

Bioaktivni peptidi prisutni u nusproizvodima mliječne industrije

Zečević, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:089118>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, studeni 2024.

Maja Zečević

**BIOAKTIVNI PEPTIDI PRISUTNI U
NUSPROIZVODIMA MLIJEČNE INDUSTRIJE**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc (Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta), u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. pod komentorstvom dr. sc. Ane Butorac, viša znan. sur. te uz pomoć Željke Stanečić, mag. ing.

Najprije se želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Andreji Leboš Pavunc na prenesenom znanju, susretljivosti i uloženom trudu tijekom izrade diplomskog rada. Želim se zahvaliti i ostalim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na savjetima i pristupačnosti. Veliko hvala dr. sc. Ani Butorac, v. znan. sur. na pruženoj prilici za izradu eksperimentalnog rada u Centralnom laboratoriju Inkubacijskog centra za bio-znanosti i komercijalizaciju tehnologije – BICRO BIOCentar d.o.o. Iznimno sam Vam zahvalna na stručnom i poticajnom vodstvu te prenesenim znanjima i savjetima.

Na kraju ovog značajnog poglavlja mog života, želim izraziti iskrenu zahvalnost svojoj obitelji, a prvenstveno mojim roditeljima, koji su svojim nesebičnim radom, ljubavlju i podrškom omogućili ostvarenje mojih snova. Bez njihove vjere u mene, ovo putovanje ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su, na bilo koji način, bili dijelom mog fakultetskog putovanja. Svojim prisustvom, podrškom i prijateljstvom učinili ste ovaj put posebnim i nezaboravnim. Zajedno smo prošli kroz mnoge uspone i padove, a naše zajedničke uspomene ostat će zauvijek dio mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

BIOAKTIVNI PEPTIDI PRISUTNI U NUSPROIZVODIMA MLIJEČNE INDUSTRIJE

Maja Zečević, univ. bacc. ing. biotechn., 0058217178

Sažetak: Svrha ovog rada bila je identificirati i kvantificirati prisutnost bioaktivnih peptida u nusproizvodima mliječne industrije koji obuhvaćaju slatku i kiselu sirutku te permeat. Za provođenje identifikacije bioaktivnih peptida korištena je spregnuta tehnika tekućinske kromatografije obrnutih faza (nano LC) sa spektrometrijom masa (MS). Dobivene proteinske sekvence peptida pretražene su pomoću baze podataka za bioaktivne peptide izolirane iz mlijeka (engl. *Milk Bioactive Peptide Database*). Neciljanom i podatkovno ovisnom analizom utvrđena je prisutnost čak 10 bioaktivnih peptida u analiziranim uzorcima, a to su SQSKVLPVPQ, TQTPVVVPPFLQPE, QEPVLPVVRGPFPIIV, VLGVPVRGPF, RDMPAQAF, EPVLPVVRGPF, VYFPGPIPN, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, MPFPKYPVEP i YQEPVLPVVR. Za ove peptide su u znanstvenoj literaturi potvrđena i opisana bioaktivna svojstva poput antioksidativnog, antitrombotičkog, imunomodulatornog i ACE-inhibitornog (antihipertenzivno). Kvantifikacija identificiranih peptida je provedena pomoću neciljane SWATH-DIA (engl. *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra-Dana Independent Acquisition*) analize. Rezultati su statistički obrađeni pomoću web platforme MetaboAnalyst verzija 6.0. Utvrđeno je kako je većina identificiranih bioaktivnih peptida statistički značajnije zastupljena u uzorcima kisele sirutke.

Gljučne riječi: bioaktivni peptidi, biološka aktivnost, nusproizvodi mliječne industrije, kazein, proteini sirutke

Rad sadrži: 58 stranica, 27 slika, 15 tablica, 54 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Komentor: dr. sc. Ana Butorac, viša znan. sur., Selvita d.o.o.

Pomoć pri izradi: Željka Stanečić, mag. ing.

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jasna Novak (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc (mentor)
3. dr. sc. Ana Butorac, v. znan. sur., Selvita d.o.o. (član)
4. prof. dr.sc. Ksenija Durgo (zamjenski član)

Datum obrane: 28. studenog, 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

BIOACTIVE PEPTIDES PRESENT IN DAIRY INDUSTRY BY-PRODUCTS

Maja Zečević, univ. bacc. ing. biotechn., 0058217178

Abstract: The purpose of this study was to identify and quantify the presence of bioactive peptides in by-products of the dairy industry, specifically sweet whey, acid whey, and permeate. Identification of bioactive peptides was carried out using a coupled technique of reverse-phase liquid chromatography (nano LC) with mass spectrometry (MS). The peptide sequences obtained were searched against the Milk Bioactive Peptide Database. Through untargeted and data-dependent analysis, the presence of ten bioactive peptides was confirmed in the analyzed samples, including SQSKVLPVPQ, TQTPVVPPFLQPE, QEPVLGPVRGPFPIIV, VLGPRGPF, RDMPIQAF, EPVLGPVRGPF, YPFPGIPN, SQSKVLPVPQKAVPYQP, MPFPKYPVEP, and YQEPVLGPVR. These peptides have been confirmed and described in scientific literature for bioactivities such as antioxidant, antithrombotic, immunomodulatory, and ACE-inhibitory (antihypertensive) properties. Quantification of the identified peptides was performed using an untargeted SWATH-DIA (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra-Data Independent Acquisition) analysis. Statistical processing of the results was conducted using the MetaboAnalyst web platform, version 6.0. It was found that most of the identified bioactive peptides were significantly more abundant in acid whey samples.

Keywords: bioactive peptides, biological activity, dairy industry by-products, casein, whey proteins

Thesis contains: 58 pages, 27 figures, 15 tables, 54 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor

Co-mentor: Ana Butorac, PhD, Scientific Adviser, Selvita Ltd.

Technical support and assistance: Željka Stanečić, mag. ing.

Reviewers:

1. Jasna Novak, PhD, Full professor (president)
2. Andreja Leboš Pavunc, PhD, Associate professor (mentor)
3. Dr. Ana Butorac, Senior Research Associate, Selvita Ltd. (member)
4. Ksenija Durgo, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: 28th November, 2024.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. MLIJEČNA INDUSTRIJA I NUSPROIZVODI.....	2
2.1.1. Pregled mliječne industrije	2
2.1.2. Nusproizvodi mliječne industrije	4
2.1.3. Sirutka.....	5
2.1.4. Slatka i kisela sirutka.....	6
2.1.5. Permeat	8
2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PRISUTNI U MLIJEKU I NUSPROIZVODIMA MLIJEČNE INDUSTRIJE.....	9
2.2.1. Bioaktivni peptidi i njihove karakteristike	9
2.2.2. Funkcije i mehanizmi djelovanja bioaktivnih peptida.....	10
2.2.3. Bioaktivni peptidi iz mlijeka.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1.1. Uzorci za analizu.....	15
3.1.2. Laboratorijski uređaji	15
3.1.3. Laboratorijski pribor.....	15
3.1.4. Kemikalije	16
3.1.5. Otopine	16
3.1.6. Programi i baze podataka	16
3.2.1. Liofilizacija uzoraka za analizu	17
3.2.2. Neciljana i podatkovno ovisna analiza peptida	18
3.2.3. Priprema uzoraka za nano-LC	18
3.2.4. Pročišćavanje i separacija peptida	19
3.2.5. Priprema kalibranata.....	20
3.2.6. Analiza peptida spektrometrom masa TripleTOF 6600+ System.....	24
3.2.7. Izrada baze podataka i pretraživanje.....	25
3.2.8. Identifikacija peptida.....	25
3.2.9. Prikupljanje i relativna kvantifikacija neovisna o podacima	26
3.2.10. Obrada podataka	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. IDENTIFICIRANI PEPTIDI POMOĆU NECILJANE ANALIZE PEPTIDA.....	28
4.1.1. Peptidi s antioksidativnim svojstvom	34
4.1.2. Peptidi s antitrombotičkim svojstvom.....	35
4.1.1 Peptidi s imunomodulatornim svojstvom	39
4.2. KVANTIFIKACIJA PEPTIDA POMOĆU NECILJANE ANALIZE.....	40

4.2.1. Statistička obrada podataka.....	42
5. ZAKLJUČCI.....	53
6. LITERATURA	54

1. UVOD

Mlijeko predstavlja nutritivno iznimno bogatu namirnicu u ljudskoj prehrani te je njegova konzumacija važna za održavanje zdrave i uravnotežene prehrane. Neke studije ističu moguću ulogu konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda u prevenciji nekoliko kroničnih stanja kao što su kardiovaskularne bolesti, neki oblici raka, pretilost i dijabetes. Mlijeko koje sadrži približno 3,5 % proteina od čega je 80 % kazein i 20 % proteini sirutke predstavlja značajan izvor bioaktivnih peptida. Bioaktivni peptidi definiraju se kao kratki lanci aminokiselina, čija bioaktivnost postaje vidljiva tek nakon hidrolize proteinskih prekursora, bilo enzimskom razgradnjom tijekom probave ili procesima fermentacije i hidrolize u laboratorijskim uvjetima. Bioaktivnim peptidima iz mlijeka pripisuju se djelovanja poput antimikrobnog, antioksidativnog, antimutagenog, antikancerogenog, antihipertenzivnog, antihemolitičkog, protuupalnog, antitrombotičkog, imunomodulatornog, citomodulatornog, opioidnog i antitrombotičkog (Banić i sur., 2024). Zbog tih značajnih bioaktivnih svojstava peptidi dobiveni iz mlijeka privukli su pozornost mnogih istraživača širom svijeta s ciljem formuliranja različitih potencijalnih lijekova s nutraceutskim svojstvima, funkcionalne hrane koja promiče zdravlje ili drugih farmaceutskih proizvoda.

Osim samog mlijeka danas nusproizvodi koji nastaju tijekom proizvodnje mliječnih proizvoda predstavljaju vrijedne sirovine s različitim iskoristivim komponentama među kojima su i bioaktivni peptidi. Kako mliječna industrija godišnje proizvede milijune tona nusproizvoda od kojih u najvećoj količinu sirutku, dokazivanje da su u njoj prisutni peptidi koji poboljšavaju zdravlje ljudi dovodi do značajne profitabilnosti što na području iskoristivosti, održivosti i ekologije to još više na području liječenja i prevencije različitih bolesti i stanja (Pires i sur., 2021). Stoga su mnoge studije počele ispitivati nusproizvode kao što su kisela sirutka, slatka sirutka i permeat kao izvor bioaktivnih peptida.

Cilj ovog rada bio je u uzorcima slatke sirutke, kisele sirutke i permeata identificirati i kvantificirati prisutnost bioaktivnih peptida. Identifikacija bioaktivnih peptida provedena je spregnutom tehnikom tekućinske kromatografije sa tandem spektrometrijom masa nano-LC-MS/MS uz korištenje ProteinPilot softvera te pretragom UniProt baze podataka. Za kvantifikaciju identificiranih bioaktivnih peptida korištena je neciljana podatkovno neovisna analiza SWATH-DIA. Izolacijski prozori navedene analize podešeni su uz korištenje programa SWATH Variable Window Calculator V1.2. Dobiveni podatci nakon SWATH-DIA analize obrađeni su pomoću PeakView softvera te su korišteni za statističku analizu pomoću web platforme MetaboAnalys (verzija 6.0).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. MLIJEČNA INDUSTRIJA I NUSPROIZVODI

2.1.1. Pregled mliječne industrije

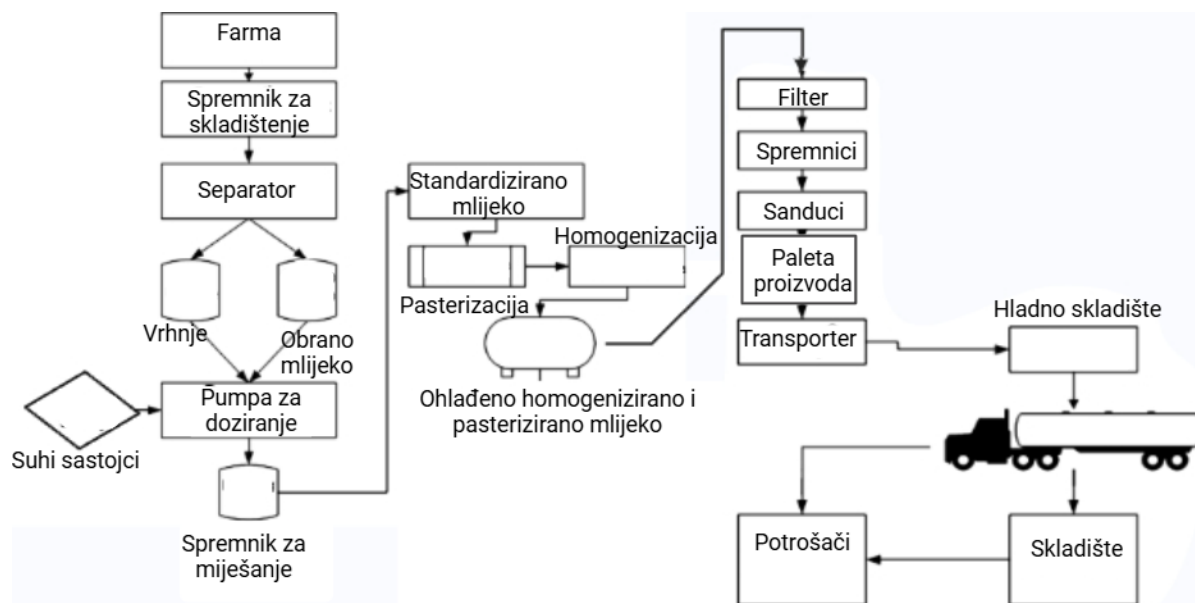
Najraniji zapisi o konzumaciji mlijeka i proizvodnji mliječnih proizvoda dolaze iz drevnih civilizacija u Mezopotamiji, Egiptu i Indiji, gdje su ljudi proizvodili mlijeko i njegove derivate poput sira i maslaca. Prva komercijalna proizvodnja mlijeka i mliječnih proizvoda započela je tijekom industrijske revolucije u 19. stoljeću, kada su tehnološki napreci omogućili masovnu proizvodnju i distribuciju mlijeka. S pojavom industrijalizacije, mliječna industrija doživjela je ubrzan razvoj. Tehnološki napredak u pasterizaciji, hlađenju i transportu omogućio je duži rok trajanja mliječnih proizvoda što je omogućilo širu distribuciju. Krajem 20. i početkom 21. stoljeća, fokus se prenio na modernizaciju farmi, optimizaciju prehrane stoke i poboljšane metode genetskog uzgoja kako bi rezultirali većim prinosima mlijeka. Razlog za takav smjer razvoja industrije bila je povećana potražnja za raznovrsnim mliječnim proizvodima, kao i za organskim i održivim praksama u proizvodnji (Evershed i sur., 2008).

Mlijeko je biološka tekućina koja se smatra jednom od najprirodnijih i najhranjivijih sastojaka svakodnevne uravnotežene prehrane (Nagpal i sur., 2012). Glavni sastojci mlijeka su voda (87 %), mliječne masti (3 – 4 %), proteini (3 %), laktoza (4 – 5 %) i soli koji određuju njegovu prehrambenu i komercijalnu vrijednost (Pereira, 2013). Međutim, osim ovih glavnih komponenti mlijeka u njemu su prisutne i stotine drugih sastojaka u nižim koncentracijama kao što su vitamini (A, B1, B2, C, D), minerali (kalcij, fosfor, natrij, magnezij, kalij, cink, selen, željezo), enzimi (katalaza, fosfataza i lipaza), otopljeni plinovi i drugi lipidi koji također određuju njegova biološka svojstva. Upravo ova činjenica da je sirovo mlijeko bogato različitim hranjivim tvarima predstavlja izvrsno okruženje za razvoj različitih mikroorganizama, a time i visoku podložnost kvarljivosti. Stoga se mlijeko tradicionalno prerađuje u široki raspon mliječnih proizvoda i tako formira mliječnu industriju kao jednu od najvažnijih u sektoru prehrambene industrije za većinu svjetskih zemalja. Mlijeko se osim za proizvodnju mliječnih proizvoda može koristiti i kao izvor sastojaka s daljnjom primjenom, poput laktoze, mliječne masti, mliječnih proteina (kazein) i proteina sirutke (Motarjemi i sur., 2014).

Važna obilježja mliječne industrije su složenost fizikalno-kemijskih procesa u proizvodnji mliječnih proizvoda, poštivanje sanitarnih i higijenskih zahtjeva za kvalitetu proizvoda (Kozub i sur., 2020). Otuda proizlaze i visoki zahtjevi za točnost formulacije i sterilnost tehnološke opreme. Prilikom samog početka procesa proizvodnje mliječnih proizvoda velika pažnja se pridaje izboru sirovog mlijeka odnosno njegovoj kvaliteti. Kvaliteta sirovog mlijeka obuhvaća kriterije koji se odnose na sam sastav mlijeka (mliječna mast, proteini, laktoza), mikrobiološku

ispravnost mlijeka koja je definirana ukupnim brojem mikroorganizama te na sadržaj somatskih stanica (stanica koje dolaze iz mliječnih žlijezda) čiji je visoki broj povezan s infekcijama kao što je mastitis (More, 2009).

Prvi korak kojim započinje proizvodnja svakog mliječnog proizvoda započinje već na samim farmama gdje se odvija skupljanje sirovog mlijeka koji se podvrgava procesu filtracije kojim se uklanjaju različite nečistoće nakon čega se mlijeko hladi i skladišti te priprema za transport (slika 1).



Slika 1. Prikaz osnovnih procesa u obradi mlijeka (prema Chandan, 2015)

Mlijeko koje je transportirano pomoću cisterni se u industrijskim pogonima smješta u silose u kojima se obično zadržava najduže 24 h do obrade. Tijekom ove faze maksimalni broj bakterija koji smije biti prisutan iznosi 300 000 CFU/mL što je više u usporedbi s maksimalno dopuštenim brojem bakterija u uzorcima na farmi koji iznosi 100 000 CFU/mL (Frye, 2013). Veći broj je opravdan zbog činjenice da tijekom pumpanja sirovine se razbijaju nakupine bakterija time dajući veći broj i postoji veća mogućnost kontaminacije mlijeka jer dolazi u kontakt s više opreme tijekom rukovanja i prijenosa. Također, duže vrijeme skladištenja povećava broj bakterija. Sirovo mlijeko iz silosa propušta se kroz separatore, koji su ništa drugo nego centrifuge kod kojih se na principu centrifugalne sile pri velikim brzinama provodi odvajanje različitih tvari na osnovi njihove gustoće. Separatori tako razdvajaju mlijeko na lakšu frakciju vrhnja i težu frakciju obranog mlijeka. Osim toga odvajaju se i teške čestice kazeina, leukociti, veće bakterije, tjelesne stanice iz kravljeg vimena, čestice prašine i prljavštine. Potom se obrano mlijeko koje normalno sadrži 0,01 % mliječne masti podvrgava procesu standardizacije u kojem se odvija miješanje frakcija vrhnja i obranog mlijeka kako bi se dobili mliječni proizvodi

s određenim udjelom mliječne masti. Takav proizvod se naziva standardizirano mlijeko. To mlijeko podliježe toplinskoj obradi koja se provodi s ciljem uništavanja svih mikroorganizama što uključuje i patogene mikroorganizme koji uzrokuju bolesti te se inaktiviraju enzimi prisutni u mlijeku radi produženja trajnosti te osiguravanja proizvoda velike mikrobiološke kvalitete. Homogenizacija je postupak usitnjavanja i ujednačavanja veličine globula mliječne masti u mlijeku ili vrhnju pod utjecajem visokog tlaka s ciljem veće stabilnosti emulzije masti u mlijeku. Proces homogenizacije uzrokuje da se izvorne globule mliječne masti čiji je promjer približno 3,5 μm rasprši u vrlo velik broj puno manjih masnih globula čija je prosječna veličina $<1 \mu\text{m}$. Homogenizirano mlijeko ima svojstvo da ne stvara sloj kreme prilikom skladištenja, ima intenzivniju bijelu boju, punoću i karakteristike okusa, osim toga homogenizacija dovodi do bolje viskoznosti i stabilnosti proizvoda. Potom slijedi proces hlađenja, pakiranja proizvoda u odgovarajuću ambalažu te skladištenje u hladnim rashladnim prostorijama do isporuke (Chandan, 2015). Prema ovom osnovnom principu obrade mlijeka te uz dodatak pojedinih specifičnih koraka nastaje niz mliječnih proizvoda poput jogurta, kefira, vrhnja, maslaca, kajmaka (skorup), tvrdog, polutvrdog, mekog i svježeg sira, sirutke, mliječnih napitaka, mliječnih deserata i smrznutih deserata.

2.1.2. Nusproizvodi mliječne industrije

Iako mliječna industrija daje široku paletu korisnih mliječnih proizvoda, ona je izvor i prevelike količine otpada i nusproizvoda. Nusproizvodi u mliječnoj industriji su svaki onaj sekundarni ili nenamjerni proizvod ili tvari koji nastaju kao rezultat tijekom obrade mlijeka uz glavne proizvode, poput sira, maslaca, jogurta ili mlijeka u prahu. Iako nisu primarni cilj proizvodnog procesa, glavni mliječni nusproizvodi poput sirutke, laktoze, kazeina, permeata i mlaćenice često imaju značajnu nutritivnu vrijednost i mogu se dalje koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj ili stočnoj industriji, čime se smanjuje otpad i povećava ekonomska isplativost proizvodnje (Jayasree Joshi i sur., 2024).

Mliječna industrija godišnje proizvede milijune tona nusproizvoda, čija je glavna komponenta sirutka. Tijekom proizvodnje 1 kg sira nastaje čak 9 do 10 L sirutke koja ako se odbaci bez tretmana, stvara značajan problem za okoliš (Pires i sur., 2021). Sirutka proizvedena tijekom proizvodnje sira je otpad koji je u ovom sektoru najviše kontaminiran, zbog čega je toliko važno razviti nove metode za upravljanje njome (Szudera-Kończal i sur., 2020).

Ono što sirutku klasificira kao visoko zagađujući proizvod je udio laktoze u sirutki koji iznosi 75 % ukupne suhe tvari sirutke. Osim toga visoke vrijednosti biokemijske potrebe za kisikom (BPK) i kemijske potrošnje kisika (KPK) koje iznose oko 27 – 60 g/L odnosno 50 – 102 g/L otežavaju jednostavno zbrinjavanje sirutke. Odlaganje sirutke na tlo stvara ozbiljno

onečišćenja okolnog okoliša utječući na fizikalno-kemijske karakteristike tla što rezultira smanjenim prinosima usjeva. Nadalje, kada se ispusti u vodena staništa, smanjuje količinu otopljenog kisika, otežava biorazgradivost i predstavlja veliki rizik za okoliš, živi svijet u vodi i zdravlje ljudi (Yadav i sur., 2015). Međutim, s obzirom na razvoj kemije i tehnologije sirutka je potencijalna sirovina za proizvodnju raznih proizvoda visoke vrijednosti u poljoprivredno-prehrambenoj, biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji. Tako je laktoza u sastavu sirutke našla svoju primjenu u proizvodnji glavnih mliječnih proizvoda, često se koristi za standardizaciju razine proteina u krajnjim mliječnim proizvodima (Banaszewska i sur., 2014).

2.1.3. Sirutka

Sirutka predstavlja 85 – 95 % ukupnog volumena mlijeka, a sadržava oko 55 % hranjivih tvari (laktoza, hidrosolubilni minerali, vitamini) iz mlijeka i približno 20 % ukupnih proteina (León-López i sur. 2022). Sirutka je najčešće žuto-zelene boje zbog prisutnosti riboflavina, a njezin sastav ovisi o podrijetlu mlijeka, vrstama sireva iz čije proizvodnje nastaje i općenito o čimbenicima koji utječu na sastav mlijeka kao što su pasmina, sezonski ciklusi, hrana i faza laktacije. Prema Prazeresu i sur. (2012) sirutka se sastoji od 93 do 94 % vode, 4,5 – 6,0 % laktoze, 0,6 – 1,1 % proteina, 0,8 – 1,0 % minerala, 0,05 – 0,9 % mliječne kiseline i 0,06 – 0,5 % masti. Osim osnovnih komponenti sirutka sadrži nekoliko jedinstvenih komponenti poput imunoglobulina, laktoferina, laktoperoksidaze, glikomakropeptida i sfingolipida koji posjeduju neka važna antimikrobna i antivirusna svojstva. Neke komponente sirutke posjeduju antikancerogena svojstva, poput sfingomijelina, koji mogu spriječiti rak debelog crijeva. Ove komponente su pokazatelj potencijalnog terapijskog svojstva sirutke (Gupta i Prakash, 2017).

β -laktoglobulin koji čini približno polovicu ukupnog proteinskog sadržaja u sirutki posjeduje različite funkcionalne i nutritivne karakteristike. Predstavlja izvor esencijalnih aminokiselina kao i peptida širokog raspona bioaktivnosti. Za istaknuti je bioaktivnih peptida poput antihipertenzivnog peptida ALPM, peptida IIAGL koji je pokazao hipokolesterolemičko djelovanje te opioidnog peptid TLLP s djelovanjem na funkciju arterija kod štakora. Peptidi dobiveni iz β -laktoglobulina posjeduju značajan biološki potencijal, no za potvrdu njihovih fizioloških učinaka neophodna su daljnja *in vivo* istraživanja (Park, 2009).

α -laktalbumin je protein koji čini oko 20 % proteina sirutke u kravljem mlijeku i za razliku od β -laktalbumina prisutan je i u humanom mlijeku u kojem čini najveći udio od ukupnih proteina sirutke. Pokazuje značajne antiproliferativne učinke na ljudske adenokarcinomske stanične linije, poput Caco-2 i HT-29. Osim toga, ima sposobnost ubijanja tumorskih stanica te posjeduje baktericidne učinke u gornjim dišnim putovima, kao i zaštitna svojstva za želučanu sluznicu (Gupta i Prakash, 2017).

Laktoferin je glikoprotein koji veže željezo, a poznat je po mnogim biološkim aktivnostima poput antimikrobne, antioksidativne, protuupalne, antikancerogene i imunoregulacijskog svojstva. Laktofericin B i laktoferampin su poznati antimikrobni peptidi koji nastaju iz laktoferina hidrolizom uz pomoć probavnog enzima pepsina. Njihova važnost je u tome što mogu poboljšati funkciju imunološkog sustava potičući proizvodnju imunoloških stanica i citokina koji su ključni za borbu protiv infekcija.

Imunoglobulini IgG, IgM i IgA koji su prisutni u kravljem mlijeku čine približno 10 – 15 % ukupnih proteina sirutke (Gupta i Prakash, 2017). Imaju ključnu ulogu u obrani organizma jer mogu spriječiti adheziju štetnih mikroorganizama, inhibirati bakterijski metabolizam, aglutinirati bakterije, povećati fagocitozu bakterija, neutralizirati toksine i viruse.

2.1.4. Slatka i kisela sirutka

Ovisno o tehnikama obrade koje se koriste za uklanjanje kazeina iz tekućeg mlijeka sirutka se može podijeliti na dvije vrste: slatku i kiselu sirutku. Najčešća vrsta sirutke potječe iz proizvodnje sira ili određenih kazeinskih proizvoda, kod kojih se obrada temelji na koagulaciji kazeina pomoću sirila odnosno industrijskog pripravka za zgrušavanje kazeina koji sadrži kimozin ili druge enzime za zgrušavanje kazeina (Macwan i sur., 2016). Koagulacija kazeina izazvana sirilom događa se pri približno pH 6,5, a sirutka dobivena na taj način naziva se slatkom sirutkom. Slatka sirutka nusproizvod je u proizvodnji većine polutvrdih i tvrdih (zrelih) sireva poput sira Cheddar ili švicarskih sireva (Bansal i Bhandari, 2016). Druga vrsta sirutke je kisela sirutka čiji pH približno iznosi 4,5 – 5,8. Kisela sirutka je rezultat procesa koji koriste fermentaciju ili dodavanje organskih kiselina poput limunske, octene ili mliječne kiseline ili mineralnih kiselina poput klorovodične ili sumporne kiseline za koagulaciju kazeina (Ryan i Walsh, 2016). Kisela sirutka nastaje pri proizvodnji svježih sireva i fermentiranih mliječnih proizvoda, poput sira ricotte ili grčkog jogurta, pri čemu se mliječna kiselina koristi za zgrušavanje mlijeka.

Glavna razlika u sastavu između kisele i slatke sirutke su pH vrijednosti, sadržaj minerala, količina laktoze i mliječne kiseline te sadržaj proteina sirutke. Osim što kiselu sirutku karakteriziraju niže pH vrijednosti u usporedbi sa slatkom sirutkom ona sadrži veću količinu kalcijevih iona, kao i fosfatnih aniona te veću količinu mliječne kiseline (Bansal i Bhandari, 2016). Slatka sirutka pak sadrži veći udio laktoze, nego kisela sirutka, dok je količina proteina koji predstavljaju nutritivno najvrjedniju komponentu i u slatkoj i u kiseloj sirutki vrlo slična (Božanić i sur., 2023).

S rastućom proizvodnjom grčkog jogurta i svježeg sira kao i svih drugih mliječnih proizvoda, mliječna industrija je pod pritiskom da razvije inovativne metode za recikliranje

nusproizvoda na održiv način. Danas je već poznato nekoliko mogućih praktičnih upotreba sirutke kao nusproizvoda i njezine dobrobiti. Tako se kisela sirutka primjenjuje kao polazni materijal u proizvodnji fermentiranih pića, kao medija za uzgoj bakterija mliječne kiseline u zamjenu za komercijalne medije, te kao supstrat za izolaciju laktoze i minerala. Ističu se i potencijalne zdravstvene dobrobiti glavnih proteinskih sastojaka sirutke poput bioaktivnih peptida. Slatka sirutka predstavlja sirovinu za napitke na bazi mlijeka kao što je kefir, primjenjuje se kao izolat proteina sirutke odnosno koncentrat proteina sirutke (Buchanan i sur., 2023). Kisela sirutka se može koristiti i kao gnojivo koje se ili izravno dodaje u tlo ili se miješa sa stajskim gnojem prije same primjene (Ketterings i sur., 2017). Još jedna uobičajena upotreba kisele sirutke je hrana za životinje. Kisela sirutka također se može anaerobno razgraditi u zapaljivo gorivo kao što je plin metan, koji se zauzvrat može koristiti kao izvor energije.

Jedno od modernih rješenja koje se ističe za korištene ovih nusproizvoda su mikrobni procesi kojima se sirutka koristi za dobivanje proizvoda s dodanom vrijednošću. Pa tako zbog izvora laktoze i nekih drugih hranjivih tvari sirutka može podržati rast mikroorganizama za proizvodnju bioproizvoda. Neki od bioproizvoda koje iz mliječnog otpada proizvode mikroorganizmi prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Popis nekih bioproizvoda proizvedenih iz sirutke mikrobnom fermentacijom (prema Sar i sur., 2022)

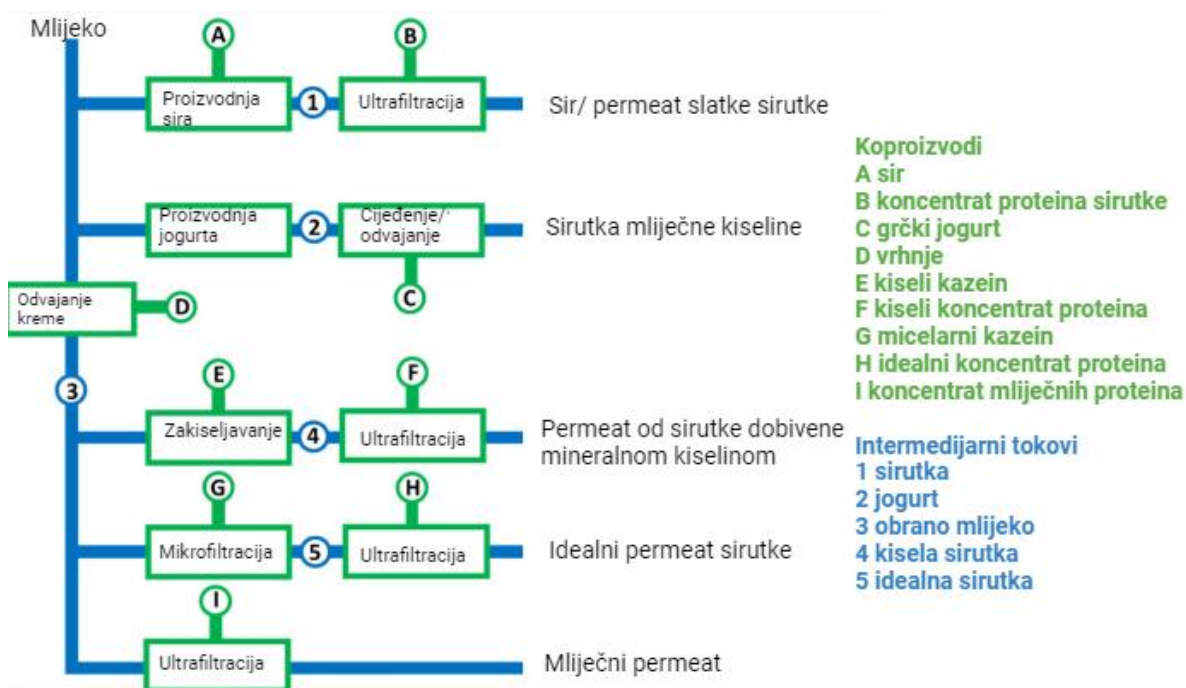
Vrsta bioproizvoda	Bioproizvod
Biogoriva	Biometan, bioetanol, biovodik, biodizel
Enzimi	β -galaktozidaza, α -amilaza
Otapala	Biobutanol
Vitamini	B12
Organske kiseline	Propionska, octena, glukonska, mliječna, limunska, jantarna, pirogroždana kiselina
Bioaktivni spojevi	Laktobionična kiselina, nisin z, plantaricin, pediocin, enterocin AS-48, galakto-oligosaharidi
Egzopolisaharidi	Dekstran, ksantanska celuloza

Najveći interes je usmjeren na bioaktivne spojeva koji se mogu dobiti korištenjem sirutke zbog njihove dobrobiti za ljudsko zdravlje. Stoga su uloženi mnogi naponi da se pronađu novi i isplativi načini za njihovu proizvodnju u velikim razmjerima. Tako se nastoji poboljšati korištenjem sirutke za proizvodnju antimikrobnih peptida poput nisina i pediocina koji mogu učinkovito djelovati na Gram-negativne ili Gram-pozitivne bakterije ili na oboje čime predstavljaju obećavajuće antibiotike za liječenje infekcija koje su otporne na sve druge već

poznate lijekove (Sar i sur., 2022).

2.1.5. Permeat

Osim sirutke, kao nusproizvod u mliječnoj industriji ističe se i mliječni permeat koji se proizvodi ultrafiltracijom mlijeka, slatke sirutke ili kisele sirutke tijekom proizvodnje koncentrata proteina mlijeka ili sirutke i izolata proteina mlijeka ili sirutke kao i kod predkoncentriranja mlijeka za proizvodnju sira (O'Donoghue i Murphy, 2023; Oliveira i sur., 2019). Na slici 2 jasno su prikazani svi putevi kojima u mliječnoj industriji nastaju različite vrste permeata. Među njima se mliječni permeat smatra najčišćim nusproizvodom mlijeka jer se dobiva iz mlijeka u ranijoj fazi prerade i ne sadrži razne dodatke kao što su enzim, sirila, pomoćna sredstva za podešavanje pH, boja ili starter kulture koje se obično koriste u proizvodnji sira i drugih proizvoda (Oliveira i sur., 2019).



Slika 2. Prikaz mliječnih proizvoda čijom proizvodnjom nastaje nusproizvod permeat (prema O'Donoghue i Murphy, 2023)

Ultrafiltracijom mlijeka proizvodi se velika količina permeata. Permeat iz mlijeka nakon provedene ultrafiltracije sadrži prvenstveno vodu, laktozu, minerale i vrlo nisku koncentraciju proteina. Od prisutnih proteina čak 90 % odgovara α -laktalbuminu, a ostatak β -laktalbuminu i hidrolizatima β -kazeina (Jahadi i sur., 2018). Budući da permeati imaju nizak udio masti i proteina, njihova se funkcionalnost uglavnom temelji na sadržaju laktoze ili minerala zbog čega imaju široku paletu primjena u prehrambenoj industriji. Prvenstveno se permeat iskorištava kao izvor laktoze u proizvodnji jestive ili farmaceutske laktoze te se koristi kao dodatak stočnoj hrani. U 2021. godini na globalno je tržište uvedeno ukupno 752 nova proizvoda koji sadrže permeat.

Ti novi proizvodi spadaju u pet glavnih prehrambenih sektora kao što su konditorski proizvodi (27,4 %), pekarski proizvodi (17,8 %), grickalice (9,3 %), mliječni proizvodi (8 %) i topli napici (6,6 %). U novije vrijeme permeat ima sve značajniju upotrebu u industriji pića s određenim zdravstvenim prednostima kao što su probiotička i prebiotička pića. Ovakva pića na bazi permeata najčešće su inokulirana s bakterijama mliječne kiseline koje imaju sposobnost da proizvode enzime koji će laktozu iz permeata pretvarati u prebiotičke derivate kao što su galaktooligosaharidi. Osim toga bakterije mliječne kiseline pokazuju i antimikrobno djelovanje jer izlučuju različite spojeve kao što su organske kiseline, tvari slične bakteriocinima i određene enzime.

Osim izravne primjene permeata, važna je i njegova neizravna primjena, osobito tekućeg permeata, koji se može koristiti kao sirovina za mliječno-kiselu fermentaciju pri kojoj se proizvodi mliječna kiselina ili se može koristiti kao medij za rast gljiva i mikroalgi koje se koriste u proizvodnji enzima. Laktoza prisutna u permeatu također se može izomerizirati u druge derivate na bazi laktoze, kao što su laktuloza ili epilaktoza, koji se koriste u funkcionalnoj hrani ili se može hidrolizirati u monosaharide za stvaranje slatkih sirupa (Chourasia, 2022).

Primjena permeata ima široki raspon od izravne primjene u prehrambenim proizvodima za poboljšavanje nutritivnih ili fizioloških karakteristika samog proizvoda do upotrebe permeata za stvaranje visokovrijednih sastojaka koji se kasnije mogu koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Jasno je da permeat ima veliki potencijal za stvaranje proizvoda s dodanom vrijednošću zbog visokog udjela laktoze i minerala te zbog toga primjena permeata u hrani za životinje ili pak njegovo odlaganje kroz sustave otpadnih voda predstavlja loše korištenje vrijedne sirovine. Treba naglasiti kako za određeni permeat njegova najbolja iskoristivost može biti i neprehrambena uporaba, kao što je proizvodnja biogoriva (O'Donoghue i Murphy, 2023).

2.2. BIOAKTIVNI PEPTIDI PRISUTNI U MLIJEKU I NUSPROIZVODIMA MLIJEČNE INDUSTRIJE

2.2.1. Bioaktivni peptidi i njihove karakteristike

Bioaktivni peptidi su organske tvari sastavljene od aminokiselina povezanih kovalentnim vezama poznatijim kao amidne ili peptidne veze (Sánchez i Vázquez, 2017). Bioaktivni peptidi kao biološke molekule obično su ugrađene u strukturu matičnih proteina te postaju aktivne nakon razgradnje tih proteina (Akbarian i sur., 2022). Aminokiselinski sastav i sekvenca određuju aktivnost peptida nakon što se otpuste iz proteina prekursora gdje su šifrirani. Ono što je zajedničko za većinu bioaktivnih peptida je da sekvenca sadrži od 2 do 20 aminokiselina

te da su prisutne hidrofobne aminokiseline uz skupine prolina, lizina ili arginina (Sánchez i Vázquez, 2017).

Klasifikacija bioaktivnih peptida na endogene i egzogene peptide dijeli se prema tome proizvode li se unutar organizma ili su pak u organizam uneseni iz različitih izvora poput hrane ili lijekova. Endogeni peptidi se sintetiziraju u različitim tipovima stanica, poput neurona, imunoloških stanica te u žlijezdama poput hipofize ili nadbubrežnoj žlijezdi, a takvi peptidi onda najčešće imaju analgetičku i opioidnu ulogu, sudjeluju u upalnim procesima i antimikrobnoj zaštiti. Egzogeni peptidi se u organizam unose iz različitih vanjskih izvora među kojima se najviše unose hranom (Akbarian i sur., 2022).

Ono zbog čega su bioaktivni peptidi u fokusu istraživanja je njihova značajna uloga na ljudsko zdravlje. Prepoznato je da imaju utjecaj na probavni, endokrini, kardiovaskularni, imunološki i živčani sustav. U usporedbi s tradicionalnim lijekovima primjena bioaktivnih peptida u terapijske svrhe je sve primamljivija jer su stabilniji, lakše se apsorbiraju i specifično djeluju na ciljane tkiva i to pri niskim koncentracijama bez toksičnih učinaka. Stoga bioaktivni peptidi predstavljaju značajan potencijal za primjenu u funkcionalnoj hrani, nutraceuticima te kao terapijska sredstva za prevenciju i liječenje raznih kroničnih bolesti. Funkcije koje se pripisuju bioaktivnim peptidima dobivenim iz hrane uključuju antimikrobna, antioksidativna, antiamnestička, antimutagena, antikancerogena, antihipertenzivna, antihemolitička, protuupalna, antitrombotička, imunomodulatorna, citomodulatorna i osteogena svojstva, kao i supresiju apetita, vezivanje minerala ili opioidno djelovanje, ovisno o njihovoj specifičnoj strukturi (Banić i sur., 2024).

Potencijalni izvori bioaktivnih peptida su mnogobrojni, a neki od istaknutijih su morski organizmi (poput spužvi i mekušaca), mliječni proizvodi, proizvodi od jaja, mesni proizvodi, biljke poput soje, zobi, pšenice, suncokret (Akbarian i sur., 2022).

2.2.2. Funkcije i mehanizmi djelovanja bioaktivnih peptida

Današnji način života ljude sve više izlaže različitim vrstama stresnih situacija koje utječu na tjelesne i psihičke sposobnosti osobe, uzrokuje psihosomatske probleme i smanjuje učinkovitost osobe u različitim aspektima života. U organizmu tada može nastupiti stanje koje se naziva oksidativni stres. Oksidativni stres je stanje koje nastaje kada nema ravnoteže između proizvodnje reaktivnih kisikovih ili dušikovih vrsta i antioksidativnog obrambenog sustava. Posljedice koje oksidativni stres može uzrokovati su ozbiljna oštećenja važnih staničnih makromolekula (lipidi, nukleinske kiseline i proteini), osim toga proizvodnja reaktivnih kisikovih vrsta povezuje se s bolestima poput raka, Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Kako je u organizmu proizvodnja slobodnih radikala reaktivnih kisikovih vrsta neizbježna tijelo je

razvilo antioksidativni obrambeni mehanizam za djelomičnu neutralizaciju njihovih štetnih učinaka. Antioksidativni obrambeni mehanizam se primarno sastoji od antioksidativnih enzima, ali uz njih dodatnu obrambenu barijeru stvaraju antioksidansi (male molekule koje reagiraju sa slobodnim radikalima) i bioaktivni peptidi s antioksidativnim djelovanjem. Iako mehanizmi kojim peptidi ispoljavaju svoje antioksidativne učinke nisu u potpunosti razjašnjeni, neke studije pokazuju da bioaktivni peptidi mogu direktno reagirati sa slobodnim radikalima, stimulirati aktivnost ključnih antioksidativnih enzima i vezati se za slobodne metale čime sprječavaju nastajanje slobodnih radikala i smanjuju oksidativni stres (Guo i sur., 2003).

Antimikrobno djelovanje bioaktivnih peptida ove peptide čini vrlo zanimljivim kao izvor novih lijekova za borbu protiv uzročnika infekcija. Neki antimikrobni peptidi dokazano smanjuju rast štetnih mikroorganizama, ali ne stupaju u izravnu interakciju s ciljanim mikroorganizmima, već to čine uz pomoć imunološkog sustava domaćina na način da potiču stimulaciju proliferacije prirodnih stanica ubojica, stimulaciju fagocitoze makrofaga te ekspresiju mnogih protutijela, citokina i kemokina. Zabilježeno je da je antimikrobna aktivnost peptida povezana i s njihovom protuupalnom funkcijom, pa se može reći da antimikrobni bioaktivni peptidi imaju dvostruko djelovanje osim što štite domaćina od štetnih mikroorganizama štite domaćina i od štetnih učinaka pretjeranih upalnih odgovora (Wittkopf i sur., 2014).

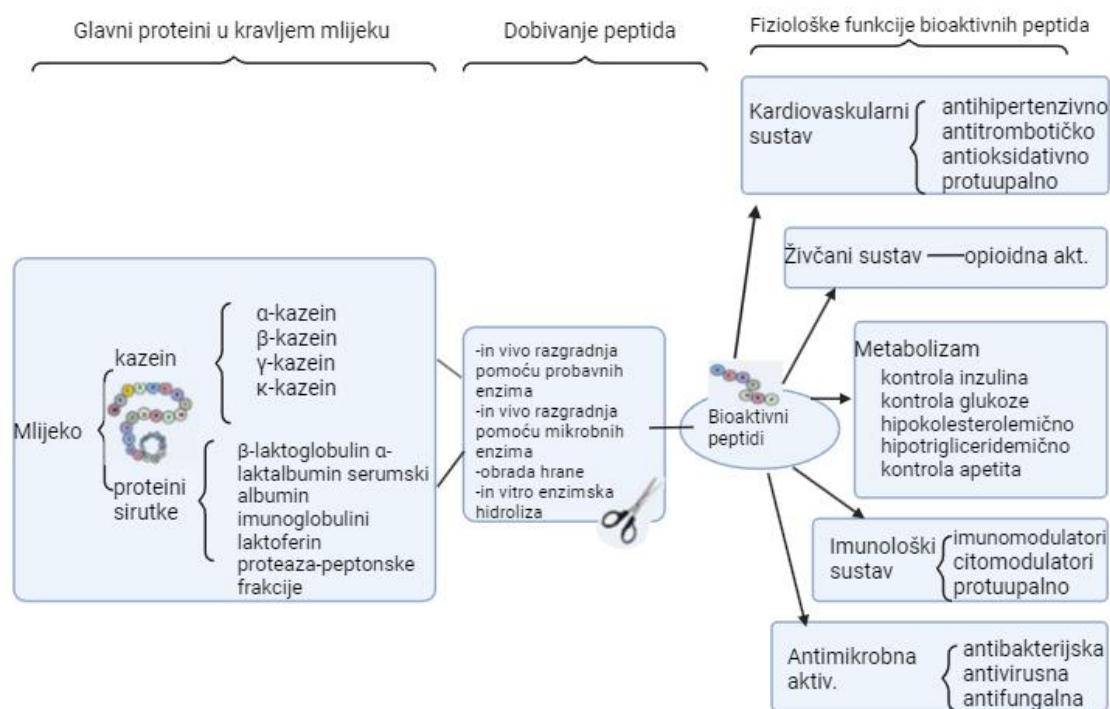
Antihipertenzivno djelovanje bioaktivnih peptida je jedno od najistaknutijih i najznačajnijih funkcija bioaktivnih peptida s obzirom da kardiovaskularne bolesti predstavljaju vodeći uzrok smrti širom svijeta. Samo djelovanje bioaktivnih peptida najčešće je pokazano preko inhibicije angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE), čime se sprječavaju konverzija angiotenzina I u angiotenzin II koji je snažan vazokonstriktor koji podiže krvni tlak. Osim ACE inhibicije, neki peptidi djeluju i moduliranjem drugih mehanizama, poput endotelne funkcije, vazodilatacije i smanjenja oksidativnog stresa. Također mogu inhibirati aktivnost renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS), čime doprinose sniženju krvnog tlaka (Majumder i Wu, 2015).

Imunomodulacijski peptidi imaju funkciju koja sudjeluje u pravilnom funkcioniranju imunološkog sustava koji je važan za održavanje zdravlja. Način na koji djeluju je kroz stimuliranje ili inhibiciju specifičnih funkcija imunološkog sustava. Kazein i proteini sirutke predstavljaju izvor imunomodulacijskih peptida koji svoje djelovanje iskazuju potičući imunološki odgovor kada se vežu na specifične receptore. Posljedično dolazi do stimulacije ili inhibicije specifičnog imunološkog odgovora kao što je aktivacija i proliferacija limfocita, proizvodnja imunoglobulina i ekspresija citokina. Osim toga mogu stimulirati ili inhibirati odgovor nespecifične imunosti kao što je aktivnost makrofaga, granulocita i prirodnih stanica ubojica (Marccone i sur., 2017).

2.2.3. Bioaktivni peptidi iz mlijeka

Mlijeko i mliječni proizvodi predstavljaju najveći izvor bioaktivnih proteina i peptida koji se mogu dobiti iz hrane. Bioaktivni peptidi u mlijeku potječu od kazeina (α -, β -, γ - i κ -kazein) i proteina sirutke (β -laktoglobulin, α -laktalbumin, serumski albumin, imunoglobulini, laktoferin i proteaza-peptonske frakcije). Većina bioaktivnih peptida prisutnih u mlijeku nalazi se u svom neaktivnom obliku koji je uklopljen unutar native sekvence proteinske molekule. Stoga da bi ispoljili svoju aktivnost mora doći do hidrolize proteina iz kojeg potječu (Tudor Kalit i sur., 2024). Dobivanje bioaktivnih peptida iz prekursor proteina može se provesti enzimskom hidrolizom, mikrobnom fermentacijom ili tijekom probave. Enzimska hidroliza se provodi pomoću specifičnih enzima kao što su tripsin, pepsin i kimotripsin, a sama hidroliza se može provoditi *in vivo* kao i *in vitro*. Mikrobnom fermentacijom se proizvode bioaktivni peptidi u procesima dobivanja mliječnih proizvoda poput jogurta, kefiru i sira u čijoj proizvodnji se koriste određene bakterije mliječne kiseline (npr. *Lactococcus lactis*) koje proizvode odgovarajuće enzime. Ovaj način je jedan od najprimjenjivanih zbog svoje isplativosti, ekološke prihvatljivosti i jednostavnosti jer se postupak već koristi za proizvodnju funkcionalnih namirnica koje su obogaćene bioaktivnim peptidima. I upravo su fermentirani mliječni proizvodi poznati kao najveći izvori bioaktivnih peptida koji se dobivaju iz hrane (Banić i sur., 2024). Postoji mogućnost enzimске hidrolize proteina enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka te enzimska hidroliza provedena kombinacijom s probavnim enzimima i proteolitičkim mljekarskih kulturama ili enzimima izvedenim iz mikroorganizama i biljaka.

U gastrointestinalnom traktu se tijekom probave izlučuju probavni enzimi koji hidroliziraju protein na peptide, osim toga crijevni mikroorganizmi mogu pridonijeti hidrolizi proteina i stvaranju bioaktivnih peptida. Tijekom probave, bioaktivni peptidi mogu se apsorbirati iz crijeva u krvotok i djelovati ili lokalno u gastrointestinalnom sustavu ili sistemski. Osim toga, mikrobni enzimi prisutni u crijevima ili u hrani ciljaju različita mjesta cijepanja u usporedbi s izoliranim enzimima, te tako peptidi generirani tim enzimima mogu biti različiti od onih generiranih tijekom probave. Na slici 3 vidljivi su prekursor proteini u mlijeku iz kojih odgovarajućom hidrolizom nastaju brojni bioaktivni peptidi koji u određenom sustavu pokazuju veliki spektar fizioloških funkcija (Marccone i sur., 2017).



Slika 3. Prikaz dobivanja bioaktivnih peptida iz prekursor proteina prisutnih u mlijeku te njihove fiziološke funkcije (prema Marccone i sur., 2017)

Kao što je već poznato, bioaktivni peptidi iz mlijeka se zbog svojih višestrukih dobrobiti za ljudsko zdravlje koriste u formuliranju funkcionalne hrane, nutraceutika i prirodnih lijekova. Dokazana je povezanost između povećane konzumacije mliječnih proizvoda i poboljšanog metaboličkog zdravlja i zbog toga postoji dobar razlog za tvrdnju da bioaktivni peptidi dobiveni iz mlijeka mogu doprinijeti ljudskom zdravlju. Neki od relevantnih bioaktivnih peptida iz mlijeka i njihov potencijal u prevenciji ili ublažavanju zdravstvenih problema povezanih s ljudskim zdravljem zabilježeni su u liječenju kardiovaskularnih bolesti, pretilosti, dijabetesa, imunološkog odgovora i kod liječenja raka.

Jedan od primjera u kojem valja istaknuti primjenu i važnost bioaktivnih peptida iz mlijeka je liječenje dijabetesa. Budući da u svijetu oko 400 milijuna ljudi boluje od nekog oblika dijabetesa upravo je ta kronična bolest u fokusu brojnih liječnika kojima je cilj unaprijediti ljudsko zdravlje. Ova bolest nastaje ili kao rezultat autoimunog uništavanja beta stanica gušterače koje izlučuju inzulin (dijabetes tipa 1) ili kao rezultat inzulinske rezistencije u perifernim organima što dovodi do nereguliranog izlučivanja inzulina i konačnog otkazivanja beta stanica (dijabetes tipa 2). Mliječni proizvodi pokazali su da mogu utjecati na lučenje inzulina i kontrolu glikemije pomoću velike količine esencijalnih aminokiselina i bioaktivnih peptida koji stimuliraju lučenje inzulina. Osim toga pomoću specifične kombinacije makronutrijenata i mikronutrijenata, jedinstvenih probiotičkih sojeva i bioaktivnih peptida koji se nalaze u siru i jogurtu utječu na dijabetes (Vargas-Bello-Pérez i sur., 2019). Prema ovim autorima, specifični peptid LPQNIPPL može inhibirati dipeptidil-peptidazu 4 (DPP-4) koja predstavlja ključni enzim u regulaciji inzulina.

Pa tako konzumacijom proizvoda od sirutke se inhibira DPP-4 i zauzvrat potiče lučenje inzulina, što može imati povoljan učinak kod osoba s kompromitiranim lučenjem inzulina. Daljnja istraživanja mliječnih proizvoda bogatih bioaktivnim peptidima kao što su VAGTWY i LPQNIPP mogla bi se koristiti za pomoć u glikemijskoj kontroli razine inzulina i lučenju inzulina kod pacijenata s dijabetesom.

Kako je u samom mlijeku zabilježena značajna količina različitih bioaktivnih peptida tako je i u nusproizvodima mliječne industrije zabilježena njihova prisutnost. Danas nusproizvodi ne predstavljaju otpad već veliki potencijal. Njihova primjena je istraživana u prehrambenoj industriji za proizvodnju funkcionalne hrane i pića, u zdravstvu i farmaceutskoj industriji kao novi lijekovi i nutraceutici u borbi protiv raznih kroničnih bolesti, kozmetičkoj industriji u sklopu *anti-aging* proizvoda, veterinarskoj i stočarskoj industriji kao dodaci hrani za životinje i za kraj zbog svih ovih primjena omogućeno je bolje očuvanje okoliša.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Kako bi ovaj rad mogao biti ponovljiv u sljedećim potpoglavljima biti će navedeni detaljni podaci o korištenom laboratorijskom priboru za pripremu uzoraka, korištenim uređajima kao i kemikalije koje su potrebne kako bi se identificirali i kvantificirali prisutni bioaktivni peptidi u sirutki i permeatu. Osim toga navedene su i baze podataka i programi koji su korišteni prilikom provedbe navedenog postupka i statističke obrade podataka.

3.1.1. Uzorci za analizu

Uzorci koji su korišteni dobiveni su iz DUKAT mliječne industrije d.d., Tvornica Bjelovar. Analizirani su uzorci kisele i slatke sirutke te uzorci permeata. Ovi uzorci predstavljaju nusproizvode mliječne industrije koji nastaju tijekom proizvodnje svježih sireva, polutvrdih sireva odnosno kod ultrafiltracije mlijeka.

3.1.2. Laboratorijski uređaji

- Dionex Ultimate 3000 RSLC nano sustav, Thermo scientific , SAD
- Liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka
- Centrifuga Centric, Tehnica, Slovenija
- Analitička vaga, Mettler Toledo, XPE205, SAD
- FVL-2400N Combi-Spin mini-centrifuga/vortex, Biosan, Latvija
- Ultrazvučna kupelj, FALC Instruments, Italija
- TripleTOF 6600+ System, Sciex, SAD
- ESI OptiFlow Turbo V ionizacijski izvor, Sciex, SAD
- Uređaj za pročišćavanje vode – Synergy UV ultrapure Water (Type 1), Sigma, Njemačka

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Eppendorf epruvete (1,5 mL; 2 mL; 5 mL), Eppendorf, SAD
- Stalci za Eppendorf epruvete, neoLab, Njemačka
- Automatske pipete (0,1 – 5000 µL), Eppendorf, SAD
- Nastavci za automatske pipete (0,1 – 5000 µL), Eppendorf, SAD

- Plastične sterilne Petrijeve zdjelice, Golias, Slovenija
- Špatula, Fisher Scientific, SAD
- Viale, Agilent Technologies, SAD
- Microcon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit – filteri za centrifugiranje s membranom od 10 kDa, Merck, Njemačka
- Predkolona:
 - MicroTrap C18 10 x 0,3 mm, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Kolona:
 - Acclaim PepMap RSLC column, 75 μ m x 15 cm, Thermo Fisher Scientific, SAD

3.1.4. Kemikalije

- ACN (acetonitril), VWR Chemicals, Francuska
- peptidni kalibranti, PepCalMix Sciex, SAD
- formijatna kiseline (engl. *formic acid*, FA), Sigma-Aldrich, SAD
- Metanol, Sigma-Aldrich, SAD
- Ultračista voda, 18 M Ω /cm

3.1.5. Otopine

- 98/2 0,1 % FA u ACN/ voda [v/v]
- 10 % metanol
- 0,1 % FA
- 98/2 0,1 % FA u vodi/ ACN [v/v]
- Otopine za nano-LC:
 - Mobilna faza A: 98 % voda, 2 % ACN, 0,1 % FA
 - Mobilna faza B: 98 % ACN, 2 % voda, 0,1 % FA

3.1.6. Programi i baze podataka

- *Milk Bioactive Peptide Database* (MBPDB), verzija 3.7.17. (pristupljeno 25. lipnja 2024.)
- *UniProt* baza podataka (pristupljeno 5. lipnja 2024.)
- *MetaboAnalyst*, verzija 6.0 – web platforma korištena za interpretaciju, kvantitativnu analizu i vizualizaciju podataka
- *ProteinPilot Software* – alat za analizu proteomskih podataka dobivenih iz masene spektrometrije koji omogućava analizu i kvantifikaciju

- *SWATH Variable Window Calculator V1.2* – za optimiziranje varijabilnih prozora za provođenje SWATH-DIA analize
- *Analyst TF 1.8.1.* – program korišten za upravljanje, akviziciju i obradu podataka TripleTOF masenog spektrometra
- *PeakView Software* – korišten za obradu podataka SWATH-DIA

3.2. METODE

U ovom dijelu rada navedeni su svi postupci koji su bili nužni za provedbu identifikacije i kvantifikacije bioaktivnih peptida prisutnih u uzorcima nusproizvoda mliječne industrije odnosno u uzorcima slatke i kisele sirutke te permeata. Detaljnije su u sljedećim potpoglavljima opisane eksperimentalne faze pripreme uzoraka za analizu do statističke obrade podataka.

3.2.1. Liofilizacija uzoraka za analizu

Uzorci kisele sirutke, slatke sirutke te permeata su preneseni u plastične Petrijeve zdjelice u tankom sloju (visine do 1 cm) i smrznuti pri -80 °C tijekom dva sata. Nakon toga je provedena liofilizacija u uređaju Christ Alpha 1-2 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH) tijekom 24 sata. Ovako pripravljeni uzorci korišteni su dalje za izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida (slika 4).



Slika 4. Liofilizirani uzorci kisele sirutke, slatke sirutke i permeata (*vlastita fotografija*)

3.2.2. Neciljana i podatkovno ovisna analiza peptida

Kako bi se provela identifikacija peptida u liofiliziranim uzorcima sirutke i permeata korištena je spregnuta metoda tekućinske kromatografije obrnutih faza (nano LC) sa spektrometrijom masa (MS). Provođenje neciljane analize zahtijeva procese koji uključuju samu pripremu uzoraka pa sve do postavljanja specifičnih parametara koji su potrebni kako bi se provela analiza peptida. Ovi procesi su opisani u nastavku.

3.2.3. Priprema uzoraka za nano-LC

Svi liofilizirani uzorci prvo su izvagani pomoću analitične vage (Mettler Toledo, XPE205, SAD) tako da je masa od 10 do 12 mg bila prenesena pomoću špatule u Eppendorf epruvete volumena 5 mL. Odvagani uzorci su potom otopljeni u otopini koja sadržava 98 % voda, 2 % acetonitrila i 0,1 % formijantne kiseline do konačne koncentracije od 10 mg/mL. Tako pripremljeni uzorci su izmiješani i sonificirani pri sobnoj temperaturi kroz 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji (FALC Instruments, Italija) s ciljem da se pospješi otapanje peptida u otopini odnosno da se sve krute čestice otope. Nakon sonifikacije, uzorci su centrifugirani (Centric, Tehnica, Slovenija) tijekom 5 minuta pri 9000 o/min. Ovaj dodatni korak proveden je kako neotopljene

čestice u uzorcima ne bi uzrokovale začepljene membrane (Microcon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit) za filtriranje. Volumen od 500 μL uzoraka je prenesen u Microcon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit koji sadrži filter membranu koja ima tako umrežene pore da sve što je manje od 10 kDa uslijed centrifugalne sile prođe kroz membranu dok se veće molekule zadržavaju u retentantu iznad membrane. Ovaj korak omogućava da se izoliraju peptidi. Filtracija je provedena pomoću centrifugiranja na sobnoj temperaturi pri 12000 o/min kroz 5 minuta. Po završetku filtracije uzet je (za svaki uzorak) volumen od 50 μL filtrata. Potom je pripravljeno razrjeđenje tako da je dodano 450 μL otapala (98/2 0,1 % FA u vodi/ ACN) na svaki uzorak. Od tako pripremljenog razrijeđenog uzorka uzet je volumen od 100 μL i prenesen u vijale (Agilent Technologies, SAD) za tekućinsku kromatografiju.

3.2.4. Pročišćavanje i separacija peptida

Separacija peptida iz svih pripremljenih uzoraka provedena je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti koja koristi vrlo niske protoke mobilne faze, nano-LC metoda. Metoda separacije provedena je korištenjem instrumenta Dionex Ultimate 3000 RSLC nano koji je spregnut s masenim spektrometrom (TripleTOF 6600+ System). Pročišćavanje peptida provedeno je pomoću predkolone MicroTrap C18 10 x 0,3 mm (YMC) u prvih 5 minuta uz ostale parametre koji su navedeni u tablici 2. Kromatografsko odvajanje odnosno separacija peptida provedeno je pri 40 °C na koloni Acclaim PepMap RSLC, 75 μm x 15 cm pri brzini protoka koja je postavljena na 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$ i ostalim parametrima koji su navedeni u tablici 3.

Tablica 2. Parametri koji su postavljeni za korak pročišćavanja peptida na predkoloni

Mobilna faza A	Otopina voda/ACN/FA (98/2/0,1) [v/v/v]
Mobilna faza B	Otopina ACN/voda/FA (98/2/0,1) [v/v/v]
Protok	5 $\mu\text{L}/\text{min}$
Predkolona	MicroTrap C18 10 x 0,3 mm
Temperatura kolone	40 °C
Volumen injektiranja	1 μL
Ispiranje kolone	Izokratno, A/B= 95/5 [v,v], 5 min

Tablica 3. Parametri koji su korišteni za proces separacije peptida

Mobilna faza A	Otopina voda/ACN/FA (98/2/0,1) [v/v/v]		
Mobilna faza B	Otopina ACN/voda/FA (98/2/0,1) [v/v/v]		
Protok	0,3 μ L/min		
	Gradijentno		
Kolona	Acclaim PepMap RSLC, 75 μ m x 15 cm		
Temperatura kolone	40 °C		
Volumen injektiranja	1 μ L		
Temperatura autosemplera	10 °C		
Elucija peptida s kolone	Retencijsko vrijeme (min)	Mobilna faza B (%)	Mobilna faza A (%)
	0	5	95
	5	5	95
	44	40	60
	45	80	20
	49	80	20
	50	5	95
	60	5	95
Detektor	TripleTOF 6600+ System		

3.2.5. Priprema kalibranta

Kalibracijska smjesa koja sadrži 20 peptida poznatih m/z vrijednosti koji su korišteni za kalibraciju instrumenta navedeni su u tablici 4. Priprema kalibranta je provedena na način da se 2 μ L komercijalno dostupnog kalibranta PepCalMix razrijedilo u 100 μ L otopine čiji je sastav 98/2 0,1 % FA u vodi/ ACN. Tako pripremljeni kalibrant je izmiješan i prebačen u vijale za nano-LC. Za kalibrante je kao i za uzorke bila provedena analiza koja je uključivala korištenje nanotekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom. Parametri koji su korišteni za provedbu separacije kalibranta navedeni su u tablici 5, a rezultat je prikazan u obliku kromatograma (slika 5).

Tablica 4. Peptidi poznatih *m/z* vrijednosti korišteni za kalibraciju MS sustava

Peptidi	<i>m/z</i> vrijednosti prekursora (Da)	CE za MS/MS	DP za MS/MS
AETSELHTSLK	408,55010	40	80
GAYVEVTAK	473,26020	40	80
IGNEQGVSR	485,25302	40	80
LVGTPAEER	491,26559	40	80
LDSTSIPVAK	519,79969	40	80
AGLIVAEGVTK	533,32333	40	80
LGLDFDSFR	540,27342	40	80
GFTAYYIPR	549,28633	40	80
SGGLLWQLVR	569,83398	40	80
AVGANPEQLTR	583,31360	40	80
SAEGLDASASLR	593,80053	40	80
VFTPLEVDVAK	613,34955	40	80
VGNEIQYVALR	636,35273	40	80
YIELAPGVDNSK	657,34499	40	80
DGTFVAVDGPGVIAK	677,85827	40	80
YDSINNTEVSGIR	739,36148	40	80
SPYVITGPGVVEYK	758,91050	40	80
ALENDIGVPSDATVK	768,90340	40	80
AVYFYAPQIPLYANK	883,47380	40	80
TVESLFPPEEAETPGSAVR	964, 97741	40	80

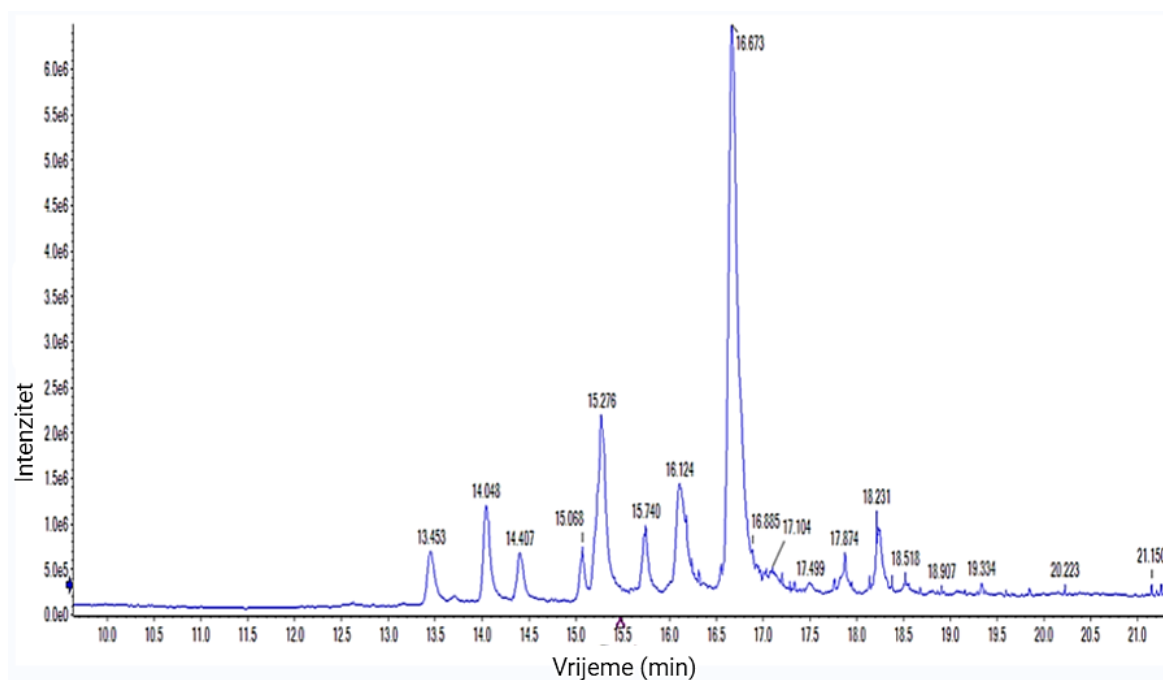
*CE (engl. *Collision Energy*) - energija koja se prenosi tijekom sudara između čestica inertnog plina i iona analita, DP (engl. *Declustering Potential*) - električni potencijal koji se koristi za razdvajanje ioni izvan njihovih aglomeracija ili klastera tijekom prolaska kroz maseni spektrometar.

Tablica 5. Parametri korišteni za separaciju kalibranata

Mobilna faza A	Otopina voda/ACN/FA (98/2/0,1) [v/v/v]
Mobilna faza B	Otopina ACN/voda/FA (98/2/0,1) [v/v/v]
Protok	0,3 µL/min
	Gradijentno
Kolona	Acclaim PepMap RSLC, 75 µm x 15 cm
Temperatura kolone	40 °C
Volumen injektiranja	1 µL

Tablica 5. Parametri korišteni za separaciju peptida kalibrana – nastavak

Temperatura autosemplera	10 °C		
Elucija peptida s kolone	Retencijsko vrijeme (min)	Mobilna faza B (%)	Mobilna faza A (%)
	0	5	95
	5	5	95
	16	40	60
	20	80	20
	25	80	20
	30	5	95
Detektor	TripleTOF 6600+ System		



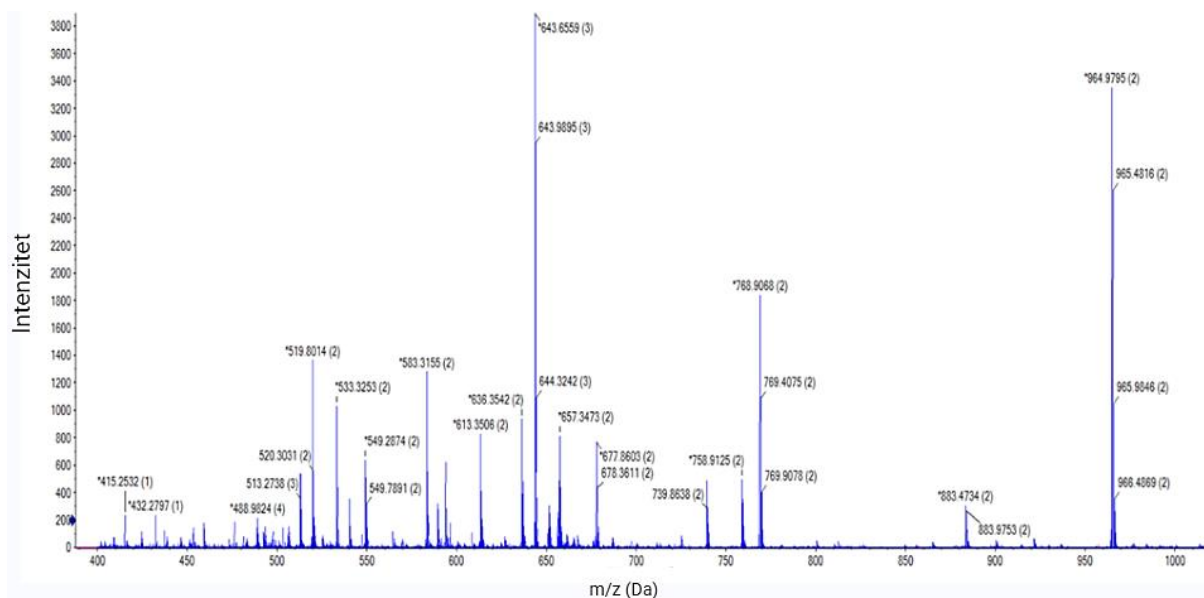
Slika 5. Totalni ionski kromatogram dobiven nakon provedene separacije peptida korištenih za kalibraciju

Parametri po kojima se provodila analiza peptida kalibrana u masenom spektrometru prikazani su u tablicama 7 i 9. Od svih 20 peptida odabran je peptid SPYVITGPGVVEYK koji je korišten za kalibraciju MS/MS spektara, odnosno peptid čiji su fragmentni ioni korišteni za kalibraciju (tablica 6). Pik peptida SPYVITGPGVVEYK na kromatogramu ima retencijsko vrijeme 16,673 min. Reprezentativni spektri peptida kalibrana koji se dobiju nakon snimanja

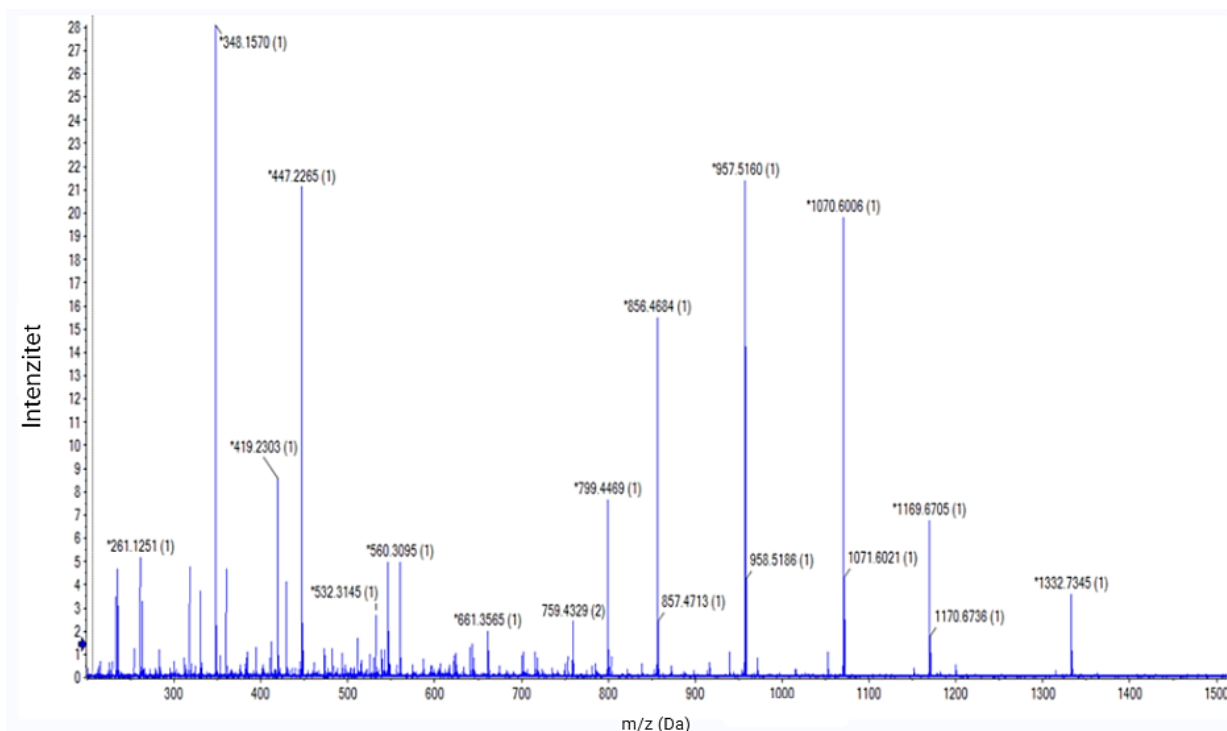
MS odnosno MS/MS prikazani su na slikama 6 i 7. Kalibracija spektrometra masa omogućava pouzdana i točna mjerenja m/z vrijednosti koje se kasnije koriste za pretragu baza podataka.

Tablica 6. Fragmentni ioni peptida korištenog za kalibraciju MS/MS sustava

Peptid	Fragmentni ioni	m/z (Da)
SPYVITGPGVVEYK	b2	185,09207
	b3	348,15540
	b4	560,30788
	b5	661,35555
	N/A	758,91050
	y7	799,44398
	y8	856,46544
	y9	957,51312
	y10	1070,59719
	y11	1169,66560
	y12	1332,72893



Slika 6. Reprezentativni MS spektar peptida korištenih za kalibraciju spektrometra masa



Slika 7. Reprezentativni MS/MS spektar fragmentnih iona peptida SPYVITGPGVVEYK korištenih za kalibraciju spektrometra masa

3.2.6. Analiza peptida spektrometrom masa TripleTOF 6600+ System

U svrhu identifikacije peptida korištena je podatkovno ovisna analiza. Analiza je provedena korištenjem spektrometara masa TripleTOF 6600+ System opremljenim s elektrosprej ionizacijskim izvorom (ESI OptiFlow Turbo V ionizacijski izvor, Sciex, SAD). U tablici 7 su navedeni parametri za provođenje metode koji su podešeni pomoću softvera Analyst TF 1.8.1, Sciex. Analiza je uključivala kratko skeniranje u MS načinu rada te odabir 50 najintenzivnijih peptida koji su fragmentirani u kolizijskoj ćeliji kako bi se generirali fragmentni ioni, tj. dobili MS/MS spektri.

Tablica 7. Parametri korišteni za mjerenje MS i MS/MS spektara nakon provedene nano-LC separacije

Tip analize	MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Vrsta ionskog izvora	ESI OptiFlow Turbo V
Raspon masa	400-1400 Da
Tolerancije mase pri kalibraciji	100 ppm
Vrsta fragmentacije	CID
Vrijeme akumulacije	250 ms

Tablica 7. Parametri korišteni za mjerenje MS spektara nakon provedene nano-LC separacije – *nastavak*

Napon raspršivanja iona	1800 V
Raspršivač plina 1 (GS1)	25 psi
Raspršivač plina 2 (GS2)	0 psi
Plinska zavjesa (CUR)	30 psi
Temperatura izvora (TEM)	150 °C
Energija sudara (CES)	5 eV
Broj iona za fragmentaciju	50

*CID (engl. *Collision-Induced Dissociation*) disocijacija uzrokovana sudarom je metoda za fragmentaciju u kojoj se ioni analita sudaraju s molekulama inertnog plina (u ovom slučaju dušika) pri čemu dolazi do fragmentacije iona analita.

3.2.7. Izrada baze podataka i pretraživanje

Za izradu baze podataka korišten je ProteinPilot softver. Proteinske sekvence *Bos taurus* preuzete su iz UniProt baze podataka (pristupljeno 5. lipnja 2024.) u FASTA formatu. Pretraga baze podataka uključivala je i kreiranje baze podataka mamaca (engl. *Decoy*) Baza podataka mamaca sadrži sekvence peptida u reverznom obliku. Baza mamaca sadržava isti broj sekvenci kao i izvorna baza, ali svaka sekvencija je zapisana u reverznom obliku. Korist od generiranja reverznih sekvenci leži u tome što omogućuje procjenu lažno pozitivnih rezultata prilikom identifikacije peptida. Reverzne sekvence služe kao kontrola jer se ovisno o broju detektiranih obrnutih sekvenci izračuna koliko je udio takvih sekvenci što je u konačnici mjera točnosti. Na taj način provedena je neovisna analiza stope lažnog otkrivanja FDR (engl. *False Discovery Rate*) kako bi se procijenila kvaliteta identifikacija.

3.2.8. Identifikacija peptida

Podaci koji su dobiveni snimanjem spektara MS i MS/MS, a koji obuhvaćaju intenzitet i m/z vrijednosti korišteni su za identifikaciju peptida pomoću ProteinPilot softvera. Parametri za pretraživanje baze podataka navedeni su u tablici 8. Nakon identifikacije peptida, dobivene sekvence peptida korištene su za pretraživanje baze podataka koja sadrži sekvence peptida s bioaktivnim svojstvima (engl. *Milk Bioactive Peptide Database*) kako bi se utvrdilo postoji li u znanstvenoj literaturi već utvrđeno i opisano bioaktivno svojstvo za peptide koji su identificirani u uzorcima.

Svi identificirani peptidi korišteni su za generiranje spektralne knjižnice koja je kasnije korištena za analizu podataka SWATH-DIA.

Tablica 8. Parametri za pretragu baze podataka

Baza podataka	UniProt
Taksonomija	<i>Bos taurus</i>
Enzim	Nespecifično cijepanje
Varijabilne modifikacije	Oksidacija metionina, deaminacija asparagina i glutamina
FDR	1 %

3.2.9. Prikupljanje i relativna kvantifikacija neovisna o podacima

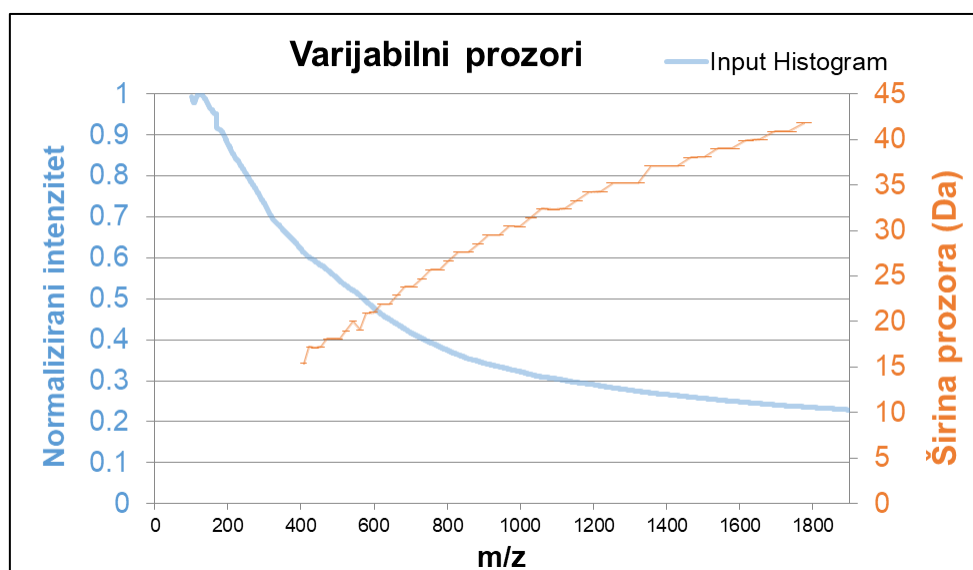
SWATH-DIA (engl. *Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra-Dana Independent Acquisition*) analiza korištena je za kvantifikaciju peptida, a provedena je prema parametrima u tablici 9. Pri tome je za izračun broja varijabilnih prozora korišten program SWATH Variable Window Calculator V1.2.

Tablica 9. Parametri za snimanje MS/MS spektara

Tip analize	MS/MS pozitiv
Detekcija iona	Pozitivna
Vrsta ionskog izvora	ESI OptiFlow Turbo V
Raspon masa	400-1800 Da
Tolerancije mase pri kalibraciji	100 ppm
Vrsta fragmentacije	CID
Vrijeme akumulacije	50 ms
Napon raspršivanja iona	1800 V
Raspršivač plina 1 (GS1)	25 psi
Raspršivač plina 2 (GS2)	0 psi
Plinska zavjesa (CUR)	30 psi
Temperatura izvora (TEM)	150 °C
Energija sudara (CES)	5 eV
Broj varijabilni prozori	50

Broj varijabilnih prozora koji je odabran za provođenje ovog eksperimenta je 50. Na slici 8 vidljivo je kako širina samih prozora ovisi o m/z vrijednostima i broju detektiranih peptida (intenzitet). Pri niskim m/z vrijednostima detektirano je više peptida, stoga su pri nižim m/z vrijednostima varijabilni prozori uži dok su varijabilni prozori pri višim m/z vrijednostima širi zbog

toga što je detektirano manje peptida. Pri završetku eksperimenta generirana knjižnica iona korištena je za obradu podataka SWATH-DIA u softveru PeakView. Za svaki identificirani peptid izvezeni su podaci koji su korišteni za daljnju statističku obradu podataka.



Slika 8. Referentni prikaz varijabilnih prozora za provođenje SWATH-DIA analize

3.2.10. Obrada podataka

Za interpretaciju, kvantitativnu analizu i vizualizaciju podataka korištena je web platforma MetaboAnalyst verzija 6.0. Statistička značajnost između skupina procijenjena je korištenjem neuparenog t-testa i *Volcano plot*-a na razini $p < 0,05$ te FC (engl. *Fold change*) vrijednosti 1,5. Ostali parametri koji su odabrani prikazani su u tablici 10.

Tablica 10. Parametri korišteni za platformu MetaboAnalyst verzije 6.0

Modul	Statistička analiza (jedan faktor)
Filter pouzdanosti	RSDs >25 %
Filter odstupanja	Interkvantilni raspon (IQR), 5 %
Skaliranje podataka	Skaliranje raspona (srednja vrijednost centrirana i podijeljena rasponom svake varijable)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada je bilo provesti identifikaciju i kvantifikaciju bioaktivnih peptida koji su prisutni u nusproizvodima mliječne industrije odnosno u slatkoj i kiseloj sirutci te u permeatu koji se dobiva ultrafiltracijom mlijeka. U sljedećim potpoglavljima prikazani su rezultati svih provedenih mjerenja i analiza. Kako bi se identificirali bioaktivni peptidi prisutni u uzorcima, korištena je spregnuta metoda nano LC-MS/MS. Identificirani bioaktivni peptidi potom su kvantificirani primjenom podatkovno neovisne SWATH-DIA analize. Statistička analiza provedena je pomoću web platforme MetaboAnalyst verzija 6.0. Dobiveni rezultati su prikazani u obliku popisa detektiranih bioaktivnih peptida s njihovim potvrđenim bioaktivnim svojstvima.

4.1. IDENTIFICIRANI PEPTIDI POMOĆU NECILJANE ANALIZE PEPTIDA

Nakon što je uspješno provedena separacija peptida iz uzoraka pomoću nano-LC metode analiza izdvojenih peptida provedena je pomoću masene spektrometrije. Za masenu spektrometriju korišten je uređaj TripleTOF 6600+ System. Dobiveni podaci iz snimljenih spektara MS i MS/MS (koji obuhvaćaju intenzitete i m/z vrijednosti) grupirani su referentnu knjižnicu podataka pomoću ProteinPilot softvera. Za identifikaciju peptida korištena je UniProt baza podataka (*Bos taurus*), a kvaliteta identifikacije ocijenjena je primjenom stope lažnog otkrivanja (engl. *false FDR*) od 1 %. Dobiveni podaci analizirani su softverom ProteinPilot i korišteni za pretraživanje bioaktivnih peptida.

Kao rezultat provedene neciljane i podatkovno neovisne analize peptida iz uzoraka identificiran je veliki broj peptida, ukupno njih 103. Svaki identificirani peptid prikazan je u tablici 11 gdje je vidljiva prisutnost određenog peptida u svakom od ispitivanih uzoraka. Kako je prema rezultatima vidljivo, identificirani peptidi su dobiveni nespecifičnim cijepanjem na različitim mjestima unutar proteina koji su zastupljeni u mlijeku, a to su: β -kazeina, κ -kazeina, GLYCAM1 (engl. *Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1*), α -s1-kazein, α -s2-kazein, PIRG (engl. *Polymeric immunoglobulin recepto*), osteopontin-k, β -2-mikroglobulin. Ovako identificirani peptidi u uzorcima su pretraženi pomoću baze podataka MBPDB kako bi se dobili podaci koji od njih već imaju u znanstvenoj literaturi dokazana i opisana bioaktivna svojstva. Peptidi za koje se pomoću navedene baze podataka utvrdilo postojanje određenih bioaktivnih svojstava su prikazani u tablicama 12 – 15.

Tablica 11. Svi identificirani peptidi prisutni u analiziranim uzorcima

Protein	Sekvenca peptida	Prekursor <i>m/z</i>	Prisutnost u uzorcima
β-kazein	QEPVLGPVRGPF	696,8853149	u svim uzorcima
	QEPVLGPVRGP	574,8247681	u svim uzorcima
	DKIHPFAQTQ	592,8065796	u svim uzorcima
	SLSQSKVLPVPQ	641,8718872	u svim uzorcima
	SQSKVLPVPQ	541,8138428	u svim uzorcima
	TQTPVVPPFLQPE	776,4244995	u svim uzorcima
	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,5036011	u svim uzorcima
	LVYPPGPIPN	607,3344116	u svim uzorcima
	DELQDKIHPF	414,5435486	nije zabilježen u uzorku P2
	SLVYPPGPIPN	650,8504639	u svim uzorcima
	YQEPVLGPVRGPF	778,4169922	u svim uzorcima
	VLGPVRGPF	519,8083496	u svim uzorcima
	RDMPIQAF	489,2472839	u svim uzorcima
	KVLPVPQKAVPYPQ	521,9801025	u svim uzorcima
	TQTPVVPPFLQP	711,9031982	nije zabilježen u uzorku P2
	EPVLGPVRGPF	632,8560791	u svim uzorcima
	VYPPGPIPN	550,7924194	u svim uzorcima
	VLPVPQKAVPYPQ	718,4190063	u svim uzorcima
	GPVRGPFPIIV	576,3504028	u svim uzorcima
	VPYQRDMP	551,7711182	u svim uzorcima
	QEPVLGPVRGPF	688,3720703	u svim uzorcima
	KAVPYPQRDMP	434,5605469	u svim uzorcima
	MPFPKYPVEPF	676,3413696	nije zabilježen u uzorku SS2

Tablica 11. Svi identificirani peptidi prisutni u analiziranim uzorcima – *nastavak*

β-kazein	QEPVLGPVRGPFPI	753,4273682	u svim uzorcima
	DELQDKIHPPFAQTQS	586,288208	u svim uzorcima
	VLGPVRGPFPIIV	682,4266357	u svim uzorcima
	SQSKVLPVPQKAVPYPQ	622,6876221	u svim uzorcima
	MPFPKYPVEP	602,8071899	u svim uzorcima
	LPQNIPPLTQTPV	709,4061279	u svim uzorcima
	RELEELNVPGEIVE	813,4226685	u svim uzorcima
	EDELQDKIHPPF	457,5577393	u svim uzorcima
	DKIHPPFAQTQSL	462,2454834	u svim uzorcima
	YQEPVLGPVR	579,3193359	u svim uzorcima
	κ-kazein	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTE	853,4394531
MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPT		699,3718262	u svim uzorcima
TIASGEPTSTPTTE		696,3304443	u svim uzorcima
MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTE		853,6854248	u svim uzorcima
VIESPPEINTVQ		663,3510132	u svim uzorcima
VIESPPEINT		549,7874756	u svim uzorcima
MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTE		857,4381714	u svim uzorcima
EIPTINTIASGEPT		721,8723145	u svim uzorcima
YQQKPVALINN		644,3564453	u svim uzorcima
IESPPEINTVQ		613,8167725	u svim uzorcima
EIPTINTIASGEPTSTPTTE		687,0074463	u svim uzorcima
IESPPEINTV		549,7874756	u svim uzorcima
SPPEINTVQ		492,753479	u svim uzorcima
YAKPAAVRSPAQ		420,2349243	nije zabilježen u uzorku SS2

Tablica 11. Svi identificirani peptidi prisutni u analiziranim uzorcima – *nastavak*

k-kazein	QEQNQEQPIRCE	742,8253784	u svim uzorcima	
	KTEIPTINTIASGEPT	836,4436035	u svim uzorcima	
	SPEVIESPPEIN	655,8273315	u svim uzorcima	
	MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTE	853,1934204	u svim uzorcima	
GLYCAM1	ILNKPEDETHLEAQPT	612,3109131	u svim uzorcima	
	SQNPKLPLSIL	605,3637085	u svim uzorcima	
	AQPTDASAQF	518,2407227	u svim uzorcima	
	DASAQFIRN	511,2567139	u svim uzorcima	
	LNKPEDETHLE	442,2174988	u svim uzorcima	
	AQPTDASAQFIRN	709,8547974	u svim uzorcima	
	EDLSKEPSISRE	463,9000549	u svim uzorcima	
	ILNKPEDETHLEAQPTDASAQ	769,7081299	u svim uzorcima	
	SHAFEVVKT	509,2718201	u svim uzorcima	
	ILNKPEDETHLEAQPTDASAQF	818,730957	u svim uzorcima	
	ILNKPEDETHLEAQP	578,6283569	u svim uzorcima	
	SSRQPQSQNPKLPLSIL	631,6899414	u svim uzorcima	
	NKPEDETHLE	606,2805786	u svim uzorcima	
	DASAQFIRNL	567,7987671	nije zabilježen u uzorku SS4	
	SRQPQSQNPKLPLSIL	602,6792603	u svim uzorcima	
	QIVIRSSRQPQ	437,9212341	nije zabilježen u uzorku SS3	
	SQNPKLPL	448,7636414	u svim uzorcima	
	LFSHAFEVVKT	426,5678101	u svim uzorcima	
	α-s1-kazein	APFPEVFGK	496,2660217	u svim uzorcima
		VAPFPEVFGK	545,8002319	u svim uzorcima

Tablica 11. Svi identificirani peptidi prisutni u analiziranim uzorcima – *nastavak*

α-s1-kazein	VAPFPEVFGKEK	449,9151001	u svim uzorcima
	APFPEVFGKEK	416,8922729	u svim uzorcima
	FVAPFPEVFGKEK	498,9378967	u svim uzorcima
	EVLNENLLR	550,30896	u svim uzorcima
	FSDIPNPIGSENSEKTTMP	688,6578369	u svim uzorcima
	SDIPNPIGSENSEKTTMP	639,6350708	u svim uzorcima
	HQGLPQEV	510,7772827	u svim uzorcima
	APFPEVFGKEKV	449,9151001	u svim uzorcima
	QKEPMIGVNQEL	693,3582764	u svim uzorcima
	DVPSERYL	489,7481689	u svim uzorcima
	VAPFPEVFGKEKV	482,9378967	u svim uzorcima
	LPQEVLENL	584,8140259	u svim uzorcima
	LPQEVLENL	584,8140259	u svim uzorcima
	α-s2-kazein	NAVITPTLNREQL	783,4359131
FLKKISQRYQ		437,5908203	u svim uzorcima
NAVITPTLNRE		662,864624	u svim uzorcima
VKITVDDKHYQ		449,2418518	nije zabilježen u uzorku P4
IVLNPWDQVKRN		494,6123047	u svim uzorcima
TKLTEEEKNRLN		492,2668457	u svim uzorcima
AVITPTLNREQL		726,4144897	u svim uzorcima
EVKITVDDKHYQ		492,256073	u svim uzorcima
PWDQVKRNAVITPT		574,649292	u svim uzorcima
PIGR (engl. <i>Polymeric immunoglobulin recepto</i>)		SVKDAAGGPGAPADPGRPTGYSGS	724,6820679
	SVKDAAGGPGAPADPGRPTGY	647,6535645	u svim uzorcima

Tablica 11. Svi identificirani peptidi prisutni u analiziranim uzorcima- *nastavak*

PIGR	VKDAAGGPGAPADPGRPTGYSGS	695,6713867	u svim uzorcima
	SVKDAAGGPGAPADPGRPT	574,2919312	nije zabilježen u uzorku P4
	VKDAAGGPGAPADPGRPTGY	618,6428833	nije zabilježen u uzorku P4
	AGEIQNKALLDPSF	751,8961182	u svim uzorcima
Osteopontin-k	TWLKPDPSQKQTF	525,9437256	u svim uzorcima
	WLKPDPSQKQTF	492,2611389	u svim uzorcima
	TWLKPDPSQKQT	476,9208984	u svim uzorcima
β-2-mikroglobulin	IQRPPKIQVY	414,5836792	nije zabilježen u uzorku P2

U konačnici je kao rezultat analize identificiran veliki broj peptidnih sekvenci te su dobivene informacije o proteinima iz kojih potječu identificirane sekvence. Na temelju tablice 11, pokazuje se da većina identificiranih peptida potječe iz mliječnih proteina koji potječu iz kazeinskih frakcija (β -kazeina, κ -kazeina, α -s1-kazein, α -s2-kazein), a prisutni su u gotovo svim uzorcima. To sugerira da su ti proteini stabilni i dobro očuvani u svim analiziranim uzorcima. Najveći dio identificiranih peptida (njih 33) potječe iz β -kazeina i većina njih prisutni su u svim ispitivanim uzorcima. Peptidi koji se među njima ističu su DELQDKIHPF, TQTPVVPPFLQP i MPFPKYPVEPF. Ističu se jer pokazuju odsutnost u pojedinim ispitivanim uzorcima pa tako DELQDKIHPF i TQTPVVPPFLQP nisu zabilježeni u uzorku P2, a MPFPKYPVEPF nije zabilježen u SS2 uzorku. Mogući razlog zbog kojeg su ovi peptidi odsutni u tim uzorcima je zbog male varijacije u homogenosti mlijeka što može dovesti do toga da neki peptidi budu prisutni u manjoj količini ili potpuno izostanu u određenim uzorcima, dok su prisutni u drugima.

Osim peptida koji potječu iz tipičnih mliječnih proteina identificirani su i peptidi koji potječu iz proteina GLYCAM1, PIGR, Osteopontin-k, i β -2-mikroglobulin koji nisu među najzastupljenijim mliječni proteini, ali njihova prisutnost je zabilježena u gotovo svim uzorcima.

Usporedbom s bazom podataka i dostupnom znanstvenom literaturom potvrđeno je da za 10 od 103 identificirana peptida postoji podatak o njihovim bioaktivnim svojstvima. Većina bioaktivnih peptida ima jedno bioaktivno svojstvo dok se peptidi VYFPFGPIPN i YQEPVLGPVR ističu s dva odnosno čak četiri bioaktivna svojstva.

4.1.1. Peptidi s antioksidativnim svojstvom

Ravnoteža između oksidacije i antioksidacije smatra se ključnom za održavanje zdravih bioloških sustava. Jednom kada nastanu reaktivne kisikove vrste, one utječu na lipide, DNA i proteine, te dolazi do poremećaja stanične homeostaze i mogućnosti nastanka teških bolesti poput raka i ateroskleroze. U fiziološkim uvjetima, ljudski antioksidativni obrambeni sustav, koji uključuje enzime kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), glutation (GSH) i druge, omogućuje uklanjanje viška reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), uključujući, između ostalih, superoksidne anione, hidroksilne radikale, alkoksilne radikale i peroksilne radikale. Međutim, naši endogeni antioksidativni obrambeni sustavi nisu potpuni bez egzogenih reduciranih spojeva koji igraju ključnu ulogu u mnogim antioksidativnim mehanizmima u živim organizmima. Stoga postoji stalna potreba za egzogenim antioksidansima kako bi se spriječio oksidativni stres, koji predstavlja poremećaj ravnoteže redoks stanja u korist oksidacije (Bouayed i Bohn, 2010). Potrošnja hrane bogate antioksidansima sprječava oksidacijsko oštećenje u našem tijelu, zahvaljujući neutralizaciji i smanjenom oslobađanju slobodnih radikala. Kako sintetski antioksidansi (poput propil galata i tert-butilhidrokinona) imaju potencijalni toksični učinak na ljude antioksidativni peptidi podrijetlom iz mlijeka i mliječnih proizvoda sve su više ispitivani. Ovi peptidi se sastoje od 5 do 11 hidrofobnih aminokiselina, uključujući prolin, histidin, tirozin ili triptofan. Antioksidativni peptidi mogu biti podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke, a svoj antioksidativni učinak iskazuju uklanjanjem slobodnih radikala ili sprječavanjem njihovog nastanka te inhibicijom enzimatske i neenzimatske peroksidacije lipida (Mohanty i sur., 2016).

U ovom eksperimentalnom radu iz uzoraka sirutki i permeata detektirano je ukupno 4 bioaktivna peptida koja iskazuju antioksidativno svojstvo i svi su dobiveni iz β -kazeina (tablica 12). Farvin i sur. (2010) su za peptid TQTPVVPPFLQPE zabilježili da doprinosi antioksidativnoj ravnoteži tako što neutralizira slobodne radikale. Osim antioksidativne aktivnosti, ovaj peptid ima potencijalnu antimikrobnu aktivnost, ali studije koje bi to dokazale su još uvijek u tijeku. Za peptid VYPFPGPIP su Eisele i sur. (2013) potvrdili njegovo jako antioksidativno djelovanje u *in vitro* uvjetima, međutim kako bi se potvrdio stvaran učinak na ljude ističu da je potrebno provesti dodatna istraživanja u *in vivo* uvjetima na humanom modelu. Tonolo i sur. (2020) ispitivali su interakciju peptida među kojima je SQSKVLPVPQKAVPYPQ (koji je identificiran i u uzorcima ovog rada) s putem Keap1/Nrf2 koji predstavlja glavni molekularni put uključen u zaštitu stanica od stanja oksidativnog stresa. Istraživanja su provedena u *in vitro* uvjetima te na staničnoj liniji Caco-2 stanica (besmrtna stanična linija stanica ljudskog kolorektalnog adenokarcinoma) gdje se ovaj peptid pokazao kao jedan od najaktivnijih peptida u inhibiciji proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta. Iz tablice je zanimljivo

istaknuti kako je samo peptid SQSKVLPVPQKAVPYPQ bio podjednako zastupljen u svim ispitivanim uzorcima dok su ostali peptidi značajnije zastupljeni u samo jednom od 3 uzorka.

Tablica 12. Detektirani bioaktivni peptidi za koje su u znanstvenoj literaturi utvrđeno i opisana njihovo antioksidativno svojstvo

Sekvenca peptida	Protein	Interval aminokiselina	Značajna prisutnost u uzorku pri p<0.05	Reference
TQTPVVVPPFLQPE	β-kazein	93 – 106	Permeat	Farvin i sur. (2010)
VYFPFGPIPN	β-kazein	74 – 83	Kisela sirutka	Eisele i sur. (2013) Tonolo i sur. (2020)
SQSKVLPVPQKAVPYPQ	β-kazein	181 – 197	Jednako zastupljen u svim uzorcima	Tonolo i sur. (2020)
YQEPVLPVVR	β-kazein	208 – 217	Slatka sirutka	Kandukuri i sur. (2019)

4.1.2. Peptidi s antitrombotičkim svojstvom

Tromboza predstavlja medicinsko stanje koje se događa kada se krvni ugrušak odnosno tromb formira u krvnoj žili i ometa normalan protok krvi. Tromboza može nastati u venama (venska tromboza) ili arterijama (arterijska tromboza), a može biti opasna jer ugrušak može putovati kroz krvotok i uzrokovati ozbiljne komplikacije, poput moždanog udara, srčanog udara ili plućne embolije. Nastanak ugruška događa se zbog povećane aktivnosti trombocita te zbog njihovog nakupljanja ili neispravne fibrinolize u arterijama ili venama. Trombin je ključan enzim koji potiče agregaciju trombocita tako što pretvara fibrinogen u fibrinski ugrušak. Stoga antitrombotici djeluju tako da inhibiraju vezanje fibrinogena na specifično receptorsko područje na površini trombocita čime inhibiraju samu agregaciju trombocita. Ovi peptidi, uz antihipertenzivne peptide, koji su dobiveni iz mliječnih proteina imaju važnu primjenu u liječenju i prevenciji kardiovaskularnih oboljenja zbog toga što ne pokazuju toksičan učinak (Yang i sur., 2007). Jedini antitrombotički peptid koji je identificiran u uzorcima ovog rada je YQEPVLPVVR

i njegova najznačajnija prisutnost zabilježena je u uzorcima slatke sirutke (tablica 13). Liu i sur. (2019) otkrili su da ovaj peptid ima snažnu antitrombotičku aktivnost. Peptid nije djelovao na aktivno mjesto trombina kako bi inhibirao njegovu aktivnost, već je inhibirao aktivnost trombina vezivanjem za eksosit-1 (specifično vezno mjesto trombina) i tako sprječava vezanje trombina na fibrinogen. Ovi rezultati sugeriraju da bi se YQEPVLGPVR mogao koristiti kao antitrombotski sastojak u industriji funkcionalne hrane.

Tablica 13. Detektirani bioaktivni peptid za koji je u znanstvenoj literaturi utvrđeno i opisano antitrombotičko svojstvo

Sekvenca peptida	Protein	Interval aminokiselina	Značajna prisutnost u uzorku pri $p < 0.05$	Reference
YQEPVLGPVR	β -kazein	208 – 217	Slatka sirutka	Liu i sur. (2019)

4.1.3. Peptidi koji su ACE-inhibitori

Hipertenzija predstavlja značajnu i rasprostranjenu prijetnju zdravlju ljudi širom svijeta. Iako su lijekovi poput kaptoprila pokazali učinkovitost u regulaciji povišenog krvnog tlaka, njihova primjena može uzrokovati nepoželjne nuspojave, uključujući vrtoglavice, suhi kašalj i angioedem. Zbog toga se sve više ispituju i istražuju alternativni i prirodni načini za regulaciju krvnog tlaka. Inhibitori angiotenzin I-konvertirajućeg enzima (ACE) dobiveni iz prirodnih tvari, poput mliječnih proteina, imaju potencijal da budu sigurniji i učinkoviti u liječenju hipertenzije i takvi inhibitori mogu postati vrijedna dopuna lijekovima poput kaptoprila.

ACE je nespecifičan, ali visoko selektivan ključni multifunkcionalni ektoenzim, uključen u regulaciju perifernog krvnog tlaka. Dobro je poznat po svom dvostrukom djelovanju tako što pretvara neaktivni angiotenzin I u aktivni angiotenzin II te razgrađuje aktivni bradikinin, koji također ima važnu ulogu u kontroli krvnog tlaka (Wong, 2021). Budući da je ACE peptidildipeptid hidrolaza on uklanja dipeptide s C-terminalnog kraja angiotenzina I čime ga pretvara u aktivni angiotenzin II koji je snažan vazokonstriktor, dok će inaktivirati bradikinin cijepanjem dipeptida na C-terminalni kraju bradikinina (jaki vazodilatator). Na taj način djeluje na povećanje krvnog tlaka (Lu i sur., 2016). ACE inhibitorni peptidi značajno mogu utjecati na snižavanje krvnog tlaka jer djeluju na način da sprječavaju pretvorbu angiotenzina I u angiotenzin II te sprječavaju razgradnju bradikinina. Mehanizam same interakcije između ACE inhibitornih peptida i enzima ACE nije do kraja razjašnjen iako postoje određene studije koje naglašavaju da bi to mogla biti interakcija između C-terminalnog kraja enzima i C-terminalnog kraja inhibitornih peptida. Razlog zbog kojeg se pretpostavlja da je upravo ovo način na koji dolazi do interakcije je da C-

terminalni kraj enzima pokazuje afinitet prema hidrofobnim aminokiselinskim ostacima na tri položaja unutar C-terminalnog djela ACE-inhibitornog peptida.

Brojne studije pokazuju da se ACE-inhibitorni peptidi mogu proizvesti tijekom proizvodnje raznih mliječnih proizvoda poput sira. Od velikog broja tako dobiveni ACE inhibitornih peptida s potencijalnim i dokazanim bioaktivnim učincima samo manji dio njih iskazuje svoju djelotvornost u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Stoga se ta činjenica treba uzeti u obzir prilikom njihove primjene u terapijske svrhe. FitzGerald i sur. (2004) su u svom radu i dokazali ovu činjenicu. Kako bi postigli hipotenzivni učinak *in vivo*, peptidi moraju dospjeti do ciljnog organa. Budući se ovi peptidi najčešće unose oralno putem mliječnih proizvoda oni moraju imati gastrointestinalnu stabilnost ili drugim riječima rečeno moraju biti otporni na djelovanje gastrointestinalnih peptidaza, osim toga kada se apsorbiraju iz crijeva u krvotok i tamo moraju biti otporni na djelovanje određenih peptidaza. Peptidi VAP i WLAHK koji su u *in vitro* uvjetima pokazali jako ACE inhibitorno djelovanje u *in vivo* uvjetima su pokazali da nemaju takvo djelovanje jer je u gastrointestinalnom traktu došlo do razgradnje u neaktivne fragmente.

U ispitivanim uzorcima slatke sirutke, kisele sirutke i permeata zabilježeno je osam bioaktivnog peptida s ACE inhibitornim djelovanjem. Peptidi SQSKVLPVPQ, QEPVLGPVRGPFPIIV, VLGPVRGPF, RDMPIQAF, EPVLGPVRGPF, VYPFGPIPN, MPFPKYPVEP i YQEPVLGPVR prikazani su u tablici 14 gdje je vidljivo da su svi izvedeni iz β -kazeina.

Hayes i sur. (2007) prvi su identificirali i okarakterizirali svojstvo peptida SQSKVLPVPQ. Potvrdili su da može posjedovati antioksidativno djelovanje budući da dijeli šest C-terminalnih aminokiselina s antioksidativnim peptidom VLPVPQK, ali je pokazao i antihipertenzivno djelovanje *in vivo*. ACE inhibitorno djelovanje za ovaj peptid potječe od sekvence KVLVPVPQ koja odgovara β -kazeinu f(169-175). Kako je za peptid KVLVPVPQ navedeno da ima IC_{50} (koncentracija inhibitora pri kojoj se postiže 50 % učinkovitosti) vrijednost koja iznosi 39 μ M, a za SQSKVLPVPQ ona iznosi 92 μ M pokazuje da s povećanjem duljine lanca snaga ACE inhibitora se smanjuje. QEPVLGPVRGPFPIIV je jedan od peptida koji se može pronaći u krvnoj plazmi ljudi čija je prehrana obogaćena konzumacijom različitih sireva i jogurta. Ovaj peptid, iako mu se pripisuje antihipertenzivno djelovanje, zbog izrazito visoke vrijednosti IC_{50} od 600 μ mol/L jedan je od slabijih ACE inhibitora (Tagliazucchi i sur., 2019). Bez obzira što je slab ACE inhibitor, zastupljen je u svim ispitivanim uzorcima ovog rada. Zanimljivo se pokazalo kako peptid YQEPVLGPVRGPFPIIV koji se od QEPVLGPVRGPFPIIV razlikuje u samo jednoj aminokiselini na N-terminalnom kraju ne pokazuje ACE inhibiciju, ali je imao snažan antioksidativni kapacitet. Iz ovoga je vidljivo da samo jedna aminokiselina može utjecati na svojstvo peptida. VLGPVRGPF i RDMPIQAF također predstavljaju slabe ACE inhibitorni peptid koji može učinkovito smanjiti visoki krvni tlak, ali se moraju koristiti visoke doze

(10 mg/kg) zbog IC_{50} vrijednosti koja je veća od 130 μM (Miguel i sur., 2006). Hayes i sur. (2007) identificirali su EPVLPVVRGPF i MPFPKYPVEP gdje se MPFPKYPVEP ističe kao bolji ACE inhibitor jer njegov IC_{50} iznosi 83 μM dok za EPVLPVVRGPF IC_{50} iznosi 790 μM . Osim što je MPFPKYPVEP pokazao snažnu ACE-inhibitornu aktivnost tijekom *in vitro* testova pokazao je i otpornost na gastrointestinalne probavne enzime.

Tablica 14. Detektirani bioaktivni peptidi za koje je u znanstvenoj literaturi utvrđeno i opisano njihovo ACE inhibitorno svojstvo

Sekvenca peptida	Protein	Interval aminokiselina	Značajna prisutnost u uzorku pri $p < 0.05$	Referenca izvora
SQSKVLPVPQ	β -kazein	118 – 190	Kisela sirutka	Hayes i sur. (2007)
QEPVLPVVRGPFPIIV	β -kazein	209 – 224	Jednako zastupljen u svim uzorcima	Lu i sur. (2016)
VLGPVVRGPF	β -kazein	212 – 221	Kisela sirutka, Slatka sirutka	Quiros i sur. (2007) Miguel i sur. (2006)
RDMPAQAF	β -kazein	198 – 205	Jednako zastupljen u svim uzorcima	Yamamoto i sur. (1994)
EPVLPVVRGPF	β -kazein	210 – 221	Kisela sirutka, Slatka sirutka	Hayes i sur. (2007)
VYFPFGPIPN	β -kazein	74 – 83	Kisela sirutka	Eisele i sur. (2013) Tonolo i sur. (2020)
MPFPKYPVEP	β -kazein	124 – 133	Kisela sirutka, Permeat	Hayes i sur. (2007)
YQEPVLPVVR	β -kazein	208 – 217	Slatka sirutka	Lu i sur. (2016)

4.1.1 Peptidi s imunomodulatornim svojstvom

Imunomodulatorni peptidi predstavljaju važnu skupinu bioaktivnih spojeva s potencijalom za upravljanje bolestima uzrokovanim nepravilnim funkcioniranjem imunološkog sustava. Iako postoje komercijalni lijekovi koji mogu usporiti napredovanje tih bolesti, njihova toksičnost i nuspojave često nadmašuju njihove koristi. U tom kontekstu, bioaktivni peptidi, posebno oni dobiveni iz kazeina i proteina sirutke, pokazuju sposobnost regulacije imunoloških funkcija s niskom toksičnošću i bez tendencije akumulacije u tkivima. Ovi peptidi mogu stimulirati ili inhibirati specifične funkcije imunološkog sustava, ovisno o dozi i eksperimentalnim uvjetima.

Imunomodulatorni peptidi mogu pokazivati različite učinke, poput poticanja ili inhibicije stanične proliferacije, proupalnih ili protuupalnih aktivnosti, te zaštitnog ili toksičnog djelovanja na stanice. Peptidi koji potiču proliferaciju potiču staničnu diobu, dok antiproliferativni peptidi djeluju na sprječavanje rasta tumorskih stanica, zbog čega se nazivaju kancerogenima ili antikancerogenima. Poticanje upalnih procesa ili njihovo smanjenje postižu proupalni i protuupalni peptidi. Citoprotektivni peptidi štite stanice od oštećenja, dok citotoksični peptidi reguliraju proces apoptoze, odnosno programirane smrti stanica.

Povezivanjem na specifične receptore, imunomodulatorni peptidi mogu izazvati ciljani imunološki odgovor, čineći ih važnim predmetom istraživanja, osobito u kontekstu prisutnosti takvih peptida u proteinima iz hrane, gdje se pokazuje njihov potencijal u poboljšanju ljudskog zdravlja. Imunomodulatorni učinak peptida podrijetlom iz kazeina i proteina sirutke istražen je u mnogim *in vivo* i *in vitro* istraživanjima korištenjem animalnih i humanih modela. Ipak, značajno veći dio istraživanja proveden je u *in vitro* uvjetima, dok je dio istraživanja provedenih u *in vivo* uvjetima stavio naglasak na korištenje animalnog modela. Stoga, potencijalni i dokazani učinak mnogih imunomodulatornih peptida na zdravlje čovjeka treba biti dodatno ispitan.

Imunomodulatorni peptid koji je identificiran u analiziranim uzorcima je YQEPVLPVLR (tablica 15). Ovaj peptid koji potječe iz β -kazeina zabilježen je samo u uzorcima slatke sirutke, a osim ovog svojstva ističe se kao bioaktivni peptid s još tri već opisana bioaktivna svojstva (ACE – inhibitorno, antioksidativno, antitrombotičko). Kayser i Meisel (1996) i Kandukuri i sur. (2019) za ovaj peptid su potvrdili da je pokazao protuupalno djelovanje inhibicijom proliferacije stanica slezene miševa, smanjenjem razina upalnih citokina (interferon- γ) te povećanjem razina regulatornih citokina (interleukin-10 i transformirajući faktor rasta- β) u supernatantu kulture stanica slezene. Osim toga poboljšao je fagocitozu peritonealnih makrofaga. Naglašeno je također da pri niskim koncentracijama inhibira proliferaciju limfocita dok su visoke koncentracije stimulirale proliferaciju limfocita.

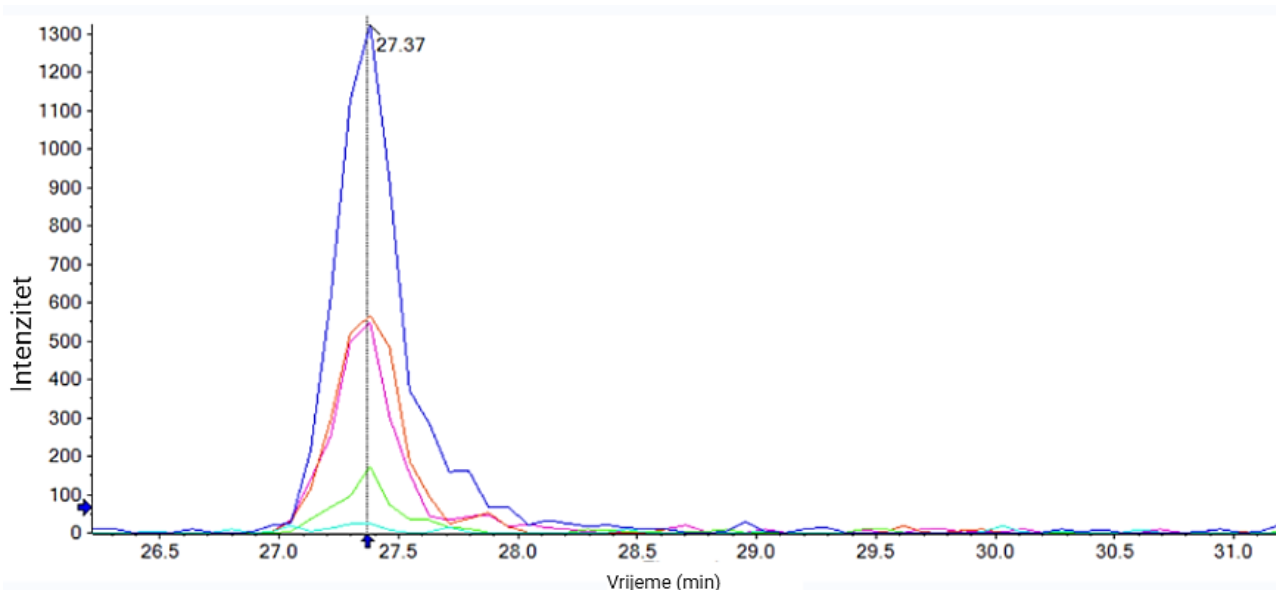
Tablica 15. Detektirani bioaktivni peptid za koga su u znanstvenoj literaturi utvrđeno i opisano njihovo imunomodulatorno svojstvo

Sekvenca peptida	Protein	Interval aminokiselina	Značajna prisutnost u uzorku pri $p < 0.05$	Reference
YQEPVLGPVR	β -kazein	208 – 217	Slatka sirutka	Kayser i Meisel (1996) Kandukuri i sur. (2019)

4.2. KVANTIFIKACIJA PEPTIDA POMOĆU NECILJANE ANALIZE

Za kvantifikaciju je korištena SWATH-DIA analiza koje predstavlja podatkovno neovisnu analizu kod koje podaci koji su dobiveni ovise o veličini prozora odabranim za MS/MS analizu. U podpoglavlju 3.2.9. navedeni su svi parametri bitni za provođenje ove analize. Za provedbu kvantifikacije prvo je bilo potrebno napraviti pomoću podatkovno ovisne analize referentnu spektralnu bazu. Podatke koji su dobiveni SWATH-DIA analizom obrađeni su u PeakView softveru. U ovom radu pozornost je usmjerena na kvantifikaciju identificiranih bioaktivnih peptida.

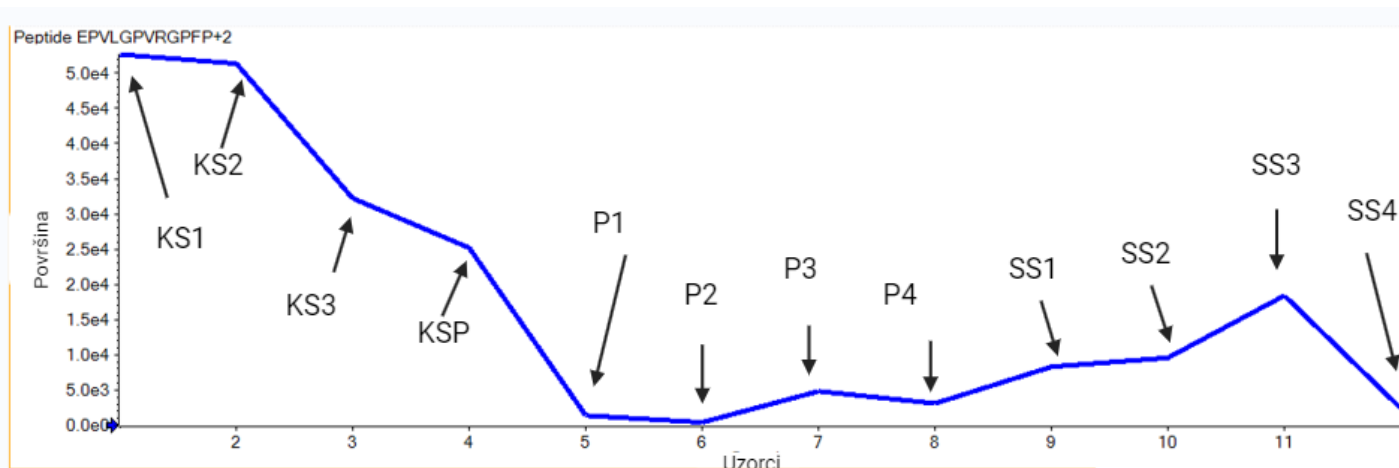
Slika 9 prikazuje kromatogram peptida EPVLGPVRGPPF koji je izdvojen kao reprezentativni jer je njegova prisutnost zabilježena u svim ispitivanim uzorcima. Svaka od prikazanih krivulja koje su označene različitom bojom predstavlja različite tranzicije. Svaka tranzicija odgovara jednom od fragmenata koji nastaje cijepanjem iona. Kada se peptid eluira iz kolone, intenzitet signala njegovih ispitivanih fragmentacijskih iona mijenja se usklađeno s eluacijom, prateći obično Gaussov-u krivulju elucije peptida, formirajući kromatografsku „grupu vrhova“ koja će se koristiti za procjenu detekcije peptida i procjenu njegove količine. Vidimo da je prisutno 5 tranzicija koje se nalaze jedna ispod druge što je oznaka pouzdanih rezultata.



Slika 9. Reprezentativni MS/MS kromatogram peptida EPV LGPVRGPFP, m/z vrijednosti 632.8541

Različitim bojama prikazani su kromatogrami specifičnih fragmentnih iona.

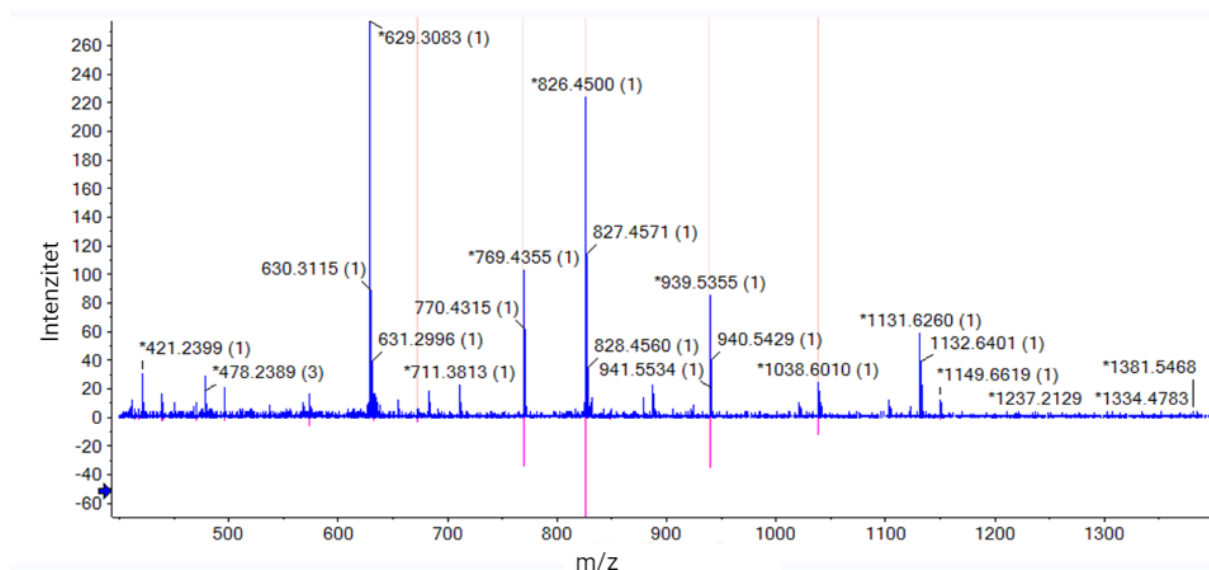
Kako je prikazano na slici 10. predstavlja zastupljenost peptida EPV LGPVRGPFP u svim uzorcima preko površine. Površina se računa na način da se zbroje sve površine ispod pikova koje predstavljaju pojedinu tranziciju (prikazano na slici 9). Ovako dobivene površine se koriste i za samu kvantifikaciju pojedinog peptida. Ono što je vidljivo za peptid EPV LGPVRGPFP je da je njegova najveća površina, a time i zastupljenost zabilježena u uzorku kisele sirutke KS1 te nešto malo manje u uzorku KS2, dok je površina u uzorcima permeata poput P1 i P2 najmanja. Općenito se može reći da je u svim uzorcima kisele sirutke ovaj peptid zastupljen više nego u uzorcima permeata i slatke sirutke.



Slika 10. Prikaz zastupljenosti peptida EPV LGPVRGPFP u svih 12 ispitivanih uzoraka

Uzorak 1 –kiselasirutka (KS1), uzorak 2 – kiselasirutka (KS2), uzorak 3 – kiselasirutka (KS3), uzorak 4 – kiselasirutka (KSP), uzorak 5 – permeat (P1), uzorak 6 – permeat (P2), uzorak 7 – permeat (P3), uzorak 8 – permeat (P4), uzorak 9 – slatka sirutka (SS1), uzorak 10 – slatka sirutka (SS2) uzorak 11 – slatka sirutka (SS3), uzorak 12 – slatka sirutka (SS4)

Slika 11 predstavlja zoran prikaz podataka koji su dobiveni eksperimentalno, a označeni su plavom bojom te predstavljaju sve fragmente peptida EPVLGPVRGPF. Eksperimentalni podaci su uspoređeni s podacima koji se nalaze u referentnoj knjižnici koja je pripravljena pomoću UniProt baze podataka za *Bos taurus* (na slici je označena crvenom bojom) i podataka koji se dobiju pomoću podatkovno neovisne analize (označeno narančasto) i vidi se da postoje odgovarajuća poklapanja što sugerira dobro provedenu identifikaciju peptida što omogućava i odgovarajuću kvantifikaciju.



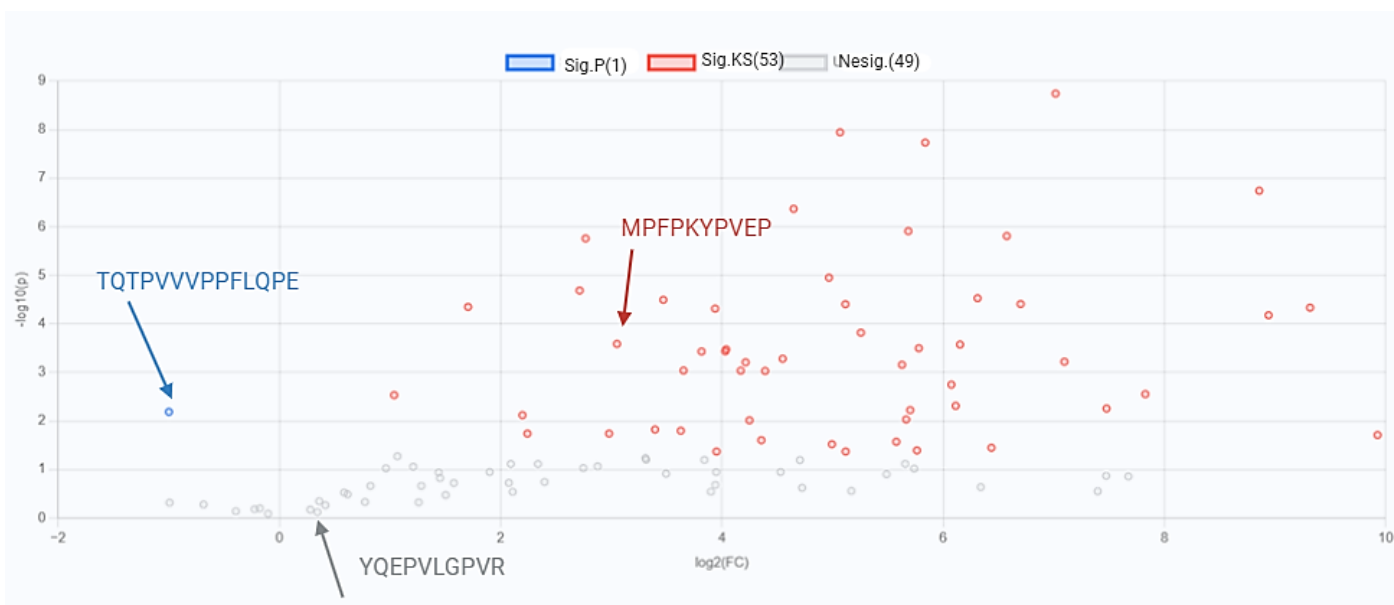
Slika 11. Usporedni prikaz MS spektra fragmenata peptida EPVLGPVRGPF iz uzoraka (plavo), knjižnice peptida (crveno) i SWATH-DIA podatkovno neovisne analize (narančasto)

4.2.1. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata dobivenih nakon SWATH-DIA analize provedena je pomoću web platforme MetaboAnalyst verzije 6.0. koja služi za interpretaciju, kvantitativnu analizu i vizualizaciju rezultata. Statistička značajnost između skupina ispitivanih uzoraka procijenjena je korištenjem neuparenog t-testa i Volcano plot-a. Volcano plot kombinira rezultate analize FC vrijednosti i t-testa u jedan graf, koji omogućava vizualizaciju postojanja statističke značajnosti između više komponenti u uzorcima. U ovoj obradi podataka uzeto je da su statističke razlike između ispitivanih uzoraka značajne ukoliko su p vrijednosti manje od 0,05. FC vrijednost označava za pojedini analizirani peptid omjer površina referentnog i tretiranog uzorka. Površine su izračunate na način da se zbrojila površina ispod svih pikova svih tranzicija za taj peptid. Svi detektirani peptidi iz kisele sirutke grupirani su u jednu grupu, također su svi peptidi iz uzoraka slatke sirutke i permeata grupirani zajedno. Usporedba između grupa izvedena je na način da

se svaka grupa usporedila s ostalima tj. grupa KS (peptidi iz uzoraka kisele sirutke) uspoređena je s grupom P (peptidi iz uzoraka permeata), a potom i s grupom SS (peptidi iz uzoraka slatke sirutke). Isti princip primijenjen je i za grupu P i grupu SS.

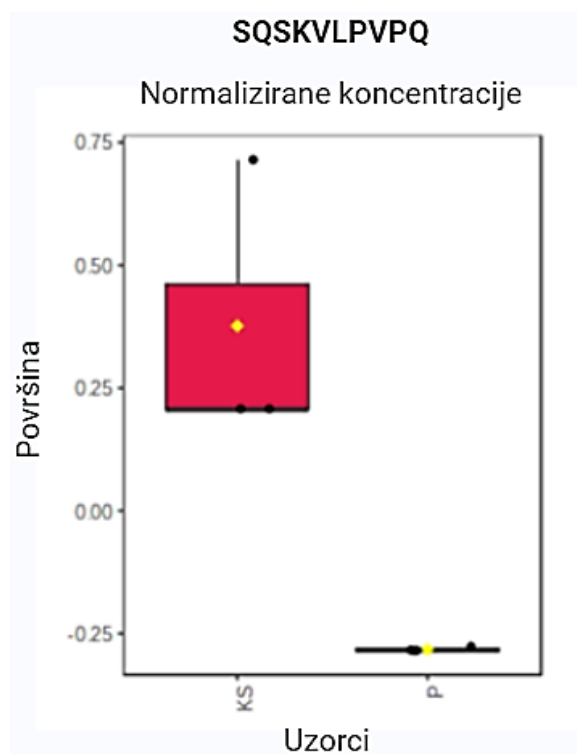
Na slici 12 prikazano je ukupno 103 peptida koja su identificirani u ispitivanim uzorcima. Od svih tih peptida njih 49 nema statistički značajnu razliku u količini u jednoj od grupa uzoraka ili drugim riječima rečeno njihova koncentracija je približno jednaka u obje grupe uzoraka. Peptidi poput QEPVLPVVRGPFPIIV, RDMPIQAF, YQEPVLPVVR i SQSKVLPVPQKAVPYPQ za koje je utvrđeno da posjeduju bioaktivna svojstva su u uzorcima KS i P zastupljeni u približno jednakim koncentracijama. Ostali identificirani bioaktivni peptidi su značajnije prisutni u jednom od uzoraka. Primjerice peptid TQTPVVVPPFLQPE je jedini peptid koji se u većoj koncentraciji nalazi u uzorcima P u odnosu na uzorke KS i pri tome je ovaj peptid značajan jer ima dokazana bioaktivna svojstva. U uzorcima grupe KS ukupno ima detektirano 53 peptida koji su signifikantni odnosno njihova koncentracija je veća od one u uzorcima P. Unutar tih 53 peptida nalaze se i oni s bioaktivnim svojstvima pa je na slici istaknut peptid MPFPKYPVEP.



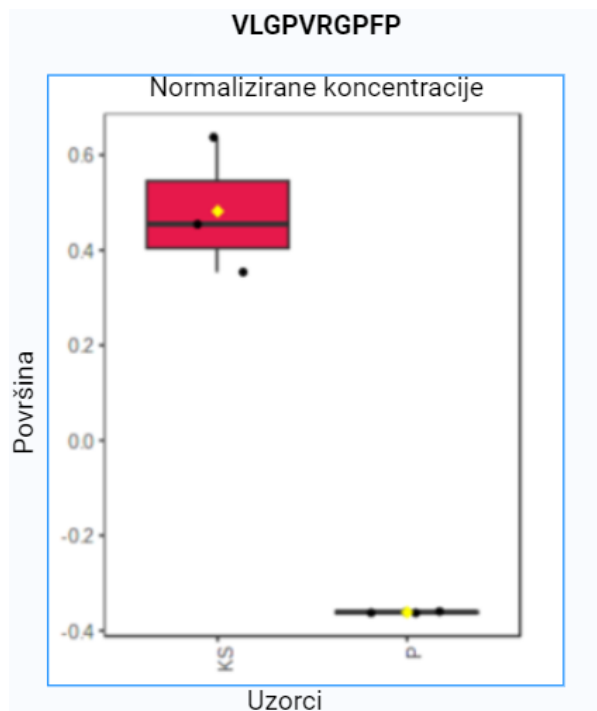
Slika 12. Usporedba značajne zastupljenosti peptida prisutnih u uzorcima grupe KS s peptidima prisutnim u uzorcima grupe P pomoću Volcano prikaza. Istaknuti peptidi predstavljaju neke peptide s određenim bioaktivnim svojstvima koja su pokazana u ovom radu.

Na sljedećim slikama grafički su prikazani pomoću „box plot-a“ odnosi koncentracija za pojedini bioaktivni peptid koji je značajnije prisutan u jednoj od grupa uzoraka. Na slici 13 prikazano je kako je peptid SQSKVLPVPQ u puno većoj koncentraciji zastupljen u uzorcima KS naspram u uzorcima P. Točnije prema FC vrijednosti koja za ovaj peptid iznosi 178.18 se vidi da je koncentracija ovog peptida u KS uzorcima 178.18 puta veća, a p vrijednost odgovara

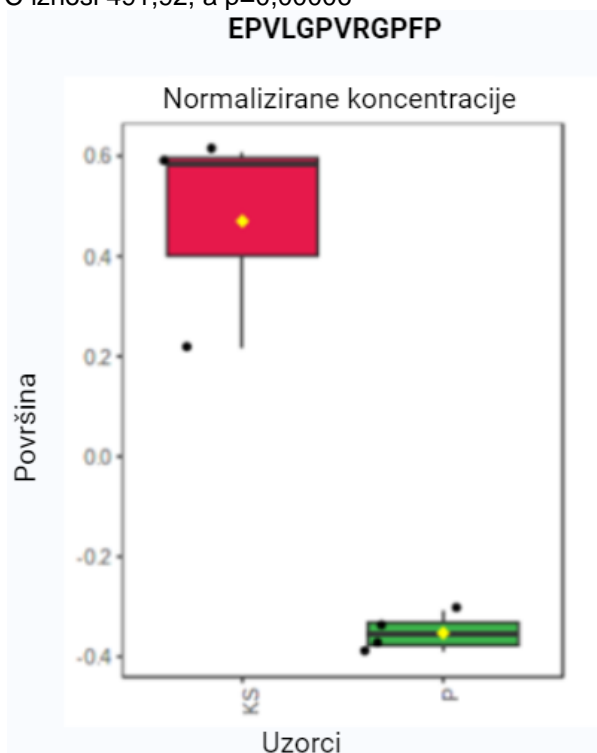
iznosu od 0,0056. Na slici 14 peptid VLGPVRGPPF prema svojoj FC vrijednosti je zastupljeniji za čak 491,92 puta više u uzorcima KS nego u uzorcima P. Na slici 15 za peptid EPVLGPVRGPPF je također potvrđeno da je prisutan u višoj koncentraciji u uzorcima KS nego u uzorcima P. Za razliku od prethodna dva peptida ovaj ima FC vrijednost znatno manju i ona iznosi 18,564. Za peptid VYPPFGPIP (slika 16) prema FC vrijednosti se vidi da je za 50,773 puta njegova koncentracija veća u uzorcima KS nego u P. Peptid MPFPKYPVEP ima za 8,29 puta veću koncentraciju u KS uzorcima (slika 17). Možda najzanimljiviji peptid u ovoj usporedbi je TQTPVVPPFLQPE jer predstavlja jedini peptid od ukupno 103 peptida čija je koncentracija značajnije zastupljena u uzorcima P (slika 18). Kako za ovaj peptid FC vrijednost iznosi 0,5 ona označava da je koncentracija ovog peptida zapravo veća za 2 puta u uzorcima P u odnosu na one u uzorcima KS.



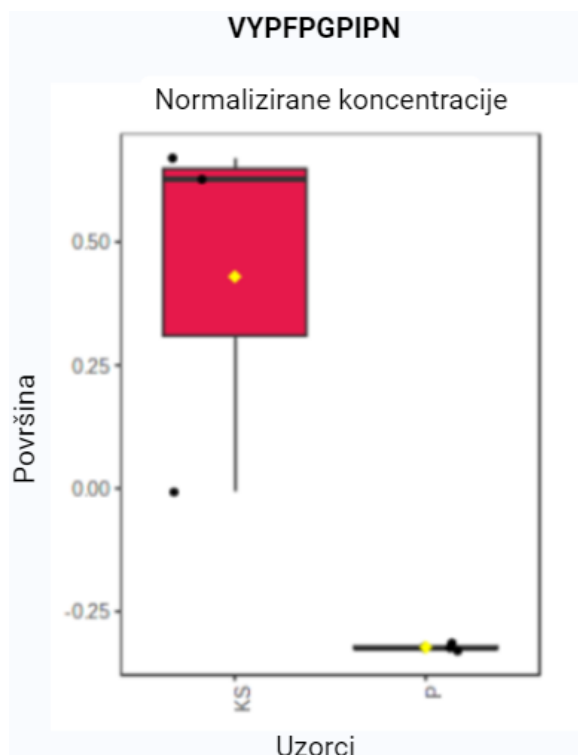
Slika 13. Zastupljenost bioaktivnog peptida SQSKVLPVPQ u uzorcima grupe KS i P. Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 178,18, a $p=0,0056$



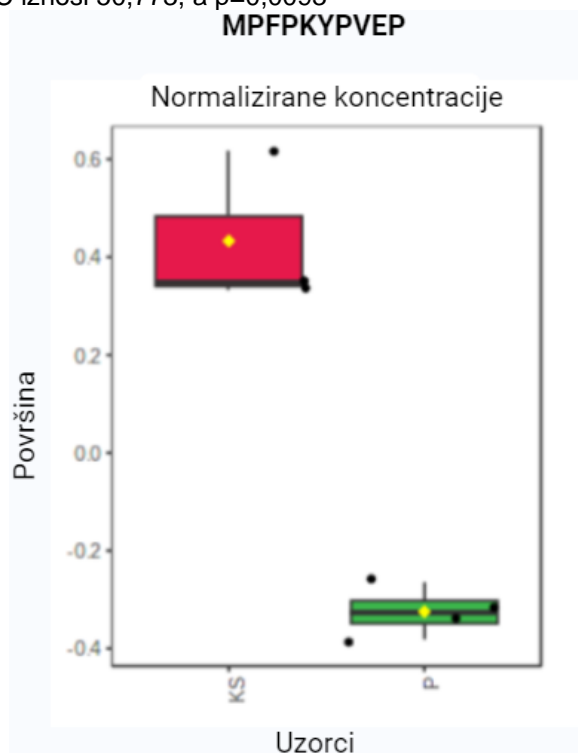
Slika 14. Zastupljenost bioaktivnog peptida VLGPVRGPFPP u uzorcima grupe KS i P. Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 491,92, a $p=0,00006$



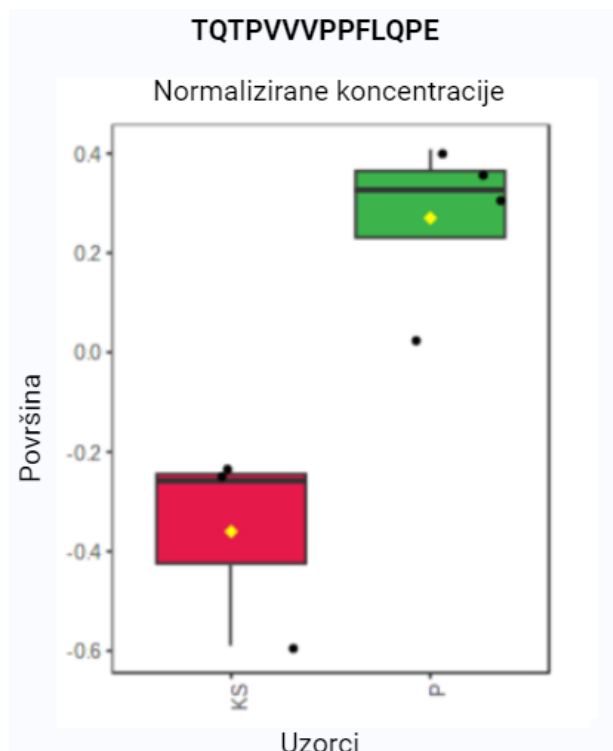
Slika 15. Zastupljenost bioaktivnog peptida EPVLGPVRGPFPP u uzorcima grupe KS i P. Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 18,564, a $p=0,0062$



Slika 16. Zastupljenost bioaktivnog peptida VYFPFGPIP u uzorcima grupe KS i P
 Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 50,773, a $p=0,0093$

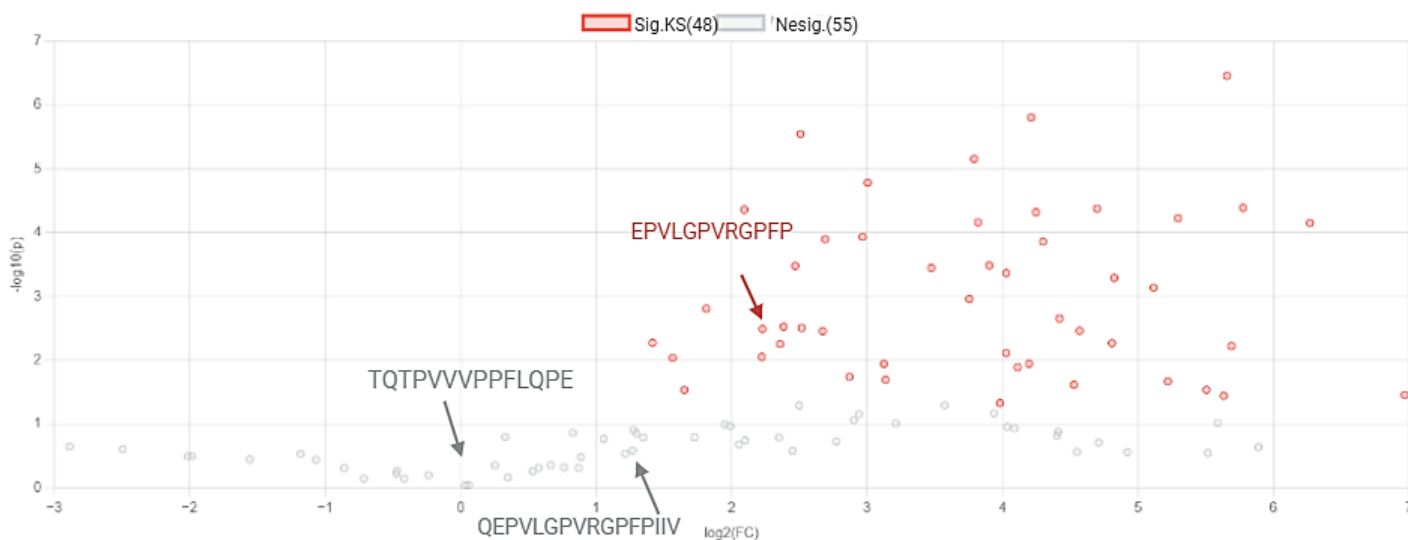


Slika 17. Zastupljenost bioaktivnog peptida MPFPKYPVEP u uzorcima grupe KS i P
 Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 8,29, a $p=0,0003$

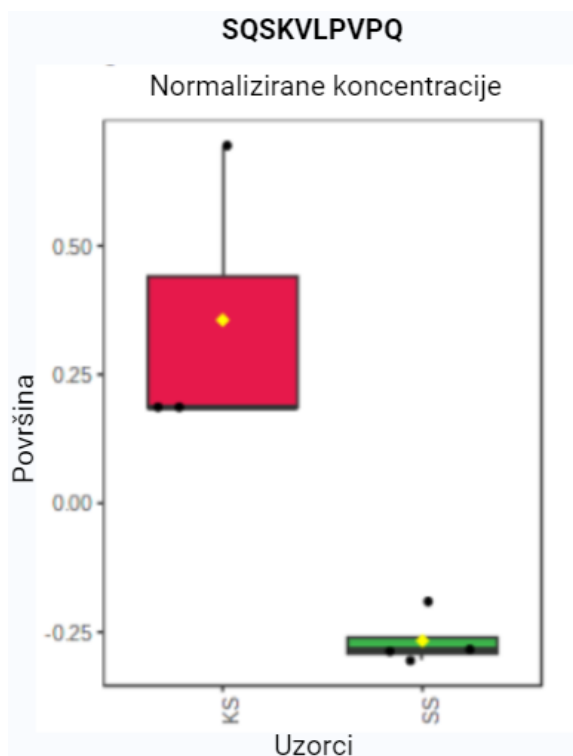


Slika 18. Zastupljenost bioaktivnog peptida TQTPVVVPPFLQPE u uzorcima grupe KS i P. Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 0,5, a $p=0,0065$

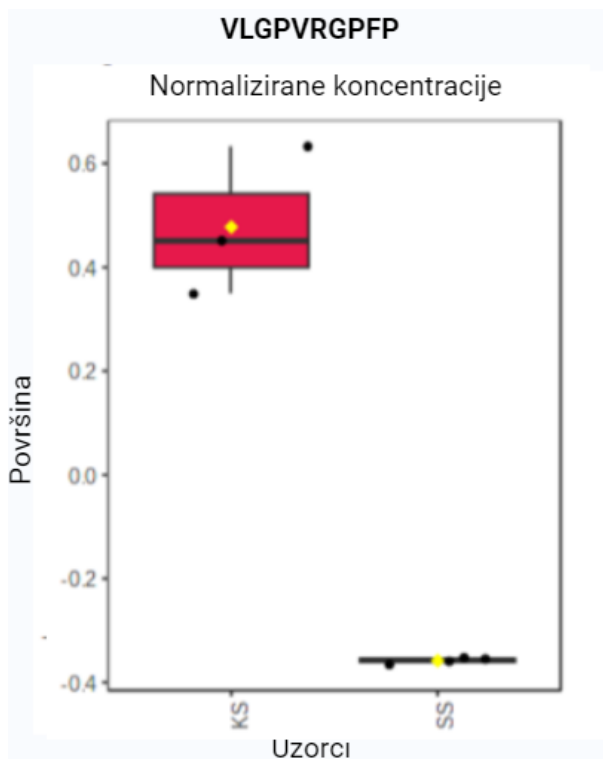
Usporedbom peptida u uzorcima KS i peptida u uzorcima SS (slika 19) od ukupno 103 peptida koja su identificirana nema niti jednog peptida koji je značajno prisutan u uzorcima SS. Također je vidljivo da ukupno ima 55 peptida koji nemaju statistički značajno veću koncentraciju niti u jednoj od ispitivanih grupa uzoraka. Ipak čak 48 peptida je značajnije prisutno u uzorcima KS. Što se tiče bioaktivnih peptida zabilježeno je da su peptidi TQTPVVVPPFLQPE, QEPVLGPVRGPFPIIV, RDMPIQAF, SQSKVLPVPQKAVPYPQ i YQEPVLGPVR prisutni u obje grupe uzoraka u približno jednakim koncentracijama. Drugi bioaktivni peptidi koji su identificirani (SQSKVLPVPQ, VLGPRGPF, EPVLGPVRGPF, VYPFPGIPN, MPFPKYPVEP) pokazalo se da su njihove koncentracije više u uzorcima KS. Peptid SQSKVLPVPQ (slika 20) prema FC vrijednosti od 16,297 je toliko puta zastupljeniji u uzorcima KS nego u uzorcima SS. Peptid VLGPRGPF (slika 21) je u usporedbi s ostalim bioaktivnim peptidima najznačajnije zastupljen u uzorcima KS jer je njegova FC vrijednost iznimno visoka i iznosi 77,125. Bioaktivni peptidi EPVLGPVRGPF (slika 22) u usporedbi s ostalim bioaktivnim peptidima ima najmanju FC vrijednost od 4,6878, ali je također značajno zastupljen u uzorcima KS. Peptidi VYPFPGIPN (slika 23) i MPFPKYPVEP (slika 24) imaju približno jednake FC vrijednosti koje iznose 18,326 odnosno 19,681.



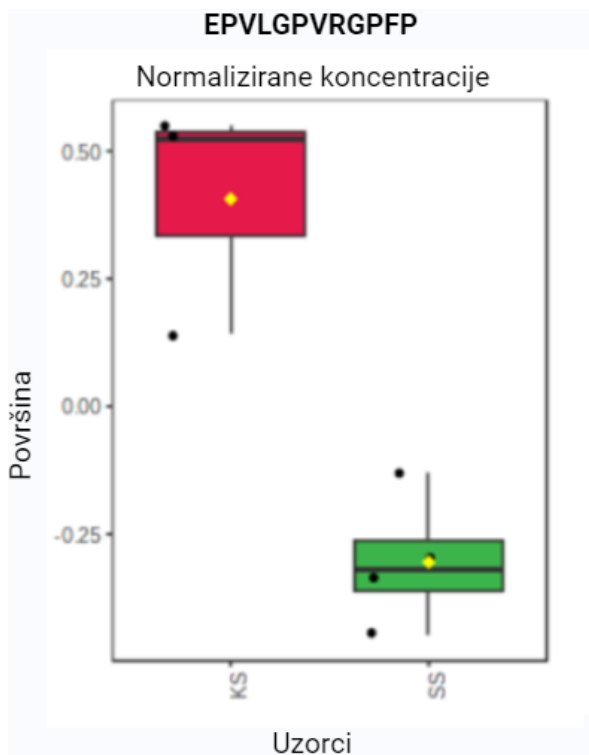
Slika 19. Usporedba značajne zastupljenosti peptida prisutnih u uzorcima grupe KS s peptidima prisutnim u uzorcima grupe SS
Istaknuti peptidi predstavljaju neke peptide s određenim bioaktivnim svojstvima koja su pokazana u ovom radu.



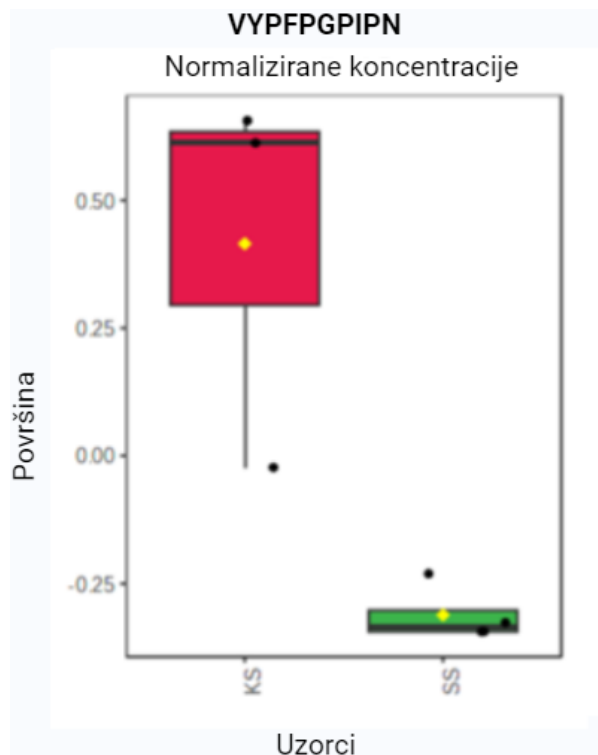
Slika 20. Zastupljenost bioaktivnog peptida SQSKVLPVPQ u uzorcima grupe KS i SS
Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 16,297, a $p=0,0077$



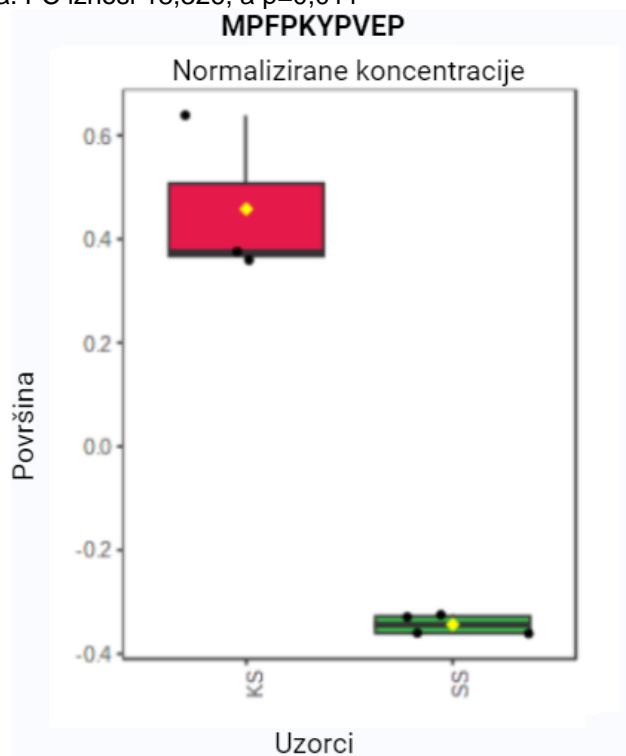
Slika 21. Zastupljenost bioaktivnog peptida VLGPVRGPF u uzorcima grupe KS i SS Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 77,125, a $p=0,0007$



Slika 22. Zastupljenost bioaktivnog peptida EPVLGPVRGPF u uzorcima grupe KS i SS Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 4,6878, a $p=0,0033$

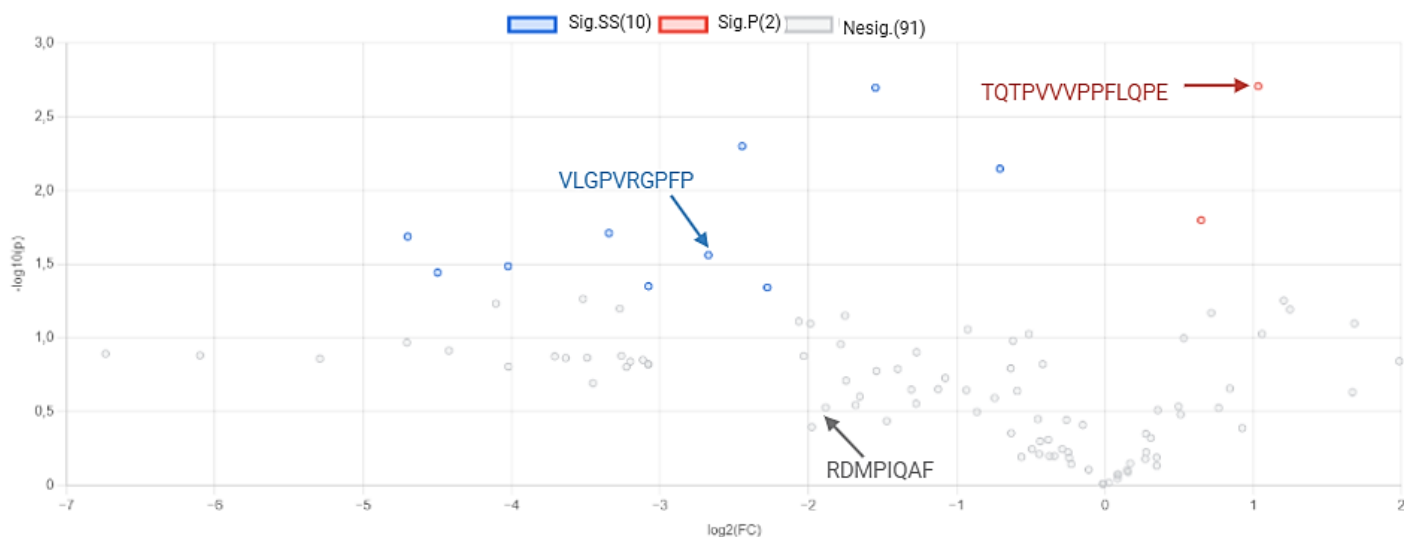


Slika 23. Zastupljenost bioaktivnog peptida VYFPFGPIP u uzorcima grupe KS i SS
 Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 18,326, a $p=0,011$



Slika 24. Zastupljenost bioaktivnog peptida MPFPKYPVEP u uzorcima grupe KS i SS
 Površina koja se dobiva zbrojem površina ispod pikova svih tranzicija za pojedini peptid je u korelaciji s koncentracijom peptida. FC iznosi 19,681, a $p=0,0001$

Usporedbom peptida u uzorcima P i peptida u uzorcima SS (slika 25) vidi se da i jedan i drugi uzorak imaju nekoliko značajno prisutnih peptida. U uzorcima P prisutna su 2 peptida koji se nalaze u značajno većoj koncentraciji u odnosu na uzorke SS, a još bitnije da je jedan od njih poznat po svom bioaktivnom svojstvu to je peptid TQTPVVVPPFLQPE. Što se tiče peptide čija je značajnija koncentracija zabilježena u uzorcima SS, njih je ukupno 10, ali je samo jedan od njih s bioaktivnim svojstvima i to je peptid VLGPVVRGPFP. Ostali 91 peptida je koncentracijski približno jednako zastupljeno u svim P i SS uzorcima.



Slika 25. Usporedba značajne zastupljenosti peptida prisutnih u uzorcima grupe P s peptidima prisutnim u uzorcima grupe SS

Istaknuti peptidi predstavljaju neke peptide s određenim bioaktivnim svojstvima koja su pokazana u ovom radu.

Promatrajući grafički prikaz (slika 26) za peptid VLGPVVRGPFP vidi se koliko je značajnije navedeni peptid prisutan u uzorcima SS i da s obzirom na FC vrijednost od 0,15678 ta je koncentracije približno 6,38 puta veća od koncentracije istog peptida u P uzorcima. Na slici 27 koja prikazuje zastupljenost peptida TQTPVVVPPFLQPE vidi se da je on zastupljeniji u uzorcima P te na osnovi FC vrijednosti od 2,0466 ima toliko puta veću koncentraciju u usporedbi s koncentracijom istog peptide u SS uzorcima.

5. ZAKLJUČCI

1. U uzorcima nusproizvoda mliječne industrije tj. slatke i kisele sirutke te permeata identificirano je ukupno 103 peptida od kojih njih 10 ima u literaturi detektirana i opisana bioaktivna svojstva.
2. Peptidi SQSKVLPVPQ, TQTPVVVPPFLQPE, QEPVLGPVRGPFPIIV, VLGPVRGPFPP, RDMPIQAF, EPVLGPVRGPFPP, VYFPFGPIPN, SQSKVLPVPQKAVPYPQ, MPFPKYPVEP i YQEPVLGPVR posjeduju već opisana bioaktivna svojstva kao što su ACE inhibitorno, antioksidativno, antitrombotičko i imunomodulatorno.
3. Nakon provedene kvantifikacije i statističke obrade podataka pomoću web platforme MetaboAnalys 6.0 zaključuje se za bioaktivne peptide QEPVLGPVRGPFPIIV, RDMPIQAF i SQSKVLPVPQKAVPYPQ da su u približno jednakim koncentracijama zastupljeni u sva tri ispitivana uzorka.
4. Za peptide SQSKVLPVPQ, VLGPVRGPFPP, EPVLGPVRGPFPP, VYFPFGPIPN i MPFPKYPVEP pokazano je kako su u statistički značajnoj koncentraciji zastupljeni u uzorcima kisele sirutke, dok je peptid TQTPVVVPPFLQPE u statistički značajnoj koncentraciji zastupljen u uzorcima permeata odnosno peptid YQEPVLGPVR u statistički značajnoj koncentraciji zastupljen u uzorcima slatke sirutke.
5. Prema navedenim rezultatima može se zaključiti da kisela sirutka kao nusproizvod mliječne industrije predstavlja najvrjedniji izvor bioaktivnih peptida.

6. LITERATURA

1. Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN (2022) Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci* **23**, 1445. doi: 10.3390/ijms23031445.
2. Banaszewska A, Crujssen FCAM, Claassen GDH, Van der Vorst JGAJ (2014) Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry. *J Dairy Sci* **97**, 1893-1908. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7283>
3. Banić M, Butorac K, Čuljak N, Butorac A, Novak J, Pavunc AL, Rušanac A, Stanečić Ž, Lovrić M, Šušković J i sur. (2024) An Integrated Comprehensive Peptidomics and In Silico Analysis of Bioactive Peptide-Rich Milk Fermented by Three Autochthonous Cocci Strains. *Int J Mol Sci* **25**, 2431. <https://doi.org/10.3390/ijms25042431>
4. Bansal N, Bhandari B (2016) Functional milk proteins: production and utilization - whey-based ingredients. *A Adv Dairy Chem* **1**, 67–98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_3
5. Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* **3**, 228 – 237. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>
6. Božanić R, Barulčić I, Lisak Jakopović K, Tratnik Lj (2023) Possibilities of Whey Utilisation. *Godišnjak HATZ-a* **1**, 281-287. <https://hrcak.srce.hr/317706>
7. Buchanan D, Martindale W, Romeih E, Hebishy E (2023) Recent advances in whey processing and valorisation: Technological and environmental perspectives. *Int J Dairy Technol* **76**, 291-312. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12935>
8. Chandan RC (2015) Dairy Processing and Quality Assurance: An Overview. U: Chandan RC, Kilara A, Shah NP (ured.) Dairy Processing and Quality Assurance, 2. izd., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, str. 1–40. doi:10.1002/9781118810279.ch01
9. Chourasia R, Phukon LC, Abedin MM, Padhi S, Singh SP, Rai AK (2022) Whey valorization by microbial and enzymatic bioprocesses for the production of nutraceuticals and value-added products. *Bioresour Technol Rep* **19**, 101-144. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101144>
10. Eisele T, Stressler T, Kranz B, Fischer L (2013) Bioactive peptides generated in an enzyme membrane reactor using *Bacillus lentus* alkaline peptidase. *Eur Food Res Technol* **236**, 483-490. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1894-5>
11. Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D i sur. (2008) Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature* **455**, 528–531 <https://doi.org/10.1038/nature07180>

12. Farvin KS, Baron CP, Nielsen NS, Jacobsen C (2010) Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 1-in vitro assays and evaluation in ω -3 enriched milk. *Food Chem* **123**, 1081-1089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.067>
13. FitzGerald RJ, Murray BA, Walsh DJ (2004) Hypotensive peptides from milk proteins. *J Nutr* **134**, 980-988. <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.980S>
14. Frye CP (2013) Regulatory requirements for milk production, transportation and processing U: Chandan RC, Kilara A (ured.) *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, 2. izd., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, SAD, str. 49-69. doi: 10.1002/9781118481301
15. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, i Jiang Y (2003) Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Res* **23**, 1719-1726. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.08.005>
16. Gupta C, Prakash D (2017) Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages* **3**, 31. <https://doi.org/10.3390/beverages3030031>
17. Hayes M, Stanton C, Slattery H, O'Sullivan O, Hill C, Fitzgerald GF, Ross RP (2007) Casein Fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 Contains a Range of Novel Propeptide Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Appl Environ Microbiol Applied* **73**, 4658-4667. <https://doi.org/10.1128/AEM.00096-07>
18. Jahadi M, Ehsani MR, Paidari S (2018) Characterization of milk proteins in ultrafiltration permeate and their rejection coefficients. *J Food Biosci Technol* **8**, 49-54. <https://sanad.iau.ir/journal/jfbt/Issue/38492>
19. Jayasree Joshi T, Harsha V, Nandagopal P, Ashok A, Pokhrel S (2024) Value Addition and Sustainable Management of Dairy Industry Byproducts. U: Cherian E, Gurunathan B (ured.) *Value Added Products From Food Waste*, Springer, Heidelbergu, str. 19-38. https://doi.org/10.1007/978-3-031-48143-7_2
20. Kandukuri S, Bhat MI, Bajaj RK, Kapila S, Kapila R (2019) Buffalo milk casein derived decapeptide (YQEPVLGPVR) having bifunctional anti-inflammatory and antioxidative features under cellular milieu. *Int J Pept Res TherTherapeutics* **25**, 623-633. DOI:10.1007/s10989-018-9708-7
21. Kayser H, Meisel H (1996) Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS letters* **383**, 18-20. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00207-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00207-4)
22. Ketterings Q, Czymmek K, Cmi S, Godwin G, Ganoe K (2017) Guidelines for Land Application of Acid Whey. *Sci Papers Ser D Anim Sci* **247**, 1-8.
23. Kozub YA, Komlatsky VI, Khoroshailo TA (2020) About some automated processes in the production of dairy products. *IOP Conf. Ser.: Mater Sci Eng* **862**, 1-6.

doi: 10.1088/1757-899X/862/3/032021

24. León-López A, Pérez-Marroquín XA, Estrada-Fernández AG, Campos-Lozada G, Morales-Peñalosa A, Campos-Montiel R i sur. (2022) Milk whey hydrolysates as high value-added natural polymers: functional properties and applications. *Polymers*, **14**, 1258. <https://doi.org/10.3390/polym14061258>
25. Liu H, Tu M, Cheng S, Chen H, Wang Z, Du M (2019) An anticoagulant peptide from beta-casein: identification, structure and molecular mechanism. *Food & function* **10**, 886-892. doi: 10.1039/c8fo02235f
26. Lu Y, Govindasamy-Lucey S, Lucey JA (2016) Angiotensin-I-converting enzyme-inhibitory peptides in commercial Wisconsin Cheddar cheeses of different ages. *J Dairy Sci* **99**, 41-52. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9569>
27. Macwan SR, Dabhi BK, Parmar SC, Aparnathi KD (2016) Whey and its utilization. *Int J Curr Microbiol App Sci* **5**, 134-155. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.508.016>
28. Majumder K, Wu J (2015) Molecular Targets of Antihypertensive Peptides: Understanding the Mechanisms of Action Based on the Pathophysiology of Hypertension. *Int J Mol Sci* **16**, 256-283. <https://doi.org/10.3390/ijms16010256>
29. Marcone S, Belton O, Fitzgerald DJ (2017) Milk-derived bioactive peptides and their health promoting effects: a potential role in atherosclerosis. *Br J Clin Pharmacol* **83**, 152-162. doi: 10.1111/bcp.13002
30. Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA (2006) Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J Dairy Sci* **89**, 3352-3359. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72372-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72372-4)
31. Mohanty D, Mohapatra S, Misra S, Sahu PS (2016) Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi J Biol Sci* **23**, 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>
32. More S (2009) Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. *Ir Vet J* **62**, 1-10. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S5>
33. Motarjemi Y, Moy GG, Jooste PJ, Anelich LE (2014) Milk and Dairy Products. U: Motarjemi Y, Lelieveld H (ured.) *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry*, Academic Press, Amsterdam, str. 83-117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00005-6>
34. Nagpal R, Behare PV, Kumar M, Mohania D, Yadav M, Jain S i sur. (2012) Milk, milk products, and disease free health: an updated overview. *Crit Rev Food Sci Nutr* **52**, 321-333. doi: 10.1080/10408398.2010.500231.
35. O'Donoghue LT, Murphy EG (2023) Nondairy food applications of whey and milk permeates: Direct and indirect uses. *Compre Rev Food Sci Food Saf* **22**, 2652-2677.

<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13157>

36. Oliveira D, Fox P, O'Mahony JA (2019) Byproducts from Dairy Processing. U: Simpson BK, Aryee ANA, Toldrá F (ured.) Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels, 1. izd., Wiley, London, str. 57–106. doi:10.1002/9781119383956.ch4
37. Park YW (2009) Bioactive components in milk and dairy products. Wiley-Blackwell, Ames, str. 15-42 doi:10.1002/9780813821504.
38. Pereira PC (2013) Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* **30**, 619-627. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.011
39. Pires AF, Marnotes NG, Rubio OD, Garcia AC, Pereira CD (2021) Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods* **10**, 1-24. <https://doi.org/10.3390/foods10051067>
40. Prazeres AR, Carvalho F, Rivas J (2012) Cheese Whey Management: A Review. *J Environ Manage* **110**, 48-68, doi: 10.1016/j.jenvman.2012.05.018
41. Quirós A, Ramos M, Muguerza B, Delgado MA, Miguel M, Aleixandre A i sur. (2007) Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *Int Dairy J* **17**, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.12.011>
42. Ryan MP, Walsh G (2016) The biotechnological potential of whey. *Rev Environ Sci Bio Technol* **15**, 479–498 <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>
43. Sánchez A, Vázquez A (2017) Bioactive peptides: A review, *Food Qual Saf* **1**, 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
44. Sar T, Harirchi S, Ramezani M, Bulkan G, Akbas MY, Pandey A i sur. (2022) Potential utilization of dairy industries by-products and wastes through microbial processes: A critical review. *Sci Total Environ* **810**, 152-253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152253>
45. Szudera-Kończal K, Myszka K, Kubiak P, Majcher MA (2020) The Use of Sour and Sweet Whey in Producing Compositions with Pleasant Aromas Using the Mold *Galactomyces geotrichum*: Identification of Key Odorants. *J Agric Food Chem* **68**, 10799-10807 doi: 10.1021/acs.jafc.0c03979
46. Tagliacruzchi D, Martini S, Solieri L (2019) Bioprospecting for Bioactive Peptide Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Dairy Food. *Fermentation* **5**, 96. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>
47. Tonolo F, Fiorese F, Moretto L, Folda A, Scalcon V, Grinzato A i sur. (2020) Identification of New Peptides from Fermented Milk Showing Antioxidant Properties: Mechanism of Action. *Antioxidants* **9**, 117. <https://doi.org/10.3390/antiox9020117>
48. Tudor Kalit M, Janda D, Dolenčić Špehar I, Bendelja Ljoljić D, Kalit S (2023) Bioaktivni

- peptidi iz sira. In *58th Croatian & 18th International Symposium on Agriculture* 403-408.
49. Vargas-Bello-Pérez E, Márquez-Hernández RI, Hernández-Castellano LE (2019) Bioactive peptides from milk: Animal determinants and their implications in human health. *J Dairy Res* **86**, 136-144. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000384>
50. Wittkopf N, Neurath MF, Becker C (2014) Immune-epithelial crosstalk at the intestinal surface. *J Gastroenterol* **49**, 375–387. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0929-4>
51. Wong MKS (2021) Angiotensin converting enzyme. U: Takei Y, Ando H, Tsutsui K (ured.) *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, 2. izd., Academic Press, San Diego, str. 505-508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820649-2.00128-5508>
52. Yadav JSS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY (2015) Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol Adv* **33**, 756-774. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>
53. Yamamoto N, Akino A, Takano T (1994) Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J Dairy Sci* **77**, 917-922. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77026-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77026-0)
54. Yang WG, Wang Z, Xu SY (2007) A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader. *Chin Chem Lett* **18**, 449-451. doi: 10.1016/j.cclet.2007.02.014

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Maja Zečević izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis