovu elektroforetskog profila PI u sve tri insekatske vrste, zapaža se prisustvo malih molekulskih frakcija proteina, manjih od 14 kDa (Slika 44). U poslednjih desetak godina, mnoga istraživanja su pokazala da proteini i peptidi malih molekulskih frakcija imaju antimikrobnu aktivnost i da mogu imati široku primenu u budućnosti kao alternativa antibioticima (Bulet i sar., 2004; Hancock i sar., 2006; Vale i sar., 2014). Na osnovu ovih rezultata i uvidom u prethodno objavljene rezultate, ispitivana je antimikrobna aktivnost PI na dve bakterije, jednu gram pozitivnu (*Staphilococcus epidermidis*) i jednu gram negativnu (*Escherichia coli*).

Dobijeni rezultati, nisu prikazani u sklopu doktorske disetaicje, ali su pokazali da ni jedan PI nije ispoljio antimikrobnu aktivnost na bakterije *E. coli* i *S. epidermis*. U PI je na osnovu elektroforetskog profila uočeno postojanje malih molekulskih frakcija proteina, na žalost ova metoda nam ne daje i kvantitativni uvid. Tako da postoji pretpostavka da iako prisutne, ove male proteinske frakcije se ne nalaze u dovoljnoj količini da bi mogle da ispolje antimikrobnu aktivnosti.

5.14 Enzimaska hidroliza

Enzimaska hidroliza je rađena pomoću enzima alkalaze pod kontrolisanim uslovima. Cilj enzimske hidrolize je bio dobijanje hidrolizata malih molekulskih i peptidnih frakcija. Odnosno povećanje koncentracije ovih frakcija, kako bi se ispitalo njihovo antimikrobno, tj. antibakterijsko dejstvo. PI su bili rastvoreni u glicinskom puferu pH 9, tako da rastvorljivost proteina bude zadovoljavajuća za sve PI, da se postigne optimalna vrednost za delovanje enzima, ali isto tako da pH vrednost ne utiče na rast bakterija.



Slika 44. Vremenski tok enzimske hidrolize PI crva brašnara (TM), popaca (AD) i super crva (ZM) pomoću enzima alkalaze na 50°C, pH 9; odnos enzim/supstrat je bio 1:200

Vremenski tok enzimske hidrolize za sva tri PI je prikazan na Slici 44. Dobijena kriva enzimske hidrolize izgleda uobičajeno za enzimsku reakciju. Slične krive su dobijene i za vremenski tok enzimske hidrolize proteina soje (Meinlschmidt i sar., 2016) i uljane tikve (Popović i sar., 2011). Na Slici 44 uočava se da se kriva enzimske hidrolize sastoji iz početnog inicijalnog ubrzavanja, zatim dolazi do usporavanja reakcije, da bi potom usledio period stagnacije sve do završetka hidrolize. Stepenn hidrolize (DH) je korišćen u cilju praćenja toka hidrolize.

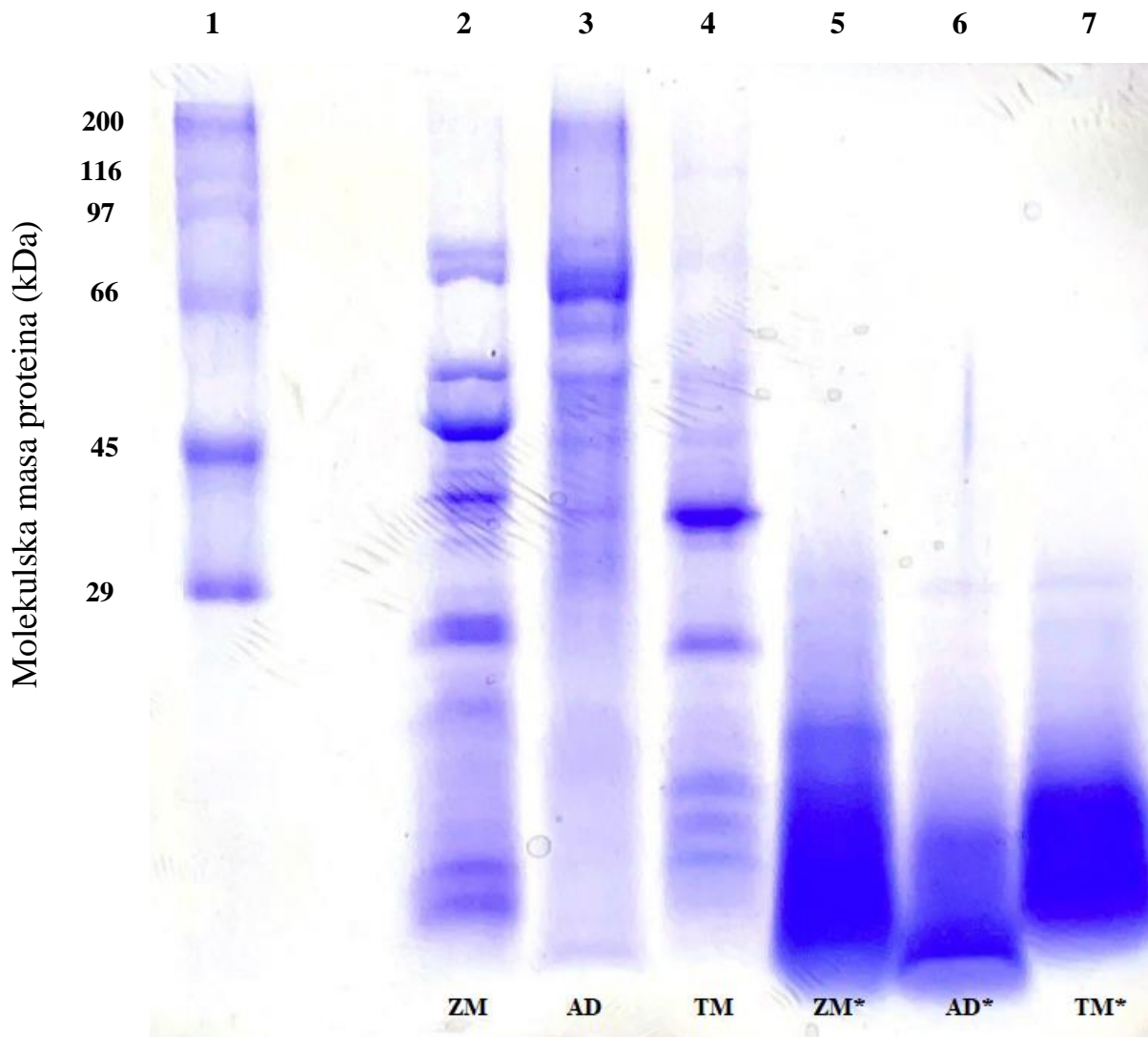
U sva tri slučaja u nultom vremenu, u kontrolnim uzorcima, bez dodavanja enzima stepenn hidrolize je oko 2%. Može da se pretpostavi da je tokom termičkih tretmana obrade brašna insekata, došlo do delimične denaturacije proteina i stvaranja malih molekulskih frakcija (Chi i sar., 2003). Sličan trend na početku hidrolize su dobili i Hall i sar. (2017) i Purschke i sar. (2017). Najveći DH je postignut za PI super crva i iznosio je 22,4%. U slučaju PI crva brašnara i popaca, DH se ne razlikuje mnogo i iznosi 7,32 i 9,83%. Razlike u koncentraciji proteina mogu da utiču na DH, čime se može objasniti veća vrednost DH za manje koncentracije proteina, što je bio slučaj

za PI super crva. Ratvorljivost super crva je najmanja na pH 9 i iznosi 6,25 mg/ml, dok je koncentracija proteina na istoj pH za PI crva brašnara 17,5mg/ml, a popaca 23,5 mg/ml.

U istraživanjima Zielińska i sar. (2017) dobijene su veće vrednosti za DH kada je korišćen enzim pepsin za dobijanje proteinskog hidrolizata (PH) super crva i popaca (oko 20%). S tim što se mora naglasiti da je odnos E/S bio manji i iznosio je 1:100. I u istraživanjima Hall i sar (2017), veće DH vrednosti (30%) su dobijene kada je za hidrolizu upotrebljen isti enzim, alkalaza, ali veća koncentracija enzima (E/S 3:100). Slične vrednosti dobijenim rezultatima za DH su dobijene u istraživanjima Purschke i sar. (2017), gde je DH bio oko 9%, pri istoj količini enzima (E/S 1:200). Različite vrednosti u odnosu na prethodno objavljenu literaturu se mogu objasniti time da na enzimsku hidrolizu utiču brojni faktori poput: vrste proteina, tipa i koncentracije enzima, inicijalnog stanja proteina (stepena denaturacije), temperature, pH vrednosti i jonske jačine rastvora (Panyam i sar., 1996).

5.14.1 SDS gel elektroforeza

Nakon enzimske hidrolize, odrađen je elektroforetski profil hidrolizata, kako bi se detektovale peptidne frakcije prisutne u hidrolizatima.



Slika 45. Elektroforetski profil PI (2,3,4) i PH* (5,6,7) super crva (ZM), popaca (AD), crva brašnara (TM) u opsegu od 29 do 200 kDa (1- standard)

Na Slici 45 mogu se uočiti elektroforetski profili proteinskih izolata i hidrolizata sva tri insekta. Kako je i očekivano, u PH najintenzivnije trake su ispod 29 kDa, što ukazuje na enzimsku razgradnju velikih molekula proteina, koji su prisutni u proteinskim izolatima. Nasuprot PI, u PH nisu detektovane proteinske frakcije velikih molekulskih masa, što ukazuje na uspešnost enzimske hidrolize.

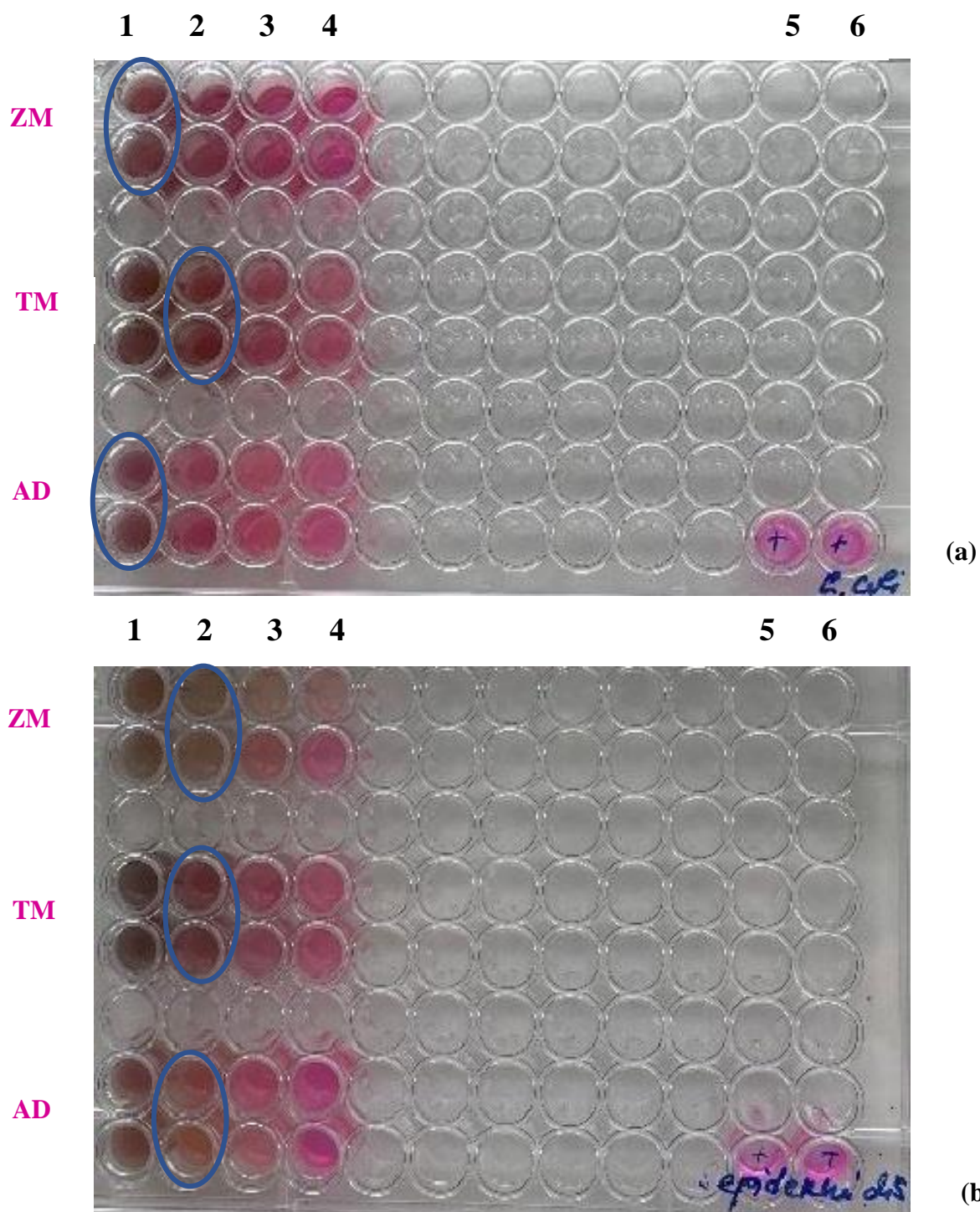
Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima Hall i sar. (2016) i Yoon i sar. (2019) gde su nakon enzimske hidrolize (alkalaze) proteina popaca i crva brašnara sve proteinske frakcije manje od 14 kDa. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je mala količina enzima (koncentracije od 0,5%, odnos E/S 1:200) dovoljna za hidrolizu velikih molekulskih frakcija proteina i stvaranje malih peptida i proteina, koji su svojstveni po svojim bioaktivnim osobinama. Upotreba malih koncentracija enzima bi mogla da opravda upotrebu ovih hidrolizata u industriji hrane za životinje, sa aspekta ekonomske isplativosti.

5.14.2 Antimikrobna aktivnost PH insekata

Antimikrobna aktivnost PH je posmatrana kao inhibitorno delovanje PH insekata na rast dve vrste bakterije i to jedna gram negativna (*E.coli*), a druga gram pozitivna (*S. epidermidis*). Nakon vizuelnog opažanja upotrebom mikrotitar ploča i resazurina kao indikatora za antimikrobnu aktivnost, određen je stepen redukcije rasta bakterija nakon 24h od perioda inokulacije

5.14.2.1 Vizuelni opažaj antimikrobne aktivnosti PH

Prvi test koji je rađen bila je vizuelna metoda, na osnovu koje se mogao steći prvi dojam o antimikrobnoj aktivnosti. Na osnovu vizuelnog opažanja, uočeno je inhibitorno dejstvo PH, odnosno minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) PH, koja je sprečava prelazak oksidovane u redukovanu formu resazurina (Čabarkapa i sar., 2019). Odnosno, gde je postojao rast bakterijske kulture boja resazurina je bila roza, a u odsustvu bakterijskog rasta je bila plava.



Slika 46. Prikaz mikrotitar ploča nakon perioda inkubacije (n=2) a) *Eserichie coli* b) *Staphilococcus epidermidis*: 1,2,3,4 predstavljaju hidrolizate proteina super crva (ZM); crva brašnara (TM) i popaca (AD) različitih koncentracija; 5,6 predstavlja kontrolu rasta mikroorganizma, *MIC- minimalna inhibitorna koncentracija

Tokom vizuelnog opažanja mikrotitar ploča (Slika 46), zapaža se da koncentracije 1 svih PH imaju vidljivo inhibitorno dejstvo na rast bakterija *E. coli* i *S. epidermidis*. Za koncentraciju 2 inhibitorno dejstvo PH crva brašnara je uočeno na rast bakterije *E. coli* i inhibitorno dejstvo PH super crva i crva brašnara na rast bakterija *S. epidermidis*. U tabeli 13 su prikazane koncentracije PH koji se nalazio u mikrotitar pločama.

Tabela 13. Koncentracije PH u bunarimamikrotitar ploče i stepen hidrolize (DH)

PH	Oznaka	koncentracija u bunariću (mg/ml)	DH (%)
ZM	1	5,68	22,4
TM	1	15,91	9,83
AD	1	21,36	7,32
ZM	2	2,84	22,4
TM	2	7,95	9,83
AD	2	10,67	7,32
ZM	3	1,42	22,4
TM	3	3,98	9,83
AD	3	5,34	7,32
ZM	4	0,71	22,4
TM	4	1,99	9,83
AD	4	2,67	7,32

*PH-proteinski hidrolizat

Dobijeni rezultati ukazuju da je u slučaju bakterije *E. coli* MIC super crva iznosio 5,68 g/ml, za PH crva brašnara 7,95 mg/ml, dok je najlošije antimikrobno dejstvo postignuto u slučaju PH popaca i to MIC od 21,36 mg/ml. Hidrolizati insekata su pokazali bolju antimikrobnost u slučaju bakterije *S. epidermidis*. Tako vrednosti za MIC PH za super crva iznose 2,84 mg/ml, za crva brašnar 7,95 mg/ml, a za PH popaca 10,67 mg/ml. Najbolje antimikrobno dejstvo od sva tri ispitana hidrolizata imalo PH super crva. U slučaju PH super crva, veoma male koncentracije ispoljile su antimikrobno dejstvo. Ovo se može objasniti time da je najveći stepen hidrolize (22,4%) upravo postignut u ovim izolatima, što dalje ukazuje da je upravo u ovim hidrolizatima najveća koncentracija malih bioaktivnih peptida i proteina.

Poznato je da se insekti vekovima koriste u kineskoj medicini i to u lečenju prehlade, kašlja, groznice, epilepsije kod dece, rubele, tetanusa i drugih bolesti (Wagner i Ulrich-Merzenich, 2013).

S tim u vezi, poslednjih par godina pažnja je sve više usmerena ka antimikrobnim peptidima (AMP) i njihovim antibakterijskim delovanjem (Xhiuhua i sar., 2009; Long, 2012).

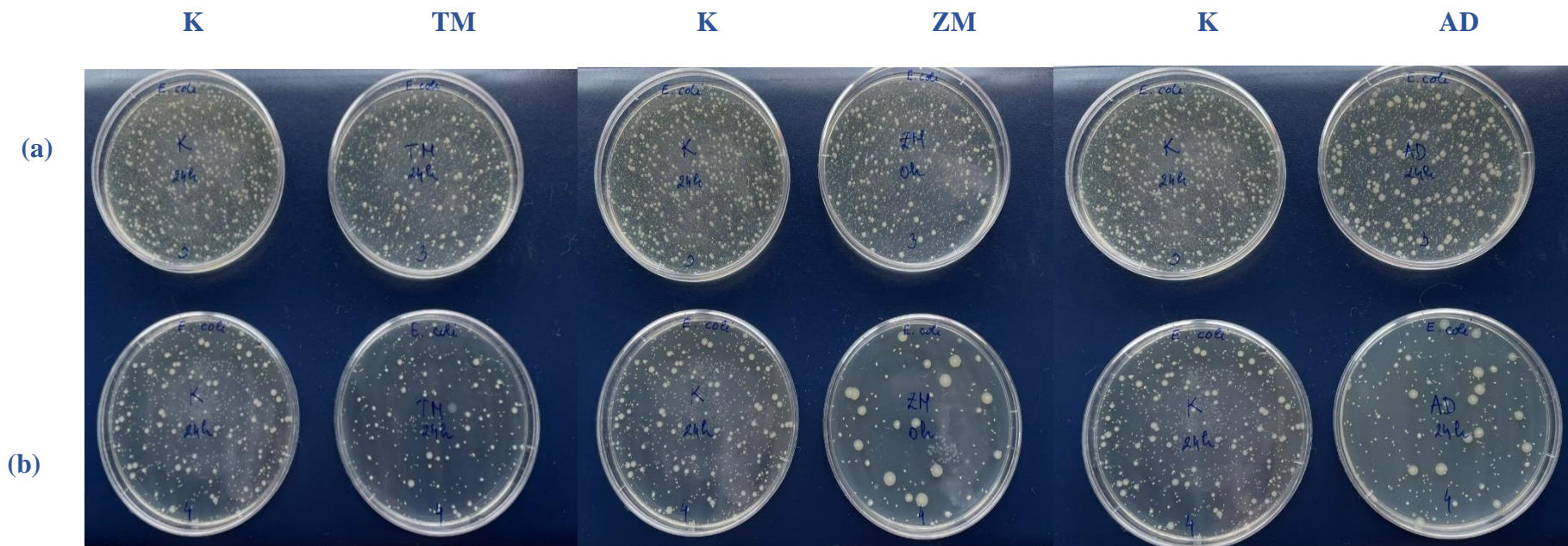
U istraživanjima Ma i sar. (2019) ispitana je antimikrobna aktivnost različitih ekstrakata insekata na visoko rezistente bakterije poput *S. aureus* i *M. tuberculosis*. Istraživanja su pokazala da ekstrakt popaca dobijen u etilen acetatu i n-butanolu inhibira rast oba bakterijska soja, pri čemu je MIC bio 100 mg/ml. Takođe, u istraživanjima Flores i sar. (2020) pokazano je da PH crva brašnara ima značajnu antibakterijsku aktivnost kako na rast gram negativnih bakterija (*P. vulgaris*, *Shigella flexnerii*), tako i na gram pozitivne (*Bacillus spp.*), što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

5.14.2.2 Redukcija rasta bakterija

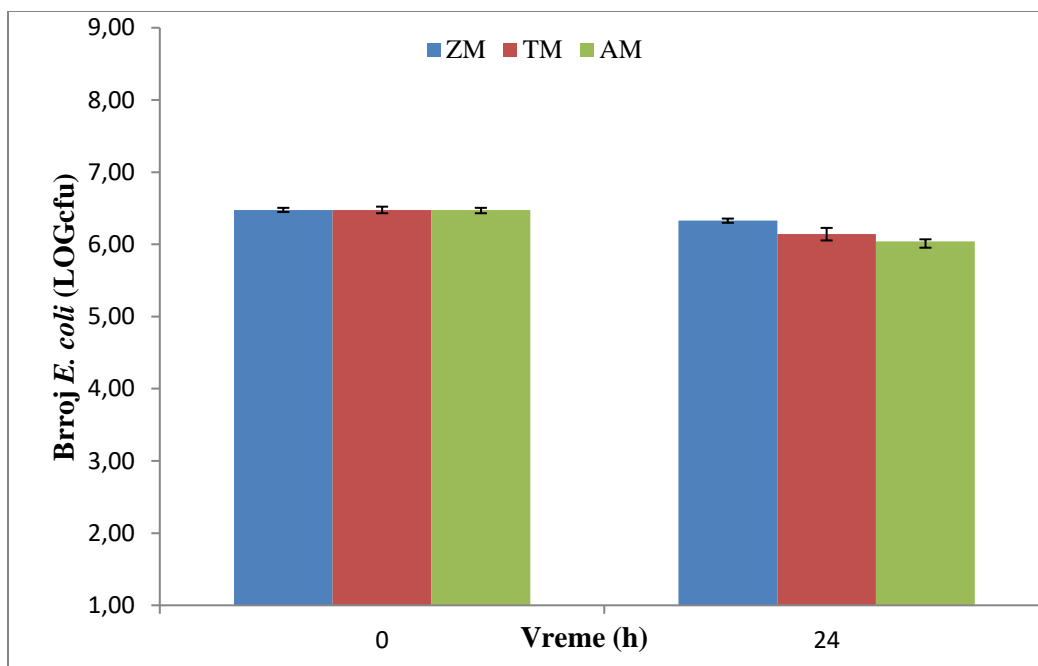
Nakon 24h od perioda inokulacije, došlo je do redukcije broja bakterija *E. coli* u svim Petri pločama (Slika 47). Svaka ploča koja nije sadržala PH je imala gušće bakterijske kolonije u odnosu na ploče koje su sadržale proteinski hidrolizat. Ovi rezultati ukazuje na inhibitorno delovanje PH svih posmatranih insekata na rast bakterije *E. coli*.

Bakterija *E. coli* je prirodno nastanjena u crevnom traktu čoveka i životinja i obično ne izaziva bolesti kod životinja. Međutim, određeni sojevi *E. coli* mogu da proizvedu Shiga toksin, koji na farmama može izazvati bolesti endemske vrste kod prasića i dizenteriju kod teladi (Fairbrother i Nadeau, 2006). Kod čoveka trovanje hranom kontaminiranom *E. coli* može izazvati krvave dijareje i bolesti urinarnog trakta (FAO, 2002). Tako da je veoma važno sprečiti kontaminaciju ovom bakterijom, kako u hrani za životinje, tako i u hrani za ljude.

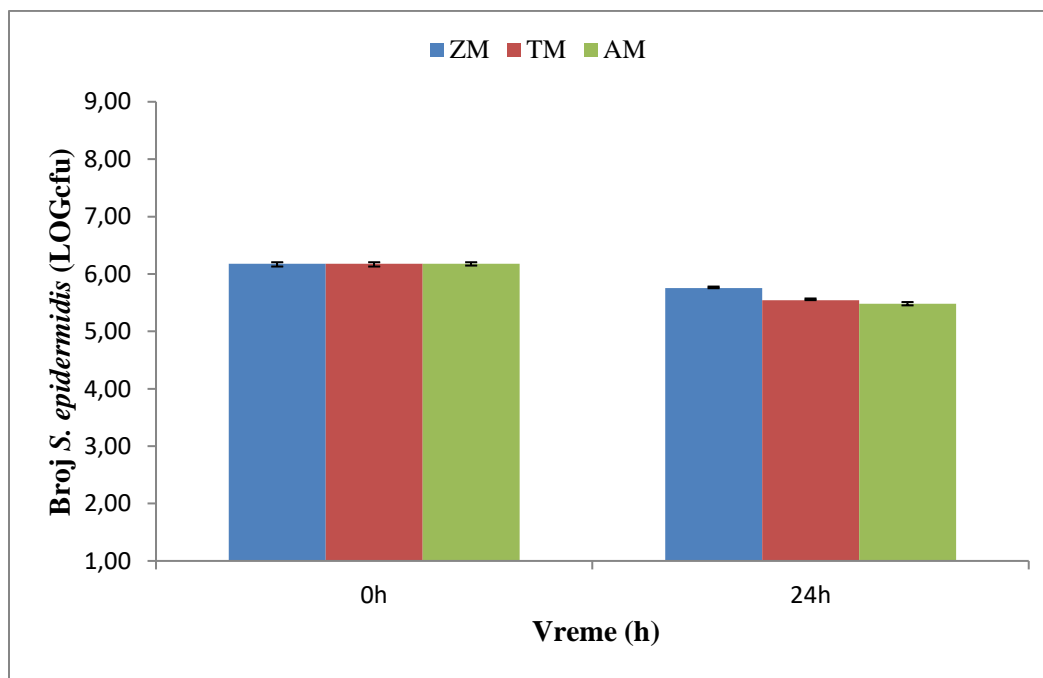
Na Slici 48 prikazan je grafik redukcije rasta bakterije *E. coli* na hranljivom agaru. Najveća redukcija rasta je dobijena delovanjem PH popaca i to 6,74%, dok je najmanja dobijena delovanjem PH super crva i to 2,30%.



Slika 47. Izgled Petri ploča nakon perioda inokulacije *E. coli* u 2 koncentracije a) 10^4 CFU mg/ml i b) 10^3 CFU mg/ml u periodu od 24h. K-kontrola (bez proteinskog hidrolizata), TM-proteinski hidrolizat crva brašnara, ZM-proteinski hidrolizat super crva, AD-proteinski hidrolizat popaca



Slika 48. Redukcija rasta *E. coli* nakon 24h u hranljivom agaru (n=3) delovanjem proteinskih hidrolizata crva brašnara (TM), super crva (ZM), i popaca (AD)

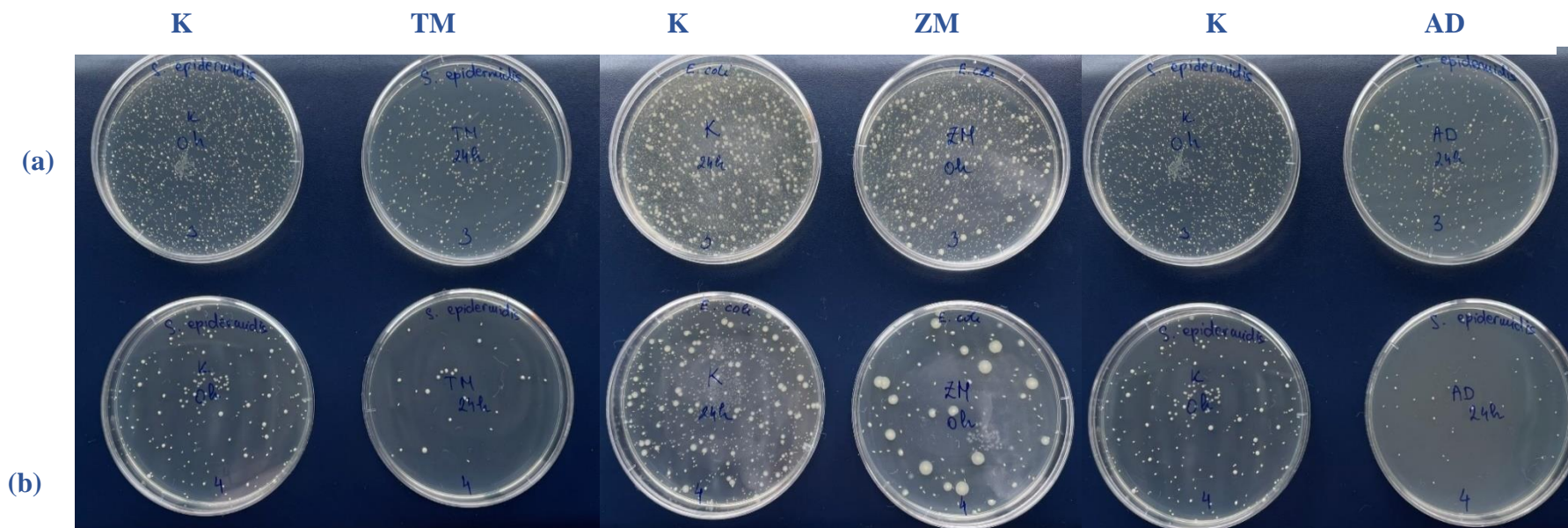


Slika 49. Redukcija rasta *S. epidermidis* nakon 24h u hranljivom agaru (n=3) delovanjem proteinskih hidrolizata crva brašnara (TM), super crva (ZM), i popaca (AD)

Delovanjem PH crva brašnara dolazi do 5,19% redukcije rasta *E. coli*. Dobijeni rezultati se poklapaju sa vrednostima koncentracije proteina PH, jer je najveća koncentracija zabeležena u PH popaca (23,5 mg/ml), zatim crva brašnara (17,5 mg/ml), a najmanja u PH super crva (6,25 mg/ml). Još pre nekoliko decenije dokazano je da imuni sistem insekata sadrži peptid po imenu cecropin, čija je uloga u zaštiti organizma od gram negativnih bakterija poput *E.coli* (Hultmark i sar., 1980; Steiner i sar., 1981). Takođe, iz nekih insekata je izolovan peptid atacin, molekulske mase između 20 i 25 kDa, koji takođe ima jaku antimikrobnu aktivnost na gram negativne bakterije (Carlsson i sar., 1991). S obzirom da u ovim istraživanjima nije rađena identifikacija dobijenih peptidnih frakcija, može se samo reći da na osnovu elektroforetskog profila (Slika X), frakcije manje od 29 kDa imaju antimikrobnu aktivnost na rast *E. coli*.

S. epidermidis je bakterija prirodno nastanjena na koži čoveka i sluzokoži nosa. Njeno patogeno dejstvo se najčešće ispoljava u bolnicama, jer kolonije ove bakterije stvaraju biofilme na plastičnoj opremi, poput katetera i druge medicinske potrošne opreme i ih uređaja (Rogeres i sar., 2009). Na farmama *S. epidermidis* može da izazove mastitis kod krava u periodu laktacije, što predstavlja veliki problem za mužu i zahteva primenu antibiotika (Roy i Keefe, 2012). Poslednja istraživanja su pokazala da ova bakterija može da prouzrokuje i niz bolesti koje su povezane sa oštećenjem bubrega, jetre i crevnog trakta čoveka i životinja (Akinkunmi i sar., 2012; Akinkunmi i sar., 2014). Izneto ukazuje na potrebu srečavanjem širenja ove bakterije, kao za iznalaženjem novih efikasnih i ekonomičnih metoda kontrole.

Redukcija rasta gram pozitivne bakterije *S. epidermidis* je jače izražena delovanjem sva tri PH (Slika 49). Prema rezultatima, prikazanim na Slici 49 i 50, najjaču antimikrobnu aktivnost imao je PH popaca i to 11,20%, zatim po intenzitetu sledi delovanje PH crva brašnara i to u vrednosti od 10,20%, dok je antimikrobno delovanje PH super crva bilo najslabije i iznosilo je 6,90%. U prethodnim istraživanjem izolovani su pojedini AMP, za koje se ispostavilo da imaju antimikrobno delovanje na gram pozitivne bakterije. Ovi AMP su identifikovani kao sarkotoksin, hifancin i enboncin (Poppel i sar., 2015). S obzirom da u ovom istraživanju nije izvršena identifikacija AMP, može se samo pretpostaviti da su možda upravo ovi AMP imali ulogu u redukciji rasta *S. epidermidis*. U poređenju sa antimikrobnim dejstvom na *E. coli*, sva tri PH ispoljila su jače antimikrobno delovanje na *S. epidermidis*. S obzirom da je gradacija delovanja ista kao i u slučaju *E. coli*, može se zaključiti da ukupna koncentracija proteina ima veliki uticaj na antimikrobno delovanje hidrolizata.



Slika 50. Izgled Petri ploča nakon perioda inokulacije *S. epidermidis* u 2 koncentracije a) 10⁴ CFU mg/ml i b) 10³ CFU mg/ml u periodu od 24h. K-kontrola (bez proteinskog hidrolizata), TM-proteinski hidrolizat crva brašnara, ZM-proteinski hidrolizat super crva, AD-proteinski hidrolizat popaca

Poznato je da bakterija *Staphylococcus aureus* patogena i može da izazove različite vrste infekcija i bolesti čoveka i životinja (Stengler i sar., 2011; Snyder i sar., 2014; Shah, 2016). Isto tako, poznato je da je ova bakterija razvila rezistentnost na gotovo sve poznate komercijalne antibiotike (Ma i sar., 2019). Naučnici širom sveta se susreću sa pritiskom javnosti da se što pre otkriju adekvatne zamene za sintetičke antibiotike, koji neće razvijati rezistentnost kod bakterija. Imajući u vidu sve veću rezistentnost bakterija na široki dijapazon antibiotika u svetu, primena insekata u prehrambenoj, industriji hrane za životinje i farmaceutskoj industriji bi moglo da bude jedno od potencijalnih rešenja u budućnosti. Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji PH crva brašnara, super crva i popaca bi potencijalno u budućnosti mogli da se koriste u prehrambenoj, industriji hrane za životinje, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji ne samo u svojstvu hranljivih i nutritivno bogatih sirovina, već i zbog svojih antibiotskih svojstava u cilju redukcije rasta nepoželjnih bakterijskih sojeva.

6. Zaključak

Cilj ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj uzgoja različitih vrsta insekata na nutritivni sastav ineskatskog brašna i potencijalnu primenu u ishrani životinja. Na osnovu dobijenih rezultata, doneti su sledeći zaključci:

- Najveći prinos u toku uzgoja insekata je postignut za larve crva brašnara i iznosio je 178,41-323,68 g. Uzgoj super crva je bio komplikovaniji u odnosu na crva brašnara, usled specifičnih uslova koji zahteva, te je bilo potrebnouložiti dodatni manuelni radi, kako bi se nastavio proces razmnožavanja ovih insekata, . Najkraći period za uzgoj odraslih jedinki bio je potreban u slučaju popaca, ujedno uz najmanje uloženog manuelnog rada tokom samog uzgoja. Na osnovu rezultata može se zaključiti da je najbolji prinos postignut za larve crva brašnara u periodu od 104 dana gajenja. Najbolji prinos popaca se postiže kada se popci hrane mešavinom šargarepe, kupusa i semena lana u periodu od 67 dana.
- Brašno od crva brašnara, super crva i popaca predstavlja bogatu proteinsku sirovinu. Sadržaj proteina u brašnu crva brašnara i super crva se kretao od 44,57 do 56,22%, dok je sadržaj proteina u brašnu popaca bio iznad 70%. Na osnovu navednog, može se zaključiti da se sve tri vrste brašna mogu koristiti u različitim formulacijama u ishrani životinja kao izvor alternativnih proteina, gde u potpunosti mogu da zamene sojinu sačmu i delimično riblje brašno.
- Dodatak kupusa u ishrani super crva u periodu gajenja od 97 dana, značajno može da poveća sadržaj proteina u brašnu super crva. Dodatak šargarepe i mešavine šargarepe, lana i kupusa u periodu gajenja od 74 dana imao je pozitivan uticaj na sadržaj proteina u brašnu popaca.
- Svarljivost proteina u sve tri vrste brašna je bila iznad 80%, čime se ova brašna svrstavaju u veoma pogodna hraniva u ishrani životinja. Suplementacija kupusom u ishrani popaca (period gajenja od 74 dana) i super crva (period gajenja od 90 dana) pozitivno utiče na svarljivost proteina u brašnu dobijenog od ovih vrsta insekta.
- Brašno popaca sadržalo je najmanju količinu masti i to od 17,05 do 24,44%. U brašnu crva brašnara sadržaj je iznosio od 24,83 do 33,54%, dok je najveći sadržaj masti zabeležen u brašnu super crva i to u udeu od 32,35 do 44,48%. Veći sadržaj masti u

- brašnu super crva i crva brašnara čini ove insekte pogodnom sirovinom za dobijanje ulja u industriji hrane za životinje, jer im se sadržaj kreće od 24,83 do 44,48%.
- Dodatak šargarepe u ishranu crva brašnara u periodu uzgoja od 104 dana, uticao je na smanjenje sadržaja masti u brašnu ovog insekta. Ishrana popaca obogaćena kupusom povećala je sadržaj masti u brašnu ovog insekta.
 - Sadržaj sirovih vlakana u sve tri vrste brašna insekata je nizak te se zbog toga hitin, koji je najviše zastupljen u okviru sirovih vlakana ne može posmatrati kao antinutrijent. Suprotno, u malim količinama, zbog njegovih prebiotskih osobina može imati pozitivna svojstva na digestivni trakt i zdravlje životinja.
 - Ishrana bogata semenom lana, šargarepe i kupusa imala je pozitivan uticaj na sadržaj sirovih vlakana u brašnu popaca bez obzira na starost popaca. U slučaju brašna super crva i crva brašnara, ishrana obogaćena šargarepom u periodu od 97 dana pozitivno je uticala na sadržaj sirovih vlakana u oba brašna.
 - U sve tri vrste insekatskog brašna sadržaj pepela je bio niži u odnosu na sadržaj pepela u sojinoj sačmi i ribljem brašnu, i bio je u okvirnim granicama je propisanim Pravilnikom o kvalitetu hrane za životinje (Sl. glasnik RS 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015 i 39/2016) i Evropska Regulative EC No 767/2009.
 - Smanjen sadržaj pepela u brašnu super crva je zabeležen kada su larve super crva hranjene mešavinom lana, šargarepe i kupusa u periodu od 104 dana gajenja, dok je negativan uticaj na sadržaj pepela u brašnu popaca imala suplementacija šargarepe u ishrani popaca u periodu od 60 dana gajenja.
 - Sva tri brašna insekata imala su poželjan aminokiselinski sastav. Sadržaj esencijalnih amino kiselina u ukupnim amino kiselinama u brašnu crva brašnara i super crva se kretao od 38,52 do 40,04%, dok je sadržaj u brašnu popaca od 34,14 do 35,15%. Najzastupljenije esencijalne aminokiseline u sva tri brašna su bile leucin, lizin i valin. Metionin je bio limitirajuća amino kiselina za sve tri vrste brašna i bila bi neophodna suplementacija ove aminokiseline u toku izrade receptura u ishrani životinja.
 - Dodatak šargarepe u ishrani crva brašnara pozitivno je uticao na sadržaj treonina, metionina, lizina i tirozina, dok negativno utičeao na sadržaj valina, leucina, izoleucina i histidina u brašnu crva brašnara. Pozitivan uticaj na sadržaj leucina, histidina, valina i izoleucina u brašnu super crva imala je suplementacija kupusom u periodu od 97 dana

gajenja. Ishrana bogata šargarepom u periodu od 60 dana gajenja popaca, imala je pozitivan uticaj na sadržaj valina, leucina, lizina i fenilalanina, a negativan na sadržaj histidine u brašnu ovog insekta u period od 67 dana gajenja.

- Mineralni sastav brašna sve tri vrste insekta je pogodan u ishrani životinja sa zadovoljavajućim sadržajem fosfora u količini od 547,17 do 1024 mg/100g i malim sadržajem gvožđa, cinka, mangana i bakra. Sva tri brašna od insekata su deficitarna u pogledu sadržaja kalcijuma. Najveći sadržaj kalcijuma imalo je brašno popaca i kretalo se se u vrednostima od 66,09 do 98,21 mg/100g. Dodatak kupusa u ishrani super crva povećalo je sadržaj kalcijuma u brašnu ovog insekta. Suplementacijamešavine semena lana, šargarepe i kupusa u ishrani popaca pozitivno je uticala na sadržaj kalcijuma, magnezijuma i fosfora u brašnu ovog insekta u periodu gajenja od 60 i 67 dana.
- Na osnovu osnovnih hemijskih analiza može se izvesti zaključak da sva tri brašna mogu u potpunosti da zamene sojinu sačmu i delimično riblje brašno u formulacijama za ishranu životinja.
- Ulje larvi sva tri insekata je bogato esencijlanom linolnom kiselinom. Dodatkom semena lana u ishranu sve tri insekatske vrste značajno je povećalo sadržaj linolenske kiseline, i do 10 puta. Samim tim i odnos n6/n3 je bio manji od 4 što se smatra veoma pogodnim za ljudsko zdravlje.

Na osnovu optimizacije uslova gajenja insekata može se zaključiti da je:

- Optimalan sastav brašna od larvi insekata dobijen u slučaju kada je super crv hranjen mešavinom kupusa, šargarepe i semena lana u periodu od 104 dana gajenja.
- Optimalan sastav brašna od popaca dobijen je u slučaju kada su popci hranjeni mešavinom kupusa, šargarepe i semena lana u periodu od 60 dana gajenja.

Drugi deo doktorske disertacije je imao za cilj da optimizuje proces izolacije proteina i da utvrdi njihove tehno-funkcionalne i bioaktivne osobine kako bi se ispitala moguća primena u prehrambenoj i industriji hrane za životinje. Na osnovu rezultata može se zaključiti sledeće:

- pH vrednost je imala uticaj na prinos dobijenog proteinskog izolata. Optimalnim podešavanjem pH vrednosti, prinosi proteinskog izolata su povećani za 50-70%.

Optimalne vrednosti pH ekstrakcije i precipitacije proteina za izolaciju proteina iz brašna crva brašnara, super crva i popaca iznosi 11 i 4, respektivno.

- Sadržaj proteina u PI insekata se kretao u vrednostima od 59,85 do 68,88%. Procesom prečišćavanja PI u svim uzorcima, izuzev PI popaca, povećan je sadržaj proteina. Modifikacijom klasične metode sadržaj proteina je povećan za 6,6% u slučaju PI crva brašnara (74,98%), za 5,4% u slučaju PI super crva (65,29%), dok je u slučaju PI popaca sadržaj proteina ostao nepromenjen (68,88%).

Na osnovu karakterizacije proteinskih izolata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Proteinski izolat super crva sadržavao je najveću količinu aminokiselina (76,55%), dok je najmanji sadržaj utvrđen u izolatu popaca (44,80%). Najveći sadržaj esencijalnih aminokiselina je utvrđen u proteinskom izolatu super crva (31,99%), dok je skoro duplo manje utvrđeno u PI popaca (16,59%). Najzastupljenije esencijalne aminokiseline u svim proteinskim izolatima su bile valin, leucin, izoleucin i lizin. Limitirajuća aminokiselina kao i u slučaju brašna od insekata je bila metionin. Međutim, za razliku od brašna insekata, fenilalanin nije detektovan ni u jednom uzorku. S obzirom na to da je u brašnu insekata detektovan fenilalanin, može se pretpostaviti da je alkalna ekstrakcija uticala na smanjenje količine fenilalanina. Najzastupljenije neesencijalne aminokiseline su bile asparaginska i glutaminska u svim uzorcima, dok je tirozin nešto zastupljenija bio u PI super crva u odnosu na druga dva PI.
- Proteinski profil super crva i crva brašnara je bio veoma sličan, što ukazuje na njihovu sličnu genetiku. Za sva tri elektroforetska profila PI karakteristične su bile linije koje prikazuju proteine male molekulske mase (ispod 14 kDa), poznate po svojim bioaktivnim osobinama.

Na osnovu funkcionalnih osobina proteinskih izolata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U kiseloj sredini sva tri PI su, slabo rastvorljiva, dok su u alkalnoj veoma rastvorljiva. Krive rastvorljivosti za PI crva brašnara i popaca su veoma slične, dok se u slučaju popaca kriva rastvorljivosti razlikovala. Najveća razlika je pronađena u alkalnoj

sredini, gde su proteini super crva bili manje rastvorljivi u odnosu na druga dva proteinska izolata.

- Na osnovu dobijenih rezultata za kapacitet vezivanja vode/ulja sva tri PI insekata mogu naći primenu u prehrambenoj industriji, kao alternativa komercijalnim proteinima. Međutim, u industriji hrane za životinje, neophodno je uzeti u obzir sve faktore i ekonomsku isplativost proizvodnje. Na osnovu toga se dalje može zaključiti da li je ekonomski isplativa upotreba PI, ili pak upotreba brašna od insekata može zadovoljiti kvalitativne i ekonomske zahteve proizvodnje i upotrebu u industriji hrane za životinje.

Na osnovu bioloških osobina proteinskih izolata i hidrolizata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Dobijeni rezultati za sva tri PI dobijena iz insekata pokazuju visoku antioksidativnu aktivnost. Elektroforetskim profilom je pokazano da sva tri PI sadrže proteine i peptide molekulske mase ispod 14 kDa, koji su poznati po svojim bioaktivnim osobinama, poput antioksidativne aktivnosti. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da visoka antioksidativna aktivnost PI svrstava ove insekte u prirodne izvore antioksidativnih proteina i peptida, koji mogu naći široku primenu u prehrambenoj, industriji hrane za životinje, pa i farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.
- Ni jedan PI nije ispoljio antimikrobnu aktivnost na bakterije *E. coli* i *S. epidermis*. Može se pretpostaviti da iako prisutne, male proteinske frakcije se ne nalaze u dovoljnoj količini da bi mogle da ispolje antimikrobnu aktivnost.
- Primenom enzima proteaze, najveći stepen hidrolize je postignut za PI super crva i iznosio je 22,4%. U slučaju PI crva brašnara i popaca, DH se nije razlikovao u mnogome i iznosio je 7,32 i 9,83%.
- Na elektroforetskom profilu nakon enzimske hidrolize uočavaju se trake ispod 29 kDa, gde se ne primećuju trake većih molekulske mase proteina, što ukazuje na enzimsku razgradnju velikih molekula proteina i uspešnost enzimske hidrolize.
- PH sva tri insekta pokazuju inhibitorno delovanje na rast bakterija *E. coli* i *S. epidermidis*. Najveća redukcija rasta bakterije *E. coli* je dobijena delovanjem PH popaca i to 6,74%, dok je najmanja dobijena delovanjem PH super crva i to 2,30%. Dok je u slučaju PH crva brašnara redukcija rasta 5,19%. Redukcija rasta gram pozitivne bakterije *S. epidermidis* je bila jače izražena delovanjem sva tri PH. Najjaču

antimikrobnu aktivnost imao je PH popaca i to 11,20%, zatim PH crva brašnara i to u vrednosti od 10,20%, dok je antimikrobno delovanje PH super crva bilo najslabije i iznosilo je 6,90%.

- Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj doktorskoj disertaciji PH crva brašnara, super crva i popaca bi potencijalno u budućnosti moglo da se koriste u prehrambenoj, industriji hrane za životinje, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji ne samo u svojstvu hranljivih i nutritivno bogatih sirovina, već i zbog svojih antibiotkskih svojstava u cilju redukcije rasta nepoželjnih bakterijskih sojeva.

7. Literatura

Adámková, A., Kouřimská, L., Borkovcová, M., Kulma, M., Mlček, J. 2016. Nutritional values of edible Coleoptera (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* and *Alphitobius diaperinus*) reared in the Czech Republic. *Potravinarstv*, 10(1), 663-671.

Adebiyi, A.P., Aluko, R.E. 2011. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*, 128, 902-908.

Akinkunmi, E.O., Adeyemi, O.I., Igbeneghu, O.A., Olaniyan E.O., Omonisi, A.E., Lamikanra, A. 2014. The pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* on the intestinal organs of rats and mice: an experimental investigation. *BMC Gastroenterol*, 14, 126.

Akinkunmi, E.O., Lamikanra, A. 2012. Phenotypic determination of some virulence factors in staphylococci isolated from faecal samples of Nigerian children. *African Journal of Biomedical Research*, 15, 123-128.

Alfiko, Y., Xie, D., Astuti, R.T., Wong, J., Wang, L. 2021. Insects as a feed ingredient for fish culture: Status and trends. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2), 166-178.

Al-Kahtani, H.A., Abou-Arab, A.A. 1993. *Cereal Chemistry*, 70, 619–626.

Allegretti, G., Talamini, E., Schmidt, V., Bogorni, P. C., Ortega, E. 2018. Insect as feed: An energy assessment of insect meal as a sustainable protein source for the Brazilian poultry industry. *Journal of Cleaner Production*, 171, 403-412.

Alonso, R., Rubio, L. A., Muzquiz, M., Marzo, F. 2001. The effect of extrusion cooking on mineral bioavailability in pea and kidney bean seed meals. *Animal Feed Science and Technology*, 94(1-2), 1-13.

Alves, A.P.D.C., Paulino, R.R., Pereira, R.T., Costa, D.V.D., Rosa, P.V. 2020. Nile tilapia fed insect meal: growth and innate immune response in different times under lipopolysaccharide challenge. *Aquaculture Research*, 52(2), 529–540.

and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1285-1297.

Anderson, S.J. 2000. Increasing calcium levels in cultured insects. *Zoo Biol*, 19, 1–9,

Ankamah-Yeboah, I., Jacobsen, J. B., Olsen, S.B. 2018. Innovating out of the fishmeal trap: The role of insect-based fish feed in consumers' preferences for fish attributes. *British Food Journal*, 120, 2395–2410.

Antonopoulou, E., Nikouli, E., Piccolo, G., Gasco, L., Gai, F., Chatzifotis, S., Mente, E., Kormas, K.A. 2019. Reshaping gut bacterial communities after dietary *Tenebrio molitor* larvae meal supplementation in three fish species. *Aquaculture*, 503, 628–635.

- Ao, X., Yoo, J.S., Wu, Z.L., Kim, I.H. 2020. Can dried mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae replace fish meal in weaned pigs? *Livestock Science*, 239, 104103.
- Ao, X., Yoo, J.S., Wu, Z.L., Kim, I.H. 2020. Can dried mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae replace fish meal in weaned pigs?. *Livestock Science*, 239, 104103.
- Apri, A.D., Komalasari, K. 2020. Feed and animal nutrition: insect as animal feed. *International Conference: Improving Tropical Animal Production for Food Security*, 465, 1-10.
- Araújo, R. R. S., dos Santos Benfica, T.A.R., Ferraz, V P., Santos, E.M. 2019. Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76, 22-26.
- Areerat, S., Chundang, P., Lekcharoensuk, C., Kovitvadhi, A. 2021. Possibility of using house cricket (*Acheta domesticus*) or mulberry silkworm (*Bombyx mori*) pupae meal to replace poultry meal in canine diets based on health and nutrient digestibility. *Animals*, 11(9), 2680.
- Aryee, A.N.A., Agyei, D., Udenigwe, C.C. 2018. Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In *Proteins in food processing*. 27-45. Woodhead Publishing.
- Asgar, M., Fazilah, A., Huda, N., Bhat, R. Karim, A. 2010. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safty*, 9(5), 513-529.
- Asimi O.A., Sahu N.P., Pal A.K. 2013. Antioxidant activity and antimicrobial property of some Indian spices. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(3), 1-8.
- Association of Analytical Communities (AOAC) 1998. *Official Methods of Analysis* (16th ed.). Gaithersburg, MD, USA.
- Association of Analytical Communities (AOAC) 1999. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed., 5th rev., Method 971.09. Gaithersburg, MD, USA.
- Azagoh, C., Ducept, F., Garcia, R., Rakotozafy, L., Cuvelier, M.E., Keller, S., Lewandowski, R., Mezdoor, S. 2016. Extraction and physicochemical characterization of *Tenebrio molitor* proteins. *Food Research International*, 88, 24-31.
- Backwell, L.R., d'Errico, F. 2001. Evidence of termite foraging by Swartkrans early hominids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1358-1363.
- Baiano, A. 2020. Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 35-50.
- Bang, K., Park, S., Yoo, J.Y., Cho, S. 2012. Characterization and expression of attacin, an antibacterial protein-encoding gene, from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)(Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). *Molecular biology reports*, 39(5), 5151-5159.

- Banjac, V., Vukmirović, Đ., Pezo, L., Draganovic, V., Đuragić, O., Čolović, R. 2021. Impact of variability in protein content of sunflower meal on the extrusion process and physical quality of the extruded salmonid feed. *Journal of Food Process Engineering*, 44(3), e13640.
- Barroso, F.G., de Haro, C., Sánchez-Muros, M.J., Venegas, E., Martínez-Sánchez, A., Pérez-Bañón, C. 2014. The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture*, 422, 193-201.
- Bawa, M., Songsermpong, S., Kaewtapee, C., Chanput, W. 2020. Effect of diet on the growth performance, feed conversion, and nutrient content of the house cricket. *Journal of Insect Science*, 20(2), 10.
- Belforti, M., Gai, F., Lussiana, C., Renna, M., Malfatto, V., Rotolo, L., De Marco, M., Dabbou, S., Schiavone, A., Zoccarato, I., Gasco, L. Tenebrio molitor meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: Effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of fillets. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), 4170.
- Belghit, I., Lock, E. J., Fumière, O., Lecrenier, M. C., Renard, P., Dieu, M., Berntssen H.G., Palmbald, M., Rasinger, J. D. 2019. Species-specific discrimination of insect meals for aquafeeds by direct comparison of tandem mass spectra. *Animals*, 9(5), 222.
- Benzertiha, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Józefiak, A., Kozłowski, K., Jankowski, J., Józefiak, D. 2019. Tenebrio molitor and Zophobas morio full-fat meals in broiler chicken diets: effects on nutrients digestibility, digestive enzyme activities, and cecal microbiome. *Animals*, 12, 1128.
- Benzertiha, A., Kierończyk, B., Kołodziejski, P., Pruszyńska-Oszmałek, E., Rawski, M., Józefiak, D., Józefiak, A. 2020. Tenebrio molitor and Zophobas morio full-fat meals as functional feed additives affect broiler chickens' growth performance and immune system traits. *Poultry Science*, 99(1), 196–206.
- Benzertiha, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Mikołajczak, Z., Urbański, A., Nogowski, L., Józefiak, D. 2020b. Insect fat in animal nutrition—a review. *Annals of Animal Science*, 20(4), 1217-1240.
- Bernacchia, R., Preti, R., Vinci, G. 2014. Chemical composition and health benefits of flaxseed. *Austin Journal of Nutritional Food Science*, 2(8), 1045.
- Biasato, I., De Marco, M., Rotolo, L., Renna, M., Lussiana, C., Dabbou, S., Capucchio, E., Biasibetti, E., Costa, P., Gai, F., Pozzo, L., Dezzutto, D., Bergagna, S., Martinez, S., Tarantola, M., Gasco, L., Schiavone, A. 2016. Effects of dietary Tenebrio molitor meal inclusion in free-range chickens. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(6), 1104-1112.
- Biasato, I., Gasco, L., De Marco, M., Renna, M., Rotolo, L., Dabbou, S., Capucchio, M.T., Biasibetti, E., Tarantola, M., Sterpone, L., Cavallarini, L., Gai, F., Pozzo, L., Bergagna, S., Dezzutto, D., Zoccarato, I., Schiavone, A. 2018. Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) inclusion in diets for male broiler chickens: effects on growth performance, gut morphology, and histological findings. *Poultry Science*, 97(2), 540-548.

Bjørge, J.D., Overgaard, J., Malte, H., Gianotten, N., Heckmann, L.H. 2018. Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. *Journal of insect physiology*, 107, 89-96.

Blackwell, L.R., d'Errico, F. 2001. Evidence of termite foraging by Swartkrans early hominids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 1358-1363.

Bojarska, J., Kaczmarek, K., Zabrocki, J., Wolf, W.M. 2018. Supramolecular chemistry of modified amino acids and short peptides. *Advances in Organic Synthesis*, 11, 43-107.

Boman, H.G., Nilsson-Faye, I., Paul, K., Rasmuson J.T. 1974. Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and immunity*, 10(1), 136-145.

Bosch, G., Zhang, S., Oonincx, D. G., Hendriks, W. H. 2014. Protein quality of insects as potential ingredients for dog and cat foods. *Journal of Nutritional Science*, 3, e29.

Boulos, S., Tännler, A., Nyström, L. 2020. Nitrogen-to-protein conversion factors for edible insects on the swiss market: *T. molitor*, *A. domesticus*, and *L. migratoria*. *Frontiers in Nutrition*, 7, 89.

Bovera, F., Piccolo, G., Gasco, L., Marono, S., Loponte, R., Vassalotti, G., Mastellone, V., Lombardi, P., Attia, Y.A. Nizza, A. 2015. Yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*, L.) as a possible alternative to soybean meal in broiler diets. *British poultry science*, 56(5), 569-575.

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S. H. 2010. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2), 537-546.

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.

Bryant, C. W. 2008. How entomophagy works? <https://people.howstuffworks.com/entomophagy.htm>. pristupljeno poslednji put: april 2022.

Bulet, P., Stocklin, R. 2005. Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein and peptide letters*, 12(1), 3-11.

Bußler, S., Rumpold, B. A., Jander, E., Rawel, H. M., Schlüter, 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.

Cabarello, B., Finglas, P., Toldra, F. 2003. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2. izd., 181-213, Academic Press, Maryland.

- Caligiani, A., Marseglia, A., Sorci, A., Bonzanini, F., Lolli, V., Maistrello, L., Sforza, S. 2019. Influence of the killing method of the black soldier fly on its lipid composition. *Food Research International*, 116, 276-282.
- Canadian Food Inspection Agency (CFIA). 2018. *Bacterial Pathogens in Edible Insects*; CFIA: Otava, ON, Canada, 9.
- Carlsson, A., Engstrom, P., Palva, E.T., Bennich, H. 1991. Attacin, an antibacterial protein from *Hyalophora cecropia*, inhibits synthesis of outer membrane proteins in *Escherichia coli* by interfering with *omp* gene transcription. *Infection and Immunity*, 59(9), 3040–3045.
- Chi, E.Y., Krishnan, S., Randolph, T.W., Carpenter, J.F. 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical research*, 20(9), 1325-1336.
- Choi, Y.S., Choi, J.H., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, H.W., Kim, C. J. 2011. Effects of rice bran fiber on heat-induced gel prepared with pork salt-soluble meat proteins in model system. *Meat Science*, 88(1), 59-66.
- Chung, T.H., Park, C., Shin, G.W., Kim, J.M., Kim, S.H., Kim, N. 2015. Nutritive advantage of mealworm (*Tenebrio molitor*) in the diet of White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). In *Proceedings of the ICAFAS 2015: International Conference on Agricultural, Food and Animal Sciences*, 29-30. Jul 2015. Ciriš, Švajcarska.
- Cicero, A.F., Fogacci, F., Colletti, A. 2017. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1378-1394.
- CLSI M07. 2018. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Ed11. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collavo, A., Glew, R.H., Huang, Y.S., Chuang, L.T., Bosse, R., Paoletti, M.G. 2005. House cricket small-scale farming. Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails, 519-544, Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Cortes Ortiz, J.A., Ruiz, A.T., Morales-Ramos, J.A., Thomas, M., Rojas, M.G., Tomberlin, J.K., Yi, L., Han, R., Giroud, L., Jullien, R.L. 2016. *Insect Mass Production Technologies. U Insects as Sustainable Food Ingredients*; Dossey, A.T., Morales-Ramos, J., Guadalupe Roja, M., Eds. 154-201. Academic Press. San Diego, USA.
- Cozzolino, A., Rossi, S., Conforti, A. 2012. Agile and lean principles in the humanitarian supply chain: The case of the United Nations World Food Programme. *Journal of Humanitarian Logistics and Supply Chain Management*, 2(1), 16-33.
- Craig, J.M. 2021. Additives in pet food: are they safe?. *Journal of Small Animal Practice*, 62(8), 624-635.

Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., Pezo, L. 2019. Antibiofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. *Biofouling*, 35(3), 361-375.

Čakarević J., Vidović S., Vladić J., Gavarić A., Jokić S., Pavlović N., Blažić M., Popović Lj. 2019. Production of bio-functional protein through revalorization of apricot kernel cake. *Foods*, 8, 318.

Čakarević, J. 2021. In vitro digestija i njen uticaj na aktivnost, stabilnost i dostupnost biološki aktivnih jedinjenja. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.

Čolović, R., Vukmirović, Đ., Ivanov, D., Lević, J., Jovanović, R., Kokić, B., Sredanović, S., Đuragić, O., Spasevski, N., How does oil addition in main mixer influence physical properties of trout feed? Novi Sad, 19. – 21. Oktobar, 2010 Extrusion technology in feed and food processing 2nd Workshop FEED-TO-FOOD FP7 REGPOT-3 Extrusion technology in feed and food processing thematic proceeding.

Das, K. 2020. Entomophagy in Africa. In African edible insects as alternative source of food, oil, protein and bioactive components. 53-58. Springer Nature.

Dastider, D., Jyoti S., Kumar, M., Bose, S., Ray, S., Mahanti, B. 2020. Hand sanitizers bid farewell to germs on surface area of hands. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 7, 648-656.

Derrien, C., Boccuni, A. 2018. Current status of the insect producing industry in Europe. In *Edible insects in sustainable food systems*, 471-479. Springer Cham.

Deutsch, L., Gräslund, S., Folke, C., Huitric, M., Kautsky, N., Troell, M., Lebel, L., 2007. Feeding aquaculture growth through globalization; exploitation of marine ecosystems for fishmeal. *Global Environmental Change*, 17, 238–249.

Dinić, B., Djordjević, N., Radović, J., Terzić, D., Andjelković, B., Blagojević, M. 2011. Trends in legumes ensilaging. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 27(4), 1551-1561.

Dobermann, D., Michaelson, L., Field, L.M. 2018. The effect of an initial high-quality feeding regime on the survival of *Gryllus bimaculatus* (black cricket) on bio-waste. *Journal of Insects as Food and Feed*, 5(2), 117-123.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107, 1485-1493.

Dossey, A.T. 2010. Insects and their chemical weaponry: new potential for drug discovery. *Natural product reports*, 27(12), 1737-1757.

Dossey, A.T., Tatum, J.T., McGill, W.L. 2016. Modern insect-based food industry: current status, insect processing technology, and recommendations moving forward. In *Insects as sustainable food ingredients*, 113-152, Academic Press.

Dragojlović, D., Đuragić, O., Pezo, L., Popović, L., Rakita, S., Tomičić, Z., Spasevski, N. 2022. Comparison of Nutritional Profiles of Super Worm (*Zophobas morio*) and Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) as Alternative Feeds Used in Animal Husbandry: Is Super Worm Superior? *Animals*, 12(10), 1277.

Dragojlović, D., Pezo, L., Čolović, D., Vidosavljević, S., Pezo, M. L., Čolović, R., Kokić, B., Đuragić, O. 2019. Application of soybean oil and glycerol in animal feed production, ANN model. *Acta Periodica Technologica*, 50, 51-58.

Dragojlović, D., Popović Lj, Čakarević S., Spasevski N., Rakita S., Čolović D., Đuragić O. 2021. Determination of protein oxidation in aquaculture feed. *Food and Feed Research*, 48(2), 175-184.

Durst, P.B., Hanboonsong, Y., 2015. Small-scale production of edible insects for enhanced food security and rural livelihoods: experience from Thailand and Lao People's Democratic Republic. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(1), 25-31.

Džamić M.1990. *Biohemija*. 1-885, IRO Naučna knjiga, Beograd, SFRJ.

Đuragic, O., Levic, J., Sredanovic, S., Levic, L. 2009. Evaluation of homogeneity in feed by method of microtracers®. *Archiva Zootechnica*, 12(4), 85-91.

Đuragić, O., Čabarkapa, I., Čolović, R. 2017. Analysis of potential risks in feed production as an integral part of food chain. *Agrolife Scientific Journal*, 6(2), 97-102.

Đuragić, O., Čolović, D., Lević, J., Sredanović, S., Čolović, R., Vukmirović, Đ., Kokić, B., Determination of the Effects and Type of Liquid Additives on Mixture Homogeneity in Various Mixers, 15 International Feed Technology Symposium „Feed TO FOOD“7 Cost feed for health joint Workshop, Novi Sad: Naučni Institut za prehrambene tehnologije, 3-5 October, 2012, pp 346-351

Đuragić, O., Čolović, R., Banjac, V., Kokić, B., Čabarkapa, I. Popović, S. 2019. The future of alternative protein use in animal nutrition, Proc. 31st National conference processing and energy in agriculture 7-12. Aprila 2019., Kladovo, Srbija.

Đuragić, O., Rakita, S., Dragojlović, D. 2021. The possibilities of alternative protein use in animal nutrition. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 854, 012026. IOP Publishing.

EC, Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council of 13 July 2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council

EFSA Scientific Committee. 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA journal*, 13(10), 4257.

- Eim, V.S., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., Bon, J. 2013. Optimisation of the addition of carrot dietary fibre to a dry fermented sausage (sobrassada) using artificial neural networks. *Meat Science*, 94, 341-348.
- Elpidina, E.N., Tsybina, T.A., Dunaevsky, Y.E., Belozersky, M.A., Zhuzhikov, D.P., Oppert, B. 2005. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*, 87(8), 771-779.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I.M. 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38, 1015-1019.
- Eriksson, T., Picard, C.J. 2021. Genetic and genomic selection in insects as food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5), 661-682.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and protein requirements. In Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. Geneva, Switzerland: Food and Agriculture Organization, World Health Organization and the United Nations University
- Fathollahy, I., Farmani, J., Kasaai, M.R., Hamishehkar, H. 2021. Characteristics and functional properties of Persian lime (*Citrus latifolia*) seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *LWT*, 140, 110765.
- Faye, I., Pye, A., Rasmuson, T., Boman, H. G., Boman, I. A. 1975. Insect immunity. 11. Simultaneous induction of antibacterial activity and selection synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia*. *Infection and immunity*, 12(6), 1426-1438.
- Fernandez-Cassi, X., Supeanu, A., Vaga, M., Jansson, A., Boqvist, S., Vagsholm, I. 2019. The house cricket (*Acheta domesticus*) as a novel food: a risk profile. *Journal of Insects as Food and Feed*, 5(2), 137-157.
- Finke, M. D. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo biology: published in affiliation with the American zoo and aquarium association*, 26(2), 105-115.
- Finke, M.D. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21 (3), 269-285
- Finke, M.D. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, 105–115.
- Finke, M.D. 2013. Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo biology*, 32(1), 27-36.
- Finke, M.D. 2015. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biology*, 34(6), 554–564.
- Flores, D.R., Casados, L.E., Velasco, S.F., Ramírez, A.C., Velázquez, G. 2020. Comparative study of composition, antioxidant and antimicrobial activity of two adult edible insects from Tenebrionidae family. *BMC chemistry*, 14(1), 1-9.

Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., Oconnell, C., Ray, D.K., West, P.C., Balzer, C., Bennett, E.M., Carpenter, S.R., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockstrom, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D. P. 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature*, 478(7369), 337-342.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2011. Global food losses and food waste – extent, causes and prevention. FAO, Rim, Italija.

Friederich, U., Volland, W. 2004. *Breeding Food Animals: Live Food for Vivarium Animals*. Krieger publishing company. Malabar, Florida, USA.

Fursova, V.N., Cherney, L.S. 2018. *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775)-New genus and species of darkling beetles (Coleoptera, Tenebrionidae) for the fauna of Ukraine. *Ukrainian Entomological Journal*, 14(1), 10-24.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G., 2013. *Tackling Climate Change Through Livestock – A Global Assessment of Emissions and Mitigation Opportunities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rim, Italija.

Ghaly, A.E., Alkoaik, F.N. 2009. The yellow mealworm as a novel source of protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(4), 319-331.

Ghosh, S., Lee, S.-M., Jung, C., Meyer-Rochow, V. 2017. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 686-694,

Goldberg, D.E. 1989. *Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning*. 1st ed. Boston, MA, USA: Addison-Wesley Longman Publishing Co., Inc.

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

Graham, L.A., Liou, Y.C., Walker, V.K., Davies, P.L. 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 388(6644), 727-728.

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

Halloran, A., Roos, N., Hanboonsong, Y. 2017. Cricket farming as a livelihood strategy in Thailand. *The Geographical Journal*, 183(1), 112-124.

Hancock, R.E., Sahl, H.G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), 1551-1557.

Harsányi, E., C, Juhász, E, Kovács, L, Huzsvai, R, Pintér, G, Fekete, Z, I, Varga, L, Aleksza, C, Gyuricza, 2020, Evaluation of organic wastes as substrates for rearing *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, and *Acheta domesticus* larvae as alternative feed supplements, *Insects* 11: 604

- Hartfelder, K. 2000. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 157-177.
- Heidari-Parsa, S. 2018. Determination of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) nutritional value as an animal and human food supplementation. *Arthropods*, 7(4), 94.
- Hemsted, W.R.T. 1947. Locusts as a protein supplement for pigs. *East African Agricultural Journal*, 12, 225-226.
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G., Fountoulaki, E. 2015. Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology*, 203, 1-22
- Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *Journal of Biotechnology*, 104, 155-172.
- Hong, J., Han, T., Kim, Y. Y. 2020. Mealworm (*Tenebrio molitor* Larvae) as an alternative protein source for monogastric animal: A review. *Animals*, 10(11), 2068.
- Hong, J.W., Kim, O.H., Jo, S.W., Do, J.M., Yoon, H.S. 2017. Microalgal biomass productivity and dominant species transition in a Korean mass cultivation system. *Algal research*, 26, 365-370.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., Boman, H.G. 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106(1), 7-16.
- Hunt, A.S., Ward, A.M., Ferguson, G. 2001. Effects of a high calcium diet on gut loading in varying ages of crickets (*Acheta domestica*) and mealworms (*Tenebrio molitor*). *Proceedings of the 4th conference on zoo and wildlife nutrition, Lake Buena Vista*, 94-99.
- Hussain, I., Khan, S., Sultan, A., Chand, N., Khan, R., Alam, W., Ahmad, N. 2017. Meal worm (*Tenebrio molitor*) as potential alternative source of protein supplementation in broiler. *Int. J. Biosci*, 10(4), 225-262.
- Hussein, M., Pillai, V.V., Goddard, J.M., Park, H.G., Kothapalli, K.S., Ross, D.A., Ketterings, Q.M., Brenna, J.T., Milstein, M.B., Marquis, H., Johnson, P.A., Nyrop, J. P., Selvaraj, V. 2017. Sustainable production of housefly (*Musca domestica*) larvae as a protein-rich feed ingredient by utilizing cattle manure. *PLoS One*, 12(2), e0171708.
- Iaconisi, V., Marono, S., Parisi, G., Gasco, L., Genovese, L., Maricchiolo, G., Bovera, F., Piccolo, G. 2017. Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: Effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture*, 476, 49-58.
- Ichikawa, T., Kurauchi, T. . 2009. Larval cannibalism and pupal defense against cannibalism in two species of tenebrionid beetles. *Zoological Science*, 26(8), 525–529.
- IFIF. 2012. International Feed Industry Federation. [dostupno na: www.ifif.org](http://www.ifif.org).

- Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Péter A. 2012. Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: a review. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 68, 826-829.
- Irungu, F. G., Mutungi, C. M., Faraj, A. K., Affognon, H., Kibet, N., Tanga, C., Ekesi, S., Nakimbugwe, D., Fiaboe, K. K. M. 2018. Physico-chemical properties of extruded aquafeed pellets containing black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae and adult cricket (*Acheta domesticus*) meals. *Journal of Insects as Food and Feed*, 4(1), 19-30.
- Islam, M.M., Yang, C.J. 2017. Efficacy of mealworm and super mealworm larvae probiotics as an alternative to antibiotics challenged orally with *Salmonella* and *E. coli* infection in broiler chicks. *Poultry Science*, 96(1), 27-34.
- Jabir, M.D., Razak, S.A., Vikineswary, S. 2012. Chemical Composition and Nutrient Digestibility of Super Worm Meal in Red Tilapia Juvenile. *Pakistan Veterinary Journal*, 32(4).
- Jajić, I., Popović, A., Urošević, M.I., Krstović, S., Petrović, M., Guljaš, D., Samardžić, M. 2020. Fatty and amino acid profile of mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.). *Biotechnology in Animal Husbandry*, 36(2), 167-180.
- Janssen, R., Vincken, J.P., van den Broek, L.A.M. Fogliano, V., Lakemond. C.M.M. 2017. Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus* and *Hermetia illucens*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 65, 2275-2278.
- Ji, Y.J., Liu, H.N., Kong, X.F., Blachier, F., Geng, M.M., Liu, Y.Y., Yin, Y.L. 2016. Use of insect powder as a source of dietary protein in early-weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 94(3), 111-116.
- Jia, J., Wu, Q., Yan, H., Gui, Z. 2015. Purification and molecular docking study of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from alcalase hydrolysate of ultrasonic-pretreated silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein. *Process Biochemistry*, 50(5), 876-883.
- Jin, X. H., Heo, P. S., Hong, J. S., Kim, N. J., Kim, Y. Y. 2016. Supplementation of dried mealworm (*Tenebrio molitor* larva) on growth performance, nutrient digestibility and blood profiles in weaning pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(7), 979.
- Jonas-Levi, A., Martinez, J.J.I. 2017. The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 184-188.
- Jones, S.W., Karpol, A., Friedman, S., Maru, B.T., Tracy, B.P. 2020. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture. *Current opinion in biotechnology*, 61, 189-197.
- Jongema, Y. 2017. List of edible insects of the world. Wageningen: Laboratory of Entomology, Wageningen University.
- Józefiak, A., Benzertiha, A., Kierończyk, B., Łukomska, A., Wesołowska, I., Rawski, M. 2020. Improvement of cecal commensal microbiome following the insect additive into chicken diet. *Animals*, 10, 577.

- Kar, S.K., Jansman, A.J., Boeren, S., Kruijt, L., Smits, M.A. 2016. Protein, peptide, amino acid composition, and potential functional properties of existing and novel dietary protein sources for monogastrics. *Journal of Animal Science*, 94(3), 30-39.
- Karlovic, S., Bosiljkov, T., Brncic, M., Jezek, D., Tripalo, B., Dujmic, F., Dzineva, I., Skupnjak, A. 2013. Comparison of artificial neural network and mathematical models for drying of apple slices pre-treated with high intensity ultrasound. *Bulgarian Journal of Agriculture and Science*, 19, 1372-1377.
- Khan, M.A., Abidi, S.F. 2014. Dietary histidine requirement of Singhi, *Heteropneustes fossilis* fry (Bloch). *Aquaculture Research*, 45(8), 1341-1354.
- Khan, R.H., Siddiqi, M.K., Salahuddin, P. 2017. Protein structure and function. *Basic biochemistry*, 5, 1-39.
- Khusro, M., Andrew, N. R., Nicholas, A. 2012. Insects as poultry feed: a scoping study for poultry production systems in Australia. *World's Poultry Science Journal*, 68(3), 435-446.
- Kierończyk, B., Rawski, M., Józefiak, A., Mazurkiewicz, J., Świątkiewicz, S., Siwek, M., Bednarczyk, M., Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Benzertiha, A., Józefiak, D. 2018. Effects of replacing soybean oil with selected insect fats on broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 240, 170–183.
- Kim, S.Y., Chung, T.H., Kim, S.H., Song, S., Kim, N. 2014. Recycling agricultural wastes as feed for mealworm (*Tenebrio molitor*). *Korean journal of applied entomology*, 53(4), 367-373.
- Kim, S.Y., Kim, H.G., Song, S.H., Kim, N.J. 2015. Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 30(2), 45-49.
- Klir, Z., Castro-Montoya, J. M., Novoselec, J., Molkontin, J., Domacinovic, M., Mioc, B., Dickhoefer, U., Antunovic, Z. Influence of pumpkin seed cake and extruded linseed on milk production and milk fatty acid profile in Alpine goats. *Animal*, 11(10), 1772-1778.
- Kojić, J.S., Ilić, N.M., Kojić, P.S., Pezo, L.L., Banjac, V.V., Krulj, J.A., Bodroža Solarov, M. I. 2018. Multiobjective process optimization for betaine enriched spelt flour based extrudates. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1).
- Kourkoumpetis, T., Manolakaki, D., Velmahos, G., Chang, Y., Alam, H.B., De Moya, M.M., Silhamer, E.A, Mylonakis, E. 2010. Candida infection and colonization among non-trauma emergency surgery patients. *Virulence*, 1(5), 359-366.
- Kovitvadh, A., Chundang, P., Thongprajukaew, K., Tirawattanawanich, C., Srikachar, S., Chotimanothum, B. 2019. Potential of insect meals as protein sources for meat-type ducks based on in vitro digestibility. *Animals*, 9(4), 155.

- Kowalski, S., Mikulec, A., Mickowska, B., Skotnicka, M., Mazurek, A. 2022. Wheat bread supplementation with various edible insect flours. Influence of chemical composition on nutritional and technological aspects. *LWT*, 159, 113220.
- Kralik, G., Škrtić, Z., Suchý, P., Straková, E., Gajčević, Z. 2008. Feeding fish oil and linseed oil to laying hens to increase the n-3 PUFA in egg yolk. *Acta Veterinaria Brno*, 77(4), 561-568.
- 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.
- Kulma, M., Kouřimská, L., Plachý, V., Božik, M., Adámková, A., Vrabec, V. 2019. Effect of sex on the nutritional value of house cricket, *Acheta domestica* L, *Food Chemistry*, 272, 267-272.
- Kumar, D., Dev, P., Kumar, R.V. 2015. Biomedical applications of silkworm pupae proteins. *Biomedical Applications of Natural Proteins*, 41-49. Springer, New Delhi, India.
- Kusmayadi, A., Leong, Y.K., Yen, H.W., Huang, C.Y., Chang, J.S. 2021. Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans—biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*, 271, 129800.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lakey, A., Ferguson, C., Labeit, S., Reedy, M., Larkins, A., Butcher, G., Leonard, K., Bullard, B. 1990. Identification and localization of high molecular weight proteins in insect flight and leg muscle. *The EMBO Journal*, 9(11), 3459-3467.
- Landero, J.L., Beltranena, E., Zijlstra, R.T. 2012. The effect of feeding lentil on growth performance and diet nutrient digestibility in starter pigs. *Animal feed science and technology*, 174(1-2), 108-112.
- Larouche, J., Deschamps, M.H., Saucier, L., Lebeuf, Y., Doyen, A., Vandenberg, G.W. 2019. Effects of Killing Methods on Lipid Oxidation, Colour and Microbial Load of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae. *Animals*, 9, 182.
- Le, D.N. 2000. Evaluation of shrimp by-products for pigs in Central Vietnam. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Lee, H., Yildiz, G., Dos Santos, L.C., Jiang, S., Andrade, J.E., Engeseth, N.J., Feng, H. 2016. Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 55, 200-209.
- Lee, K.M., Lee, K.Y., Choi, H.W., Cho, M.Y., Kwon, T.H., Kawabata, S.I., Lee, B.L. 2000. Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3695-3703.

- Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C. H., Lee, I.H. 2004. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth. *Galleria mellonella*. *Insect molecular biology*, 13(1), 65-72.
- Leni, G., Caligiani, A., Sforza, S. 2019. Killing method affects the browning and the quality of the protein fraction of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) prepupae: A metabolomics and proteomic insight. *Food Research International*, 115, 116-125.
- Lević J., Sredanović, S., Đuragić, O. 2005. Proteini suncokretove sačme kao hrana za brojler. *Acta periodica technologica*. 36, 3-10.
- L'hocine, L., Boye, J.I., Arcand, Y. 2006. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *Journal of food science*, 71(3), 137-145.
- Li, L., Zhao, Z., Liu, H. 2013. Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronautica*, 92(1), 103-109.
- Liu, C., Masri, J., Perez, V., Maya, C., Zhao, J. 2020. Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets. *Foods*, 9(2), 151.
- Liu, H., Tan, B., Kong, X., Li, J., Li, G., He, L., Bai, M., Yin, Y. 2020. Dietary insect powder protein sources improve protein utilization by regulation on intestinal amino acid-chemosensing system. *Animals*, 10(9), 1590.
- Long S. 2012. Isolation and purification of antimicrobial peptides from two coleopteran insects and their biological activities. *China academic of forestry*, 112.
- Longvah, T., Mangthya, K., Ramulu, P. 2011. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. *Food Chemistry*, 128(2), 400-403.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P.E., Gomez, B., Barba, F.J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., Toldra, F. 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 136-147.
- Luna, G.C., Martin-Gonzalez, F.S., Mauer, L.J., Liceaga, A.M. 2021. Cricket (*Acheta domesticus*) protein hydrolysates' impact on the physicochemical, structural and sensory properties of tortillas and tortilla chips. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(1), 109-120.
- Lundy, M.E., Parrella, M.P. 2015. Crickets are not a free lunch: protein capture from scalable organic side-streams via high-density populations of *Acheta domesticus*. *PloS one*, 10(4), e0118785.

- Ma, G., Wu, L., Shao, F., Zhang, C., Wan, H. 2019. Antimicrobial Activity of 11 Insects Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 252, No. 2, p. 022132). IOP Publishing.
- Madeira, M. S., Cardoso, C., Lopes, P. A., Coelho, D., Afonso, C., Bandarra, N. M., Prates, J. A. 2017. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. *Livestock Science*, 205, 111-121
- Makkar, H.P., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P. 2014. State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Animal feed science and technology*, 197, 1-33.
- Makkar, H.P.S. 2018. Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. *Animal*, 12(8), 1744-1754.
- Mancini, S., Fratini, F., Turchi, B., Mattioli, S., Bosco, A. D., Tuccinardi, T., Nozic, S., Paci, G. 2019. Former foodstuff products in *Tenebrio molitor* rearing: Effects on growth, chemical composition, microbiological load, and antioxidant status. *Animals*, 9(8), 484.
- Mancuso, T., Baldi, L., Gasco, L. 2016. An empirical study on consumer acceptance of farmed fish fed on insect meals: The Italian case. *Aquaculture international*, 24(5), 1489-1507.
- Mastoraki, M., Mollá Ferrándiz, P., Vardali, S.C., Kontodimas, D.C., Kotzamanis, Y.P., Gasco, L., Chatzifotis, S., Antonopoulou, E. 2020. A comparative study on the effect of fish meal substitution with three different insect meals on growth, body composition and metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 528, 735511
- Mathew, S., Prakash, V. 2006. Effect of calcium salts on the properties of proteins from oil sardine (*Sardinella longiceps*) during frozen storage. *Journal of food science*, 71(4), E178-E183.
- McCluney, K.E. 2008. The effects of hydration on growth of the house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Science*, 8(1).
- Meena, G.S., Singh, A.K., Panjagari, N.R., Arora, S. 2017. Milk protein concentrates: opportunities and challenges. *Journal of Food Science and Technology*, 54(10), 3010 - 3024.
- Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P. 2016. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 11–23.
- Melenchón, F., Larrán, A.M., de Mercado, E., Hidalgo, M.C., Cardenete, G., Barroso, F.G., Fabrikov, D., Lourenço, H.M., Pessoa, M.F., Tomás-Almenar, C. 2021. Potential use of black soldier fly (*Hermetia illucens*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) insectmeals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 27(2), 491-505.
- Meneguz, M., Schiavone, A., Gai, F., Dama, A., Lussiana, C., Renna, M., Gasco, L. 2018. Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5776-5784.

- Mikołajczak, Z., Rawski, M., Mazurkiewicz, J., Kierończyk, B., Józefiak, D. 2020. The effect of hydrolyzed insect meals in sea trout fingerling (*Salmo trutta m. trutta*) diets on growth performance, microbiota and biochemical blood parameters. *Animals*, 10, 1031.
- Millar, K.A., Gallagher, E., Burke, R., McCarthy, S., Barry-Ryan, C. 2019. Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103233.
- Miller, E.L. 2004. Protein nutrition requirements of farmed livestock and dietary supply. In *Protein sources for the animal feed industry*. FAO Expert Consultation and Workshop, 29 April-3. Maja 2002 (pp. 29-75). Bangkok, Thailand.
- Morales, J.A., Rojas, M.G., Dossey, A.T. 2018. Age-dependend food utilisation of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) in small groups at two temperatures. *Wageningen Academic Publisher*, 4(1), 51-60.
- Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., Dossey, A.T., Berhow, M. 2020. Self-selection of food ingredients and agricultural by-products by the house cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae): A holistic approach to develop optimized diets. *PloS one*, 15(1), e0227400.
- Mshayisa, V.V., Van Wyk, J., Zozo, B. 2022. Nutritional, Techno-Functional and Structural Properties of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Flours and Protein Concentrates. *Foods*, 11(5), 724.
- Multari, S., Neacsu, M., Scobbie, L., Cantlay, L., Duncan, G., Vaughan, N., Stewart D, Russell, W. R. 2016. Nutritional and phytochemical content of high-protein crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7800-7811.
- Mundi, S., Aluko, R.E. 2012. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions. *Food Research International*, 48(1), 299-306.
- Mune, M.A. 2015. Influence of degree of hydrolysis on the functional properties of cowpea protein hydrolysates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2386-2392.
- Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., Vilcinskas, A. 2016. Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150290.
- National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient requirements of fish*, Washington, DC: National Academy Press.
- National Research Council (NRC). 1994. *Nutrient requirements of poultry*, 9izd., Washington, DC: National Academy Press.
- National Research Council (NRC). 1995. *Nutrient requirements of laboratory animals*, 4izd., Washington, DC: National Academy Press

National Research Council NRC. 2012. Nutrient Requirements of Swine, 11th ed.; National Academy Press: Washington, DC, USA.

Ndiritu, A.K., Kinyuru, J.N., Kenji, G.M., Gichuhi, P.N. 2017. Extraction technique influences the physico-chemical characteristics and functional properties of edible crickets (*Acheta domesticus*) protein concentrate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(4), 2013-2021.

Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. 2017. Unlocking the biological potential of proteins from edible insects through enzymatic hydrolysis: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 239-252.

Omotoso, O.T. 2015. An Evaluation of the Nutrients and Some Anti-nutrients in Silkworm, *Bombyx mori* L.(Bombycidae: Lepidoptera). *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(1).

Oonincx, D.G., De Boer, I. J. 2012. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—a life cycle assessment. *PloS one*, 7(12), e51145.

Oonincx, D.G., Laurent, S., Veenenbos, M.E., van Loon, J.J. 2020. Dietary enrichment of edible insects with omega 3 fatty acids. *Insect science*, 27(3), 500-509.

Oonincx, D.G., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., van Loon, J.J. 2015. Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PloS one*, 10(12), e0144601.

Oonincx, D.G.A.B., Finke, M. D. 2021. Nutritional value of insects and ways to manipulate their composition. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(5), 639-659.

Oonincx, D.G.A.B., van Broekhoven, S., van Huis, A., van Loon, J.J.A. 2015. Feed Conversion, Survival and Development, and Composition of Four Insect Species on Diets Composed of Food By-Products. *PLoS ONE* 2015, 10(12), e0144601.

Panyam, D., Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science and Technology*, 7(4),120–125.

Pastell, H., Mellberg, S., Ritvanen, T., Raatikainen, M., Mykkänen, S., Niemi, J., Wirtanen, G. 2021. How Does Locally Produced Feed Affect the Chemical Composition of Reared House Crickets (*Acheta domesticus*)? *ACS Food Science & Technology*, 1(4), 625-635.

Paul, A., Frederich, M., Megido, R.C., Alabi, T., Malik, P., Uyttenbroeck, R., Francis, F., Blecker, C., Haubruge, E., Lognay, G., Danthine, S. 2017. Insect fatty acids: A comparison of lipids from three Orthopterans and *Tenebrio molitor* L. larvae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 337-340.

Pezo, L., Čurčić, B., Filipović, V., Nićetin, M., Koprivica, G., Mišljenović, N., Lević, L. 2013. Artificial neural network model of pork meat cubes osmotic dehydration. *Hemijska Industrija*, 67, 465-475.

- Piccolo, G., Iaconisi, V., Marono, S., Gasco, L., Loponte, R., Nizza, S., Bovera, F., Parisi, G. 2017. Effect of *Tenebrio molitor* larvae meal on growth performance, in vivo nutrients digestibility, somatic and marketable indexes of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Animal Feed Science and Technology*, 226, 12-20.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guerard, F., Chabeaud, A., LeGal, Y., Martinez Alvarez, O., Berge J.P, Piot, J.M., Batista I., Pires, C., Thorkelsson G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., Bourseau, P. 2010. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1819-1826.
- Popović, Lj. 2012. Izučavanje funkcionalnih svojstava enzimski modifikovanih biljnih globulina. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija.
- Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž. Popović, S. 2013. Optimization of transglutaminase cross-linking of pumpkin oil cake globulin; Improvement of the solubility and gelation properties, *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1105-1111.
- Popović, Lj., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of cucurbitin using response surface methodology: Improvement of the Functional Properties, *International Journal of Food Engineering*, 7(5), 18.
- 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.
- Poppel, A.K, Vogel, H., Wiesner, J., Vilcinskas, A. 2015. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2508 – 2514.
- Prachom, N., Boonyoung, S., Hassaan, M.S., El-Haroun, E., Davies, S.J. 2021. Preliminary evaluation of Superworm (*Zophobas morio*) larval meal as a partial protein source in experimental diets for juvenile Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture Nutrition*, 27(5), 1304-1314.
- Pravilnik o kvalitetu hrane za životinje, (Službeni glasnik RS 4/2010, 113/2012, 27/2014, 25/2015, 39/2016 i 54/2017).
- Prevolnik, M., Andronikov, D., Font-i-Furnols, M., Novič, M., Škornjac, D., Čandek-Potokar, M. 2014. Classification of dry-cured hams according to the maturation time using near infrared spectra and artificial neural networks. *Meat Science*, 96, 14-20.
- Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O., Jäger, H. 2018. Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244(6), 999-1013.
- Que, F., Hou, X.L., Wang, G.L., Xu, Z.S., Tan, G.F., Li, T., Wang Y.H., Khadr, A., Xiong, A.S. 2019. Advances in research on the carrot, an important root vegetable in the Apiaceae family. *Horticulture research*, 6.

- Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C., Delbecque, J.P. 1995. Postembryonic development of *Zophobas atratus* Fab.(Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *Journal of insect physiology*, 41(2), 143-152.
- Raghavan, S., Kristinsson, H.G. 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1434-1441.
- Rakita, S.M., Čolović, D.S., Levart, A.P., Banjac, V.V., Čolović, R.R., Dragojlović, D.M., Đuragić, O. M. 2020. A rapid spectrophotometric method for determination of thiobarbituric acid reactive substances in rainbow trout feed. *Food and Feed research*, 47(1), 43-53.
- Ramana K.V., Srivastava S., Singhal S.S. 2014. Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Ramos-Elorduy, J. 2009. Anthro-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability. *Entomological Research*, 39(5), 271-288.
- Ramos-Elorduy, J., González, E. A., Hernández, A. R., Pino, J. M. 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of economic entomology*, 95(1), 214-220.
- Ravzanaadii, N., Kim, S.H., Choi, W.H., Hong, S.J., Kim, N.J. 2012. Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 93-98.
- Regenstein, J., Regenstein, C.E. 1984. *Food protein chemistry: an introduction for food scientists*, 286-300, Academic Press, Orlando, USA.
- Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC, Off, J, Eur, Union 2009, 229, 1–36,
- Rema, P., Saravanan, S., Armenjon, B., Motte, C., Dias, J. 2019. Graded incorporation of defatted yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet improves growth performance and nutrient retention. *Animals*, 9(4), 187.
- Ritvanen, T., Pastell, H., Welling, A., Raatikainen, M. 2020. The nitrogen-to-protein conversion factor of two cricket species-*Acheta domesticus* and *Gryllus bimaculatus*. *Agricultural and Food Science*, 29(1), 1-5.
- Rogers, K.L, Fey, P.D., Rupp, M.E. 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America*, 23(1), 73-98.
- Roncarati, A., Gasco, L., Parisi, G., Terova, G. 2015. Growth performance of common catfish (*Ameiurus melas* Raf.) fingerlings fed mealworm (*Tenebrio molitor*) diet. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(3), 233-240.

- Roy, J.P., Keefe, G. 2012. Systematic Review: What is the Best Antibiotic Treatment for Staphylococcus aureus Intramammary Infection of Lactating Cows in North America? *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 28(1), 39–50.
- Rumbos, C. I., Adamaki-Sotiraki, C., Gourgouta, M., Karapanagiotidis, I.T., Asimaki, A., Mente, E., Athanassiou, C.G. 2021. Strain matters: strain effect on the larval growth and performance of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insects as Food and Feed*, 7(8), 1195-1205.
- Rumbos, C.I., Athanassiou, C.G. 2021. The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A “Sleeping Giant” in Nutrient Sources. *Journal of Insect Science*, 21(2).
- Rumbos, C.I., Karapanagiotidis, I. T., Mente, E., Psafakis, P., Athanassiou, C.G. 2020. Evaluation of various commodities for the development of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition & food research*, 57(5), 802-823.
- Sampson, C., Keens, R.H., Kattnig, D.R. 2019. On the magnetosensitivity of lipid peroxidation: Two-versus three-radical dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(25), 13526-13538.
- Sánchez-Muros, M.J., Barroso, F.G., Manzano-Agugliaro, F. 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16-27.
- Sathe, S.K., Zaffran, V.D., Gupta, S., Li, T. 2018. Protein Solubilization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 95(8), 883-901.
- Schiavone, A., Cullere, M., De Marco, M., Meneguz, M., Biasato, I., Bergagna, S., Dezzutto, D., Gai, F., Dabbou, S., Gasco, L., Dalle Zotte, A. 2017. Partial or total replacement of soybean oil by black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) fat in broiler diets: effect on growth performances, feed choice, blood traits, carcass characteristics and meat quality. *Italian Journal of Animal Science*, 16(1), 93–100.
- Schiavone, A., De Marco, M., Martínez, S., Dabbou, S., Renna, M., Madrid, J., Hernandez, F., Rotolo, L., Costa, P., Gai, F., Gasco, L. 2017. Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1), 1-9.
- Schiavone, A., De Marco, M., Rotolo, L., Belforti, M., Martinez Mirò, S., Madrid Sanchez, J., Hernandez-Ruiperez, F., Bianchi, C., Sterpone, L., Malfatto, V.M., Katz, H. 2014. Nutrient digestibility of *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* meal in broiler chickens. 1st International conference “Insects to Feed the World”. 14-17. Maj 2014. Wageningen, Hollandija.
- Sealey, W.M., Gaylord, T.G., Barrows, F.T., Tomberlin, J.K., McGuire, M.A., Ross, C., St-Hilaire, S. 2011. Sensory analysis of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed enriched black soldier fly prepupae, *Hermetia illucens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42(1), 34-45.

- Secci, G., Moniello, G., Gasco, L., Bovera, F., Parisi, G. 2018. Barbary partridge meat quality as affected by *Hermetia illucens* and *Tenebrio molitor* larva meals in feeds. *Food Research International*, 112, 291-298.
- Sedgh-Gooya, S., Torki, M., Darbemamieh, M., Khamisabadi, H., Abdolmohamadi, A. 2021. Effect of dietary inclusion of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on productive performance, egg quality indices and blood parameters of laying hens. *Animal Production Science*, 61(13), 1365-1372.
- Sedlar, T., Čakarević, J., Tomić, J., Popović, Lj. 2021. Vegetable by-products as new sources of functional proteins. *Plant foods for human nutrition*, 76(1), 31-36.
- Selenius, O., Korpela, J., Salminen, S., Gallego, C.G. 2018. Effect of chitin and chitooligosaccharide on in vitro growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Escherichia coli* TG. *Applied Food Biotechnology*, 5(3), 163-172.
- Seufi, A.M., Hafez, E.E., Galal, F.H. 2011. Identification, phylogenetic analysis and expression profile of an anionic insect defensin gene, with antibacterial activity, from bacterial-challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *BMC molecular biology*, 12(1), 1-14.
- Shah, S. 2016. *Pandemic: tracking contagions, from cholera to ebola and beyond*, Macmillan: New York, NY, USA.
- Siddiq, M., Ravi, R., Harte, J. B., Dolan, K. D. 2010. Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 232-237.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., Jedras, M. 2013. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 4(6), 287-291.
- Simopoulos, A.P. 2009. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects, *World Review of Nutrition and Dietetics*, 99, 1-16,
- Snyder, J.W., Atlas, R.M. 2014. *Handbook of media for clinical and public health microbiology*.
- Sogari, G., Amato, M., Biasato, I., Chiesa, S., Gasco, L. 2019. The potential role of insects as feed: A multi-perspective review. *Animals*, 9(4), 119.
- 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.
- Spasevski, N. (2018). Uticaj primene različitih izvora prirodnih pigmenata na boju žumanca i koekstrudata na bazi semena lana, lanika i konoplje na profil masnih kiselina u jajima. *Doktorska disertacija, Tehnološki fakultetu, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad, Srbija*.

- Spasevski, N., Čolović, D., Rakita, S., Ikonić, P., Đuragić, O., Banjac, V., Vukmirović, Đ. 2016. Fatty acid composition and β -carotene content in egg yolk of laying hens fed with linseed, paprika and marigold. *Contemporary Agriculture*, 65(1-2), 15-22.
- Spencer, W., Spencer, J. 2006. Management guideline manual for invertebrate live food species. 1-54. EAZA Terr. Invertebr. TAG. Bristol, UK.
- Sredanović, S., Đuragić, O., Lević, J. 2002. Nove tehnologije dodavanja tečnosti u hranu za životinje. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 6(1-2), 34-38.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292, 246-248.
- Stengler, M., Young-Balch, R., Balch, J.F. 2011. Prescription for natural cures: a self-care guide for treating health problems with natural remedies including diet, nutrition, supplements, and other holistic methods. Wiley, Hoboken.
- St-Hilaire, S., Cranfill, K. 2007. Fish Offal Recycling by the Black Soldier Fly Produces a Foodstuff High in Omega-3 Fatty Acids. *Journal of the World Aquaculture Society*, 2007, 38(2), 309–313.
- Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D., Nickerson, M.T. 2015. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food research international*, 76, 31-38.
- Stone, A.K., Tanaka, T., Nickerson, M.T. 2019. Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. *Journal of food science and technology*, 56(7), 3355-3363.
- Tacon, A.G., Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285(1-4), 146-158.
- Tang, Y., Debnath, T., Choi, E. J., Kim, Y. W., Ryu, J. P., Jang, S., Sang, U.C., Choi, Y., Kim, E. 2018. Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. *PLoS One*, 13(5), e0196218.
- Taniguchi, M., Ochiai, A., Kondo, H., Fukuda, S., Ishiyama, Y., Saitoh, E., Kato, T., Tanaka, T. 2016. Pyrrhocoricin, a proline-rich antimicrobial peptide derived from insect, inhibits the translation process in the cell-free *Escherichia coli* protein synthesis system. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121(5), 591-598.
- Taufek, N.M., Simarani, K., Muin, H., Aspani, F., Raji, A. A., Alias, Z., Razak, S. A. 2018a. Inclusion of cricket (*Gryllus bimaculatus*) meal in African catfish (*Clarias gariepinus*) feed influences disease resistance. *Journal of Fisheries*, 6(2), 623–631.

Taufek, N.M., Muin, H., Raji, A. A., Md Yusof, H., Alias, Z., Razak, S.A. 2018b. Potential of field crickets meal (*Gryllus bimaculatus*) in the diet of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Applied Animal Research*, 46(2), 541–6.

Thakur, A., Thakur, K.S., Thakur, N.S. 2017. Entomophagy (insects as human food): A step towards food security. Poster session presentation at the National Conference on advances in food science and technology: Current trends and future perspectives. India: Himachal Pradesh.

The Economist, 2014. Food loss and its intersection with food security. Global food security index 2014: an annual measure of the state of global food security. The Economist Intelligence Unit, London, UK. Dostupno na: <http://www.economist.com>.

Thévenot, A., Rivera, J.L., Wilfart, A., Maillard, F., Hassouna, M., Senga-Kiesse, T., Feon, S.L., Aubin, J. 2018. Mealworm meal for animal feed: Environmental assessment and sensitivity analysis to guide future prospects. *Journal of Cleaner Production*, 170, 1260-1267.

Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103, 1385-1394.

Tilami, S. K., Turek, J., Červený, D., Lepič, P., Kozák, P., Burkina, V., Sakali, S., Tomčala, A., Samples, S., Mráz, J. 2020. Insect meal as a partial replacement for fish meal in a formulated diet for perch *perca fluviatilis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(12), 867-878.

Tschinkel, W. R. 1993. Crowding, maternal age, age at pupation, and life history of *Zophobus atratus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 86(3), 278-297.

Tschinkel, W.R., Willson, C.D. 1971. Inhibition of pupation due to crowding in some tenebrionid beetles. *Journal of Experimental Zoology*, 176(2), 137–145.

Tsumura, K., Kugimya, W., Bando, N., Hiemori, M., Ogawa, T. 1999. Preparation of hypoallergenic soybean protein with processing functionally by selective enzymatic hydrolysis. *Food Science Technology*, 5, 171-175.

Tzompa-Sosa, D.A., Yi, L., van Valenberg, H.J., Boekel, M.A., Lakemond, C.M. 2014. Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food research international*, 62, 1087-1094.

Udomsil, N., Insoonthornruksa, S., Gosalawit, C., Ketudat-Cairns, M. 2019. Nutritional values and functional properties of house cricket (*Acheta domesticus*) and field cricket (*Gryllus bimaculatus*). *Food Science and Technology Research*, 25(4), 597-605.

Vale, N., Aguiar, L., Gomes, P. 2012. Antimicrobial peptides: a new class of antimalarial drugs? *Frontiers in Pharmacology*, 5, 275.

- Van Broekhoven, S., Oonincx, D. G., van Huis, A., van Loon, J.J. 2015. Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. *Journal of Insect Physiology*, 73, 1–10.
- Van Huis A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58, 563–583.
- Van Huis, A. 2015. Edible insects contributing to food security?. *Agriculture & Food Security*, 4(1), 1-9.
- van Huis, A. 2016. Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society*, 75(3), 294-305.
- Van Huis, A., Dicke, M, van Loon, J.J. 2015. Insects to feed the world. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1(1), 3-5.
- Van Huis, A., Oonincx, D.G. 2017. The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 37(5), 1-14.
- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. 2013. Edible insects: future prospects for food and feed security (171). Food and agriculture organization of the United Nations. Rim, Italija.
- Van Itterbeeck, J., van Huis, A. 2012. Environmental manipulation for edible insect procurement: a historical perspective. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 8(1), 1-7.
- Vandeweyer, D., Lenaerts, S., Callens, A., Van Campenhout, L. 2017. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control*, 71, 311-314.
- Veldkamp, T., Bosch, G. 2015. Insects: a protein-rich feed ingredient in pig and poultry diets. *Animal Frontiers*, 5(2), 45-50.
- Veldkamp, T., Van Duinkerken, G., van Huis, A., Lakemond, C. M. M., Ottevanger, E., Bosch, G., Van Boekel, T. 2012. Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets: a feasibility study, Wageningen UR Livestock Research.
- Verbeke, W., Spranghers, T., De Clercq, P., De Smet, S., Sas, B., Eeckhout, M. 2015. Insects in animal feed: Acceptance and its determinants among farmers, agriculture sector stakeholders and citizens. *Animal Feed Science and Technology*, 204, 72-87.
- Vercruyse, L., Smagghe, G., Herregods, G., Van Camp, J. 2005. ACE inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of insect protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5207-5211.
- Volek, Z., Adámková, A., Zita, L., Adámek, M., Plachý, V., Mlček, J., Marounek, M. 2021. The effects of the dietary replacement of soybean meal with yellow mealworm larvae (*Tenebrio*

molitor) on the growth, nutrient digestibility and nitrogen output of fattening rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 280, 115048.

Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G. 2013. Evidence and rational based research on Chinese drugs. Springer Science & Business Media.

Wang, D., Zhai, S.W., Zhang, C.X., Bai, Y.Y., An, S.H., Xu, Y.N. 2005. Evaluation on nutritional value of field crickets as a poultry feedstuff. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 18(5), 667–70.

Wang, J., Wang, Y., Dang, X., Zheng, X., Zhang, W. 2013. Housefly larvae hydrolysate: orthogonal optimization of hydrolysis, antioxidant activity, amino acid composition and functional properties. *BMC Research Notes*, 6(1), 1-10.

Wang, W., Wang, N., Zhou, Y., Zhang, Y., Xu, L., Xu, J., Feng, F., He, G. 2011. Isolation of a novel peptide from silkworm pupae protein components and interaction characteristics to angiotensin I-converting enzyme. *European Food Research and Technology*, 232, 29- 38.

Wani, I.A., Sogi, D.S., Wani, A.A., Gill, B.S. 2013. Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 278-284.

Wiesner, J., Vilcinskas, A. 2010. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5), 440-464.

Wilkinson, J.M. 2011. Re-defining efficiency of feed use by livestock. *Animal*, 5(7), 1014-1022.
Williams, J.P., Williams, J.R., Kirabo, A., Chester, D., Peterson, M. 2016. Nutrient Content and Health Benefits of Insects, 61 -84. Academic Press, San Diego, USA.

World Health Organization & Food and Agriculture Organization. 2002. Risk profile for enterohemorrhagic *E. coli* including the identification of the commodities of concern, including sprouts, ground beef and pork. Codex Committee of Food Hygiene CX/FH 03/5-Add 4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Wu, G. 2013. Amino acids Biochemistry and Nutrition. Taylor & Francis, Florida, USA.

Wu, Q. Y., Jia, J.Q., Tan, G.X., Xu, J.L., Gui, Z.Z. 2011. Physicochemical properties of silkworm larvae protein isolate and gastrointestinal hydrolysate bioactivities. *African Journal of Biotechnology*, 10(32), 6145-6153.

Wu, Q.Y., Jia, J.Q., Tan, G.X., Xu, J.L., Gui, Z.Z. 2011. Physicochemical properties of silkworm larvae protein isolate and gastrointestinal hydrolysate bioactivities. *African Journal of Biotechnology*, 10(32), 6145-6153.

Xiuhua, L., Juan, M., Zhanfa, J. 2009. Antagonism of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 32(1), 67 - 71.

- Yang, R., Zhao, X., Kuang, Z., Ye, M., Luo, G., Xiao, G., Liao, S., Li, L., Xiong, Z. 2013. Optimization of antioxidant peptide production in the hydrolysis of silkworm (*Bombyx mori* L.) pupa protein using response surface methodology. *Journal of Food and Agriculture Environment*, 11, 952-956.
- Yi, H.Y., Deng, X.J., Yang, W.Y., Zhou, C. Z, Cao, Y., Yu, X. Q. 2013. Gloverins of the silkworm *Bombyx mori*: structural and binding properties and activities. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43, 612–625
- Yi, L., Lakemond, C.M., Sagis, L.M., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, M. A. 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food chemistry*, 141(4), 3341-3348.
- Yi, L., Van Boekel, M.A., Boeren, S., Lakemond, C.M. 2016. Protein identification and in vitro digestion of fractions from *Tenebrio molitor*. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1285-1297.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N.A. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 111(10), 5944-5972.
- Yoo, J.S., Cho, K.H., Hong, J.S., Jang, H.S., Chung, Y.H., Kwon, G.T., Shin, D.G., Kim, Y.Y. 2019. Nutrient ileal digestibility evaluation of dried mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae compared to three animal protein by-products in growing pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 32(3), 387.
- Yoon, S., Wong, N.A., Chae, M., Auh, J.H. 2019. Comparative characterization of protein hydrolysates from three edible insects: Mealworm larvae, adult crickets, and silkworm pupae. *Foods*, 8(11), 563.
- Yoon, Y., Swales, G., Margavio, T.M. 1993. A comparison of discriminant analysis versus artificial neural networks. *Journal of the Operational Research Society*, 44, 51–60.
- Yuan, J., Yinan, Z., Ling, M., Hui, W. Liyu, H., Jie, H. 2012. Identification of alive female and male adult of *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Scientia Silvae Sinicae*, 48(6), 175-177.
- Zaelor, J., Kitthawee, S. 2018. Growth response to population density in larval stage of darkling beetles (Coleoptera; Tenebrionidae) *Tenebrio molitor* and *Zophobas atratus*. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 603–606.
- Zanetti, S.S., Cecílio, R.A., Silva, V.H., Alves, E.G. 2015. General calibration of TDR to assess the moisture of tropical soils using artificial neural networks. *Journal of Hydrocolloids*, 530, 657-666.
- Zhang, L.J., Gallo, R.L. 2016. Antimicrobial peptides. *Current Biology*, 26(1), 14-19.

- Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J.L., Johansson, D. P., Landberg, R., Langton, M. 2016. Yellow mealworm protein for food purposes-extraction and functional properties. *PloS one*, 11(2), e0147791.
- Zhong, A. 2017. Product development considerations for a nutrient rich bar using cricket (*Acheta domesticus*) protein. California State University, Long Beach, USA.
- Zhou, Z.F., Ren, Z.X., Yu, H.Y., Jia, J.Q., Gui, Z.Z. 2017. Effects of different modification techniques on molecular structure and bioactivity of *Bombyx mori* pupa protein. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(1), 35-41.
- Zhou, Z.H., Yang, H.J., Chen, M., Lou, C.F., Zhang, Y.Z., Chen, K.P., Wang, Y., Yu, M. L., Yu, F., Li, J.Y., Zhong, B.X. 2008. Comparative proteomic analysis between the domesticated silkworm (*Bombyx mori*) reared on fresh mulberry leaves and on artificial diet. *Journal of Proteome Research*, 7(12), 5103-5111.
- Zhu, D., Huang, X., Tu, F., Wang, C., Yang, F. 2020. Preparation, antioxidant activity evaluation, and identification of antioxidant peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) larvae. *Journal of food biochemistry*, 44(5), e13186.
- Zielińska, E., Baraniak, B., Karaś, M., Rybczyńska, K., Jakubczyk, A. 2015. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, 77, 460-466.
- Zielińska, E., Karaś, M., Baraniak, B. 2018. Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *Lwt*, 91, 168-174.

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

Назив пројекта/истраживања
Потенцијал брашна од различитих врста инсеката као алтернативних извора протеина у исхрани животиња
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет Нови Сад б) Универзитет у Новом Саду, Научни институт за прехранбене технологије у Новом Саду в)
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i></p> <p>Докторска дисертација</p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><u>а) квантитативни</u></p> <p><u>б) квалитативни</u></p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови</p> <p>б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи</p> <p>в) генотипови: навести врсту _____</p> <p>г) административни подаци: навести врсту _____</p> <p><u>д) узорци ткива: навести врсту: ларве црва брашнара и супер црва и одраслих јединки попаца</u></p> <p><u>ђ) снимци, фотографије: навести врсту: слике узорака у току рада</u></p>

е) текст, навести врсту: литература

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: описати: експериментални резултати

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx

b) SPSS фајл, датотека _____

с) PDF фајл, датотека .pdf

д) Текст фајл, датотека .docx

е) JPG фајл, датотека .jpeg

f) Остало, датотека _____

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: узгој инсеката, екстракција и изолација протеина, ензимска хидролиза протеинских супстрата, испитивање физичких, морфолошких и биолошких особина узорака

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) 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-uid-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) 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

а) 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

Данка Драгојловић, danka.dragojlovic@fins.uns.ac.rs

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

Данка Драгојловић, danka.dragojlovic@fins.uns.ac.rs

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

Данка Драгојловић, danka.dragojlovic@fins.uns.ac.rs