

# ISKORIŠTAVANJE SIRUTKE - DOSTIGNUĆA I INOVATIVNI NAČINI PRIMJENE

---

**Antić, Anamarija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:673971>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-23**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**  
**PIVARSTVO**

**ANAMARIJA ANTIĆ**

**ISKORIŠTAVANJE SIRUTKE – DOSTIGNUĆA I**  
**INOVATIVNI NAČINI PRIMJENE**

**ZAVRŠNI RAD**

**KARLOVAC, 2021.**

**Veleučilište u Karlovcu**  
Stručni studij prehrambene tehnologije  
Pivarstvo

Anamarija Antić

**Iskorištavanje sirutke – dostignuća i inovativni načini primjene**

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Marijana Blažić, prof. v.š.  
Neposredni voditelj: Elizabeta Zandona, mag.ing.bioproc., asistentica  
Broj indeksa studenta: 0314614020

Karlovac, ožujak 2021.

*Zahvaljujem doc. dr. sc. Marijani Blažić, prof. v. š. što mi je omogućila rad pod svojim vodstvom i na svom prenesenom stručnom znanju tijekom studiranja i uzajamnom poštovanju. Zahvaljujem se asistentici Elizabeti Zandona, mag.ing.bioproc na brojnim savjetima, uloženom vremenu i nesebičnoj pomoći.*

*Hvala svim mojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili tu u onim lijepim i teškim trenucima.*

*Najveću zahvalu za ono što sam postigla dugujem svojim roditeljima, sestri i bratu koji su uvijek bili moja najveća podrška i oslonac.*

*I hvala mome zaručniku što je uvijek vjerovao u mene i bio moja velika motivacija.*

## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Anamarija Antić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Iskorištavanje sirutke – dostignuća i inovativni načini primjene** rezultat vlastitog rada i istraživanja te se oslanja se na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 17.ožujak.2021.

Anamarija Antić

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### ISKORIŠTAVANJE SIRUTKE – DOSTIGNUĆA I INOVATIVNI NAČINI PRIMJENE

*Anamarija Antić*

Rad je izrađen na Odjelu prehrambene tehnologije Veleučilišta u Karlovcu u sklopu projekta „Modifikacija procesa zrenja sira i razvoj proizvoda na bazi sirutke - SIRENA“ (KK.01.1.1.04.0096).

Mentor: *doc. dr.sc. Marijana Blažić, prof. v.š.*

Neposredni voditelj: *Elizabeta Zandona, mag.ing.bioproc., asistentica*

#### Sažetak

Prilikom proizvodnje sira i kazeina stvaraju se velike količine sirutke, nusproizvoda koji se već dugi niz godina smatra velikom ekološkom opasnošću uslijed visokog organskog opterećenja i neadekvatnog gospodarenja sirutkom. Tijekom posljednjih desetljeća, uvođenjem strogih regulativa o zaštiti okoliša i gospodarenju otpadom, razvoj ekološki i ekonomski učinkovitijih metoda gospodarenja nusproizvodima postaje prioritet, a neželjeni krajnji proizvodi poput sirutke postaju visokovrijedne sirovine. Obzirom na visoku nutritivnu vrijednost i funkcionalna svojstva sirutke i njenih sastojaka utemeljeni su inovativni načini primjene i iskorištavanja sirutke u raznim granama industrije. Održivo gospodarenje sirutkom uglavnom je usmjereno na biotehnološke i prehrambene metode razvoja proizvoda s dodanom vrijednošću poput praha sirutke, proteina sirutke, funkcionalne hrane i pića, jestivih filmova i prevlaka, mliječne kiseline, bioplastike, biogoriva i sličnih vrijednih bioloških proizvoda.

Ovaj rad prikazuje glavne značajke i načine iskorištavanja sirutke u prehrambenoj industriji, uzimajući u obzir nove pristupe pročišćavanja sastojaka sirutke i njihove pretvorbe u proizvode s dodanom vrijednošću poput jestivih filmova, prevlaka i hidrogelova.

**Broj stranica: 27**

**Broj slika: 3**

**Broj tablica: 4**

**Broj literaturnih navoda: 37**

**Broj priloga: -**

**Jezik izvornika: hrvatski**

**Ključne riječi:** hidrogelovi, iskorištavanje sirutke, jestive prevlake, proteini sirutke

**Datum obrane:** 17. ožujak 2021.

#### Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof.v.š.
2. dr. sc. *Jasna Halambek*, v.pred.
3. dr.sc. *Marijana Blažić*, prof.v.š.
4. dr. sc. *Ines Cindrić*, prof.v.š. (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J. J. Strossmayera 9, 4700 Karlovac, Hrvatska.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional Study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### **WHEY UTILIZATION - ACHIEVEMENTS AND INNOVATIVE WAYS OF APPLICATION**

*Anamarija Antić*

**Final paper performed at the Department of Food technology of Karlovac University of Applied Sciences as part of the project "Modification of cheese ripening process and development of whey based products - SIRENA" (KK.01.1.1.04.0096).**

**Supervisor:** *Ph.D. Marijana Blažić, college prof.*

**Co-supervisor:** *Elizabeta Zandona, MSc in Bioprocess Engineering, Assistant*

#### **Abstract**

During cheese and casein production large amount of whey with high organic load are produced. Over the last decades, inadequate whey management and land disposal potantiet whey as a major environmental hazard. The introduction of strict regulations on environmental protection and waste management prioritized the development of more environmentally and economically efficient by-product management methods. Unwanted end products such as whey have become high-quality raw materials. Given the high nutritional value and functional properties of whey and its ingredients, innovative ways of application and exploitation of whey in various industries have been established. Sustainable whey management is mainly focused on biotechnological and nutritional methods of value-added product development such as whey powder, whey protein, functional foods and beverages, edible films and coatings, lactic acid, bioplastics, biofuels and similar valuable biological products.

This paper provides an overview of the possibilities of sustainable use of whey and its ingredients in food technology, taking into account new approaches to purification of whey ingredients and their conversion into value-added products such as edible films, coatings and hydrogels.

**Number of pages: 27**

**Number of figures: 3**

**Number of tables: 4**

**Number of references: 37**

**Original in:** Croatian

**Key words:** hydrogels, whey utilization, edible coatings, whey proteins

**Date of the final paper defense:** 17 March 2021

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Bojan Matijević*, collage prof.
2. Ph.D. *Jasna Halambek*, sen.lecturer
3. Ph.D. *Marijana Blažić*, collage prof.
4. Ph.D. *Ines Cindrić*, collage prof. (substitute)

**Final paper deposited in:** Library of Karlovac University of Applied Sciences, Trg J. J. Strossmayera 9, Karlovac, Croatia.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Sirutka .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Tipovi sirutke .....	2
2.1.1.1. Slatka sirutka.....	2
2.1.1.2. Kisela sirutka .....	3
2.1.2. Fizikalno kemijski sastav sirutke .....	3
2.1.3. Nutritivna vrijednost sirutke.....	4
2.1.4. Mogućnost iskorištavanja sirutke kao visokovrijednog nusproizvoda .....	5
<b>2.2. Sirutkini proteini .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Struktura i funkcionalnost sirutkinih proteina.....	7
2.2.1.1. $\beta$ -laktoglobulin.....	7
2.2.1.2. $\alpha$ -laktalbumin .....	7
2.2.1.3. Albumin krvnog seruma .....	7
2.2.1.4. Imunoglobulini.....	8
2.2.1.5. Laktoferin i laktoperoksidaza.....	8
2.2.2. Separacija sirutkinih proteina i proteinskih frakcija.....	8
2.2.3. Suhi pripravci sirutkinih proteina.....	10
2.2.3.1. Koncentrat proteina sirutke.....	11
2.2.3.2. Izolat proteina sirutke .....	11
2.2.3.3. Hidrolat proteina sirutke .....	11
<b>2.3. Primjena proteina sirutke u prehrambenoj industriji.....</b>	<b>12</b>
2.3.1. Funkcionalna hrana i nutraceutici .....	12
2.3.2. Emulgatori i stabilizatori .....	14
2.3.3. Jestivi filmovi i prevlake na bazi sirutkinih proteina .....	16
2.3.4. Hidrogelovi i nanočestice sirutkinih proteina .....	19
<b>3. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>23</b>
<b>4. LITERATURA.....</b>	<b>24</b>



## 1. UVOD

Sirutka je nusproizvod koji u velikoj količini nastaje tijekom proizvodnje sireva i/ili kazeina, a dugo se vremena smatrala otpadom te neadekvatno odlagala u prirodi (ispuštanje u sklopu otpadnih voda, odlaganje na poljoprivredna zemljišta i sl.). Takvo gospodarenje sirutkom predstavljalo je veliku ekološku opasnost uslijed visokog organskog opterećenja sirutke (Lappa i sur., 2019). Razvojem i unapređenjem tehnologije povećali su se i kapaciteti proizvodnje u prerađivačkoj industriji, posebice u prehrambenom sektoru, čime je porasla i količina nusproizvoda navedenih tehnologija (Čelik i Yuksel, 2016). Sve veća pozornost prema održivom gospodarenju otpadom i uvođenje strogih regulativa u području zaštite okoliša, dovelo je do istraživanja mogućnosti daljnje upotrebe nusprodukata i implemetacije održivih metoda gospodarenja nusproizvodima u proizvodne procese.

Sirutka zbog svog sastava ima veliki potencijal za daljnje ekonomično iskorištavanje u prehrambenoj, ali i drugim industrijama čime bi se potencijalno smanjila količina njenog odlaganja kao otpada u prirodi (Blažić i sur., 2018). Održivo gospodarenje sirutkom uglavnom je usmjereno na biotehnoške i prehrambene metode razvoja proizvoda s dodanom vrijednošću. Sirutkini proteini čiji udio u sirutki iznosi oko 0,6%, zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i funkcionalnog svojstva pokazuju najveći potencijal za daljnje iskorištavanje. Novim tehnološkim procesima mogu se proizvesti različiti prehrambeni proizvodi na bazi sirutkinih proteina od kojih su najznačajniji koncentрати i izolati proteina sirutke. Također, inovativni načini primjene sirutkinih proteina u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji prepoznati su u proizvodnji praha sirutke, proteina sirutke, funkcionalne hrane i pića, jestivih filmova i prevlaka, mliječne kiseline, bioplastike, biogoriva i sličnih vrijednih bioloških proizvoda.

U ovom radu obuhvaćena su dosadašnja saznanja o iskorištavanju sirutke i sirutkinih proteina, a svrha i cilj ovoga rada je sveobuhvatni pregled potencijalnih svojstava sirutke i sirutkinih proteina kao i mogućnosti njihovog inovativnog iskorištavanja u različitim granama industrije.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Sirutka

Sirutka je tekućina zeleno-žute boje koja zaostaje nakon koagulacije i odvajanja kazeina tijekom proizvodnje jogurta i sira (Chandrapala, 2018). Predstavlja oko 85–90% volumena mlijeka pri čemu zadržava približno 55% hranjivih sastojaka iz mlijeka, poput laktoze (~ 85%), proteina sirutke (~ 10%), minerala i masti (Blažić i sur., 2018). Suhe tvari sirutke uključuju laktozu, protein sirutke, mineralne tvari (kalij, natrij, magnezij), mliječnu mast te vitamin B čija količina ovisi o tehnološkim procesima i kvaliteti mlijeka. Sirutkini proteini najvrijedniji su sastojci sirutke, a obuhvaćaju  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, albumin krvnog seruma, imunoglobulin. Prilikom proizvodnje 1 kg sira izdvaja se oko 9 litara sirutke, a razvojem mliječne industrije količina proizvedene sirutke u svijetu povećava se svake godine za 1-2% (Çelik i Yuksel, 2016). Posljedično tome, sirutka je postala jednim od najvećih onečišćivača porijeklom iz mljekarske industrije. U 19. stoljeću sirutka se odlagala u prirodi bez prethodne obrade što je predstavljalo ekološku opasnost zbog visokog organskog opterećenja sirutke povezanog s visokim udjelom laktoze. Kemijska potrošnja kisika sirutke (KPK) iznosi 50 000-80 000 mg/l, dok biokemijska potrošnja kisika iznosi 40 000-60 000 mg/l (Lappa i sur., 2019) stoga je bilo važno pronaći adekvatna rješenja za preradu i iskorištavanje sirutke u različitim granama industrije.

#### 2.1.1. Tipovi sirutke

Ovisno o vrsti kazeina ili koaguliranog sira, zaostala sirutka može biti slatka ili kisela. Kisela i slatka sirutka razlikuju se po svom sastavu, što je posljedica različitih biokemijskih procesa u tehnologiji sira (tablica 1). Također, prilikom proizvodnje određenih vrsta sira, kao što su Cheddar i Colby, nastaje i sekundarni nusproizvod tzv. slana sirutka nastala prilikom soljenja sira. pH vrijednost slane sirutke iznosi 5,3, a industrijsko rješenje za preradu nije pronađeno.

##### 2.1.1.1. Slatka sirutka

Slatka sirutka nastaje prilikom proizvodnje tvrdih sireva tijekom koje se koagulacija kazeina postiže dodatkom enzima za koagulaciju ili mikrobnog sirila. pH vrijednost slatke sirutke iznosi 5,6, a ukupni udio proteina iznosi 6,5-6,6 g/l. Sadrži veću količinu masnoće, laktoze i proteina od kisele sirutke, a sadrži i važne vitamine kao što su tiamin (B1), niacin (B3), folna kiselina (B5), pantotenska kiselina (B5), riboflavin (B2), biotin (H), askorbinska kiselina (C) i cijanokobalamin

(B12) (Blažić i sur., 2018). Slatka sirutka proizvodi se u većoj količini naspram kisele sirutke, a zbog bogatog nutritivnog sastava ima veliki potencijal za daljnje iskorištavanje u prehrambenoj industriji. Stoga se najčešće u daljnjoj obradi kristalizira i suši raspršivanjem do praha sirutke koji se može koristiti u prehrambenoj industriji kao dodaci pri proizvodnji pekarskih proizvoda, hrane za djecu i dojenčad, dijetalnih proizvoda i slastica.

#### 2.1.1.2. Kiselá sirutka

Kiselá sirutka nastaje zakiseljavanjem mlijeka odnosno taloženjem kazeina tijekom proizvodnje svježih sireva kao što su Ricotta i Cottage ili grčkog jogurta. pH vrijednost kisele sirutke iznosi <5,1, sadrži manju količinu proteina od slatke sirutke (6,1-6,2 g/l), a veću količinu mliječne kiseline i kalcija koji ograničavaju određene korake u preradi. Kiselá sirutka ne može se preraditi u prah zbog higroskopskog svojstva mliječne kiseline te se zbog toga ona najčešće koristi kao gnojivo, a vrlo rijetko u prehrambene svrhe.

#### 2.1.2. Fizikalno kemijski sastav sirutke

Sirutka se može znatno razlikovati po svom kemijskom i fizikalnom sastavu što ovisi o tehnološkim procesima, vrsti i kvaliteti mlijeka. Primjerice, boja sirutke ovisi o kvaliteti i vrsti mlijeka te stoga ponekad može biti i plavkaste boje. Najveći udio sirutke 93% čini voda, a suha tvar iznosi oko 6%. Različite vrste sirutke sadrže komponente proteina, mliječnu kiselinu, laktozu, mineralne tvari i vitamin u različitim količinama (tablica 1). Tijekom prerade mlijeka 50% suhe tvari prelazi u sirutku, točnije 90% ugljikohidrata od kojih se najveći dio odnosi na laktozu, 80% mineralnih tvari i 60% vitamina topljivih u vodi (Matijević, 2018) te oko 0,6% proteina.  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin u usporedbi s kazeinom imaju veću topljivost u vodi i osjetljiviji su na toplinu zbog čega se jednostavno mogu taložiti (Papademas i Kotsaki, 2019).

**Tablica 1.** Sastav slatke, slane i kisele sirutke (Chandrapala, 2018).

Sastojak (%)	Slatka sirutka	Slana sirutka	Kisela sirutka
Ukupna suha tvar	6.2–6.8	21.9-22.4	5.5-5.9
Ukupno proteina	1.1-1.2	0.80-0.85	0.24-0.27
Laktoza	3.1-3.2	2.8-3.0	3.20-3.25
pH	5.38-5.42	5.31-5.32	4.52-4.55
Mliječna kiselina	0.25-0.28	0.28-0.31	0.55-0.57
Kalcij	0.059	0.072	0.132
Kalij	0.12	0.13	0.133
Magnezij	0.017	0.016	0.017
Natrij	0.025	0.07-0.1	0.021
Limunska kiselina	0.064	0.072	0.071
Anorganski fosfat	0.057	0.1	0.1
Ukupni fosfat	0.068	0.088	0.183

### 2.1.3. Nutritivna vrijednost sirutke

Sirutka ima visoku hranjivu vrijednost zadržavajući 55% hranjivih tvari mlijeka. Jedan od najvažnijih izvora energije je laktoza koja čini 70% sirutke, zbog čega njena kalorična vrijednost iznosi 26 kcal. Osim laktoze, jedan od visokovrijednih sastojka sirutke su sirutkini proteini čiji udio iznosi 0,6 %, a u koje spadaju  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, albumin krvnog seruma, imunoglobulin i albumin krvnog seruma. S obzirom da su oni bogati izvor esencijalnih aminokiselina razgranutog lanca, sirutkini proteini imaju važne hranjive i fiziološke vrijednosti te

se smatra da imaju povoljan utjecaj na tjelesne sustave poput probavnog, imunološkog, kardiovaskularnog i živčanog sustava. Također, utvrđeno je da imaju ulogu u sprječavanju mišićne atrofije, upravljaju sitošću i težinom, smanjuju infekcije te imaju antikancerogeni efekt (Çelik i Yuksel, 2016). Nutritivna vrijednost proteina sirutke iznosi oko 4 kcal što može varirati ovisno o udjelu aminokiselina koja se apsorbiraju u probavnom sustavu (Herceg i Režek, 2006). Sirutka također sadrži i minerale i vitamine čija je količina odraz tehnoloških procesa u kojima se izdvaja sirutka i kvalitete komponenti. Sirutka u prosjeku sadrži 5,00-7,90 g/l minerala u koje spadaju kalij, natrij, kalcij, magnezij, kloridi i fosfati; a koji imaju važnu ulogu u metabolizmu i regulaciji osmoze.

#### 2.1.4. Mogućnost iskorištavanja sirutke kao visokovrijednog nusproizvoda

Sirutka se dugo godina smatrala otpadnim materijalom, ali dosadašnja istraživanja pokazuju da se zbog njene nutritivne vrijednosti može koristiti u raznim industrijama. U prehrambenoj industriji sirutka se primjenjuje u proizvodnji različitih vrsta pića koja se mogu podijeliti na fermentirana, nefermentirana, alkoholna, dijetalna pića i napitke za sportaše. Osim toga, značajna količina sirutke se prerađuje u prah koji se uvelike koristi u prehrambenoj industriji za aromatiziranje. Izolacija komponenata sirutke i njihova daljnja primjena u prehrambenoj industriji također je česti način obrade ovog nusproizvoda. Sirutkini proteini zadržavaju vlagu i kontroliraju strukturu, stoga se koriste za proizvodnju različitih deserta, kao zgušnjivači juha, dodatak kod mesnih prerađevina i dječje hrane.

Zbog činjenice da sirutkini proteini sadrže esencijalne aminokiseline, bioaktivne peptide i antioksidanse, koriste se u prehrani za regulaciju bolesti uzrokovanih metaboličkom neravnotežom. Dijetalna prehrana koja sadrži sirutkine proteine odnosno laktoferin i  $\beta$ -laktoglobulin prevenira razvoj tumorskih stanica u probavnom traktu. Laktoferin i laktoperoksidaza potiču zaštitu kostiju te na taj način sprječavaju razvoj bolesti koštanog tkiva kao što je npr. osteoporoza. Brojnim kliničkim istraživanjima dokazano je da sirutka daje uspješne rezultate u liječenju raka, HIV-a, hepatitisa B i kardiovaskularnih bolesti (Çelik i Yuksel, 2016). Aminokiseline razgranatog lanca prisutne u sirutkinim proteinama kao što su leucin, izoleucin i valin imaju pozitivno djelovanje na metabolizam mišića sportaša. Stoga je jedan od načina iskorištavanja sirutke proizvodnja napitaka za sportaše. Napitci za sportaše na bazi sirutke utječu na sintezu i rast mišića, zbog činjenica da sirutkini proteini sadrže aminokiselinu cistein u strukturi.

Dosadašnja istraživanja dokazala su da organski otpad prehrambene industrije upotrebljen kao gnojivo pozitivno utječe na protok hranjivih tvari biljaka. Sirutka se može koristiti kao prirodno gnojivo s obzirom da njene komponente kao što su dušik, fosfor, sumpor, kalcij, natrij, magnezij, laktoza i proteini potiču rast biljaka (Grigoras i sur., 2012). Također, sirutka u poljoprivredi ima koristan učinak i protiv širenja različitih vrsta virusa na biljkama, što se pripisuje sirutkinim proteinima, no potrebna su još dodatna istraživanja kako bi se došlo do preciznih zaključaka (Çelik i Yuksel, 2016).

Zbog svojstva sirutkinih proteina da vežu vodu i stvaraju pjenu koriste se u kozmetičkoj industriji za proizvodnju hidratantnih krema za kožu, sapuna i losiona za bebe. Također, kozmetički proizvodi na bazi sirutke pokazali su se pogodnima za kožne bolesti kao što je dermatitis zbog kvalitetnih proteina u svome sastavu kao što je laktoferin, a koji ima protuupalna svojstva. Shimizu i suradnici (2005) ispitali su supresivnu učinkovitost dijeta na bazi hidrolata proteina sirutke (HPS) na atopični dermatitis te zaključili kako HPS djeluje antialergijski i protuupalno na kožne lezije.

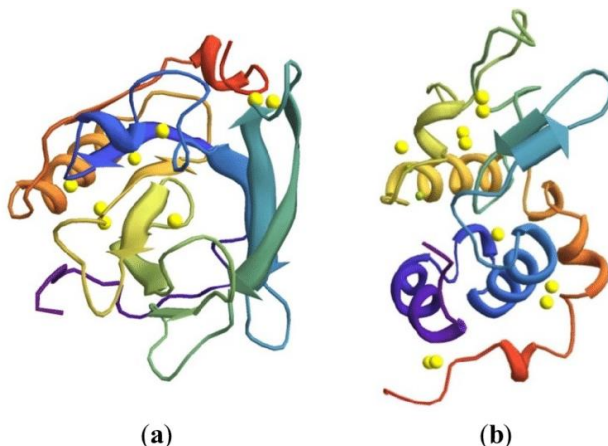
## **2.2. Sirutkini proteini**

Sirutkini proteini sastoje se od globularnih proteina koji se mogu izolirati iz siurtke, a to su  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, albumin krvnog seruma i imunoglobulin. Imaju manju strukturu od kazeina, ali zbog većeg udjela esencijalnih aminokiselina imaju značajno veću biološku vrijednost zbog čega se koriste u prehrambenoj industriji za povećanje nutritivne vrijednosti mliječnih, ali i drugih prehrambenih proizvoda. Također, važni proteini su laktoferin i laktoperoksidaza zbog njihovih antivirusnih i antimikrobnih svojstva, kojima se poboljšava zaštitni mehanizam organizma. Proteini sirutke izrazito su hidrofilni pa su u usporebi s kazeinom stabilniji na utjecaj kiseline ili enzima te zaostaju u sirutki nakon koagulacije kazeina. Također, proteini sirutke su termolabilni te denaturacija proteina započinje na temperature od 60 °C iako se koagulacija većine proteina sirutke očekuje pri zagrijavanju sirutke na 90–95 °C tijekom 10-20 minuta (Herceg i Režak, 2006).

## 2.2.1. Struktura i funkcionalnost sirutkinih proteina

### 2.2.1.1. $\beta$ -laktoglobulin

$\beta$ -laktoglobulin je glavni globularni protein koji čini 50% od ukupnih proteina sirutke, visoke je biološke vrijednosti jer sadrži 162 aminokiseline u peptidnom lancu. Molekularna masa iznosi 18,300 Da, unutar raspona pH 3,5 – 7,5 nalazi se kao dimer, a izvan njega kao monomer (slika 1). Osjetljivi su na toplinu te do denaturacije dolazi na 70-75 °C. Apsorbirani peptidi zbog antihipertenzivnog antioksidantnog, imunomodulirajućeg i antimikrobnog svojstva imaju značajnu ulogu u prevenciji zdravstvenih poteškoća (Papademas i Kotsaki, 2019).



**Slika 1.** Struktura  $\beta$ -laktoglobulina (a) i  $\alpha$ -laktalbumina (b) (Schmid, 2014).

### 2.2.1.2. $\alpha$ -laktalbumin

$\alpha$ -laktalbumin je mali protein koji čini oko 20% od ukupnih proteina sirutke. Molekularna masa iznosi 14 kDa, po strukturi je sličan lizosomu (slika 1), a sastoji se od 123 aminokiseline. Otporniji je na toplinu od  $\beta$ -laktoglobulina, veže metalne katione te sadrži triptofan koji ima ulogu u poboljšanju rada mozga. Ima antitumorsko djelovanje, baktericidni učinak u respiratornom sustavu i blagotvorno djeluje na želučanu sluznicu. (Tsutsumi, 2014) Također, podržava biosintezu laktoze te apsorpciju minerala.

### 2.2.1.3. Albumin krvnog seruma

Albumin krvnog seruma je heterogeni protein koji sadrži 582 ostataka aminokiselina, a čini oko 5% ukupnih proteina. Ima molekularnu masu od 66,26 kDa, a denaturira se na temperaturi od

64 °C. Zbog svoje veličine i strukture veže masne kiseline, lipide te spojeve koji daju okus. Izvor je glavnih esencijalnih aminokiselina čiji se potencijal još istražuje. (Gupta i Prakash, 2017). Također, ima sposobnost da stabilizira molekule tijekom utjecaja topline.

#### 2.2.1.4. Imunoglobulini

Imunoglobulini se pojavljuju kao polimeri ili protomeri sastavljeni od 4 polipeptidna lanca dok se monomeri sastoje od dva identična teška lanca. (Farrell i sur., 2004.) Čine 10 - 15% od ukupnih proteina sirutke odnosno njihova koncentracija u sirutki iznosi 0,7g/L. To su specifična antitijela koja imaju antimikrobna i antivirusna svojstva, zbog čega pozitivno utječu na pasivni imunitet.

#### 2.2.1.5. Laktoferin i laktoperoksidaza

Laktoferin je glikoprotein molekulske mase 80 kDa, a čini 1% ukupnih proteina sirutke. Neenzimski je antioksidant koji sadrži oko 689 aminokiselinskih ostataka. S obzirom da veže željezo posjeduje antimikrobna, antifirusna i antioksidativna svojstva zbog čega se smatra najvažnijim proteinom sirutke u biomedicinskom smislu.

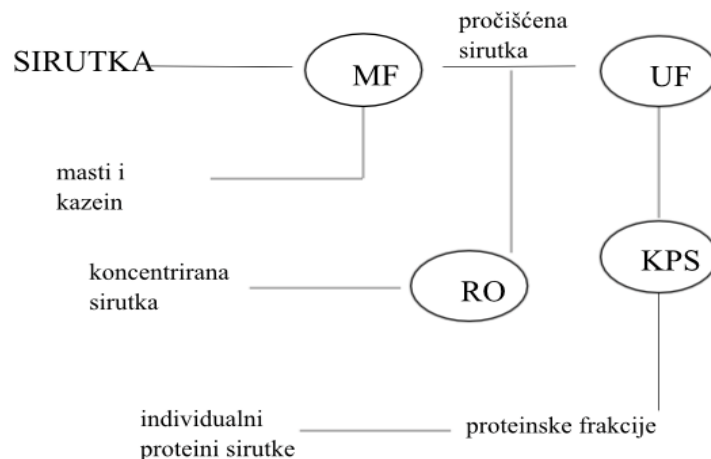
Laktoperoksidaza je enzim prisutan u sirutki, a koji čini oko 0.25-0.5% ukupnih proteina sirutke. Najzastupljeniji je enzim sirutke nakon procesa sirenja. Ima svojstvo da katalizira peroksidaciju tiocijanata i nekih halogenida te reducira udio vodikovog peroksida. Laktoperoksidaza ima značajnu biološka važnost jer sadrži antibakterijska svojstva (Gupta i Prakash, 2017).

### 2.2.2. Separacija sirutkinih proteina i proteinskih frakcija

Posljednjih godina povećao se komercijalni interes za zasebne proteine sirutke zbog njihovih važnih nutritivnih svojstva. Posljedično tome razvili su se postupci razdvajanja proteina sirutke od tekuće sirutke, a u koje spadaju selektivno taloženje inducirano prilagodbom fizikalnih svojstva otopine, membranska filtracija i selektivna adsorpcija. Selektivno taloženje i membranska filtracija su metode razdvajanja ovisne o volumenu tj. kapacitet opreme i troškovi proizvodnje proporcionalni su količini obrađene otopine, a ne masi dobivenog proizvoda dok je selektivna adsorpcija manje ovisna o volumenu jer kapacitet adsorbensa ovisi o masi proteina, a ne količini obrađene tekućine (Doulton i sur., 2004). Membranska tehnologija predstavlja proces separacije sastojaka različite molekularne veličine primjenom specifične polupropusne membrane i



hidrostatskog tlaka. Membranskom tehnologijom hranjive tvari sirutke koncentriraju se i frakcioniraju u izolat ili koncentrat sirutkinih proteina,  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin i laktozu. (Blažić i sur., 2018) Izolacija proteina sirutke primjenom membranske tehnologije ekološki je prihvatljiva, omogućuje koncentriranje i separaciju proteina sirutke u njihovom nenedenaturiranom obliku i pri tome nema utjecaja na senzorska svojstva. Ipak, glavni nedostatak predstavlja začepljenje membrane, zbog čega je iznimno važno provesti preobradu sirutke kemijskim i toplinskim tehnikama. Ovisno o veličini i obliku čestica te vrsti primjenjene membrane i hidrostatskom tlaku, razlikujemo više membranskih procesa - mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), nanofiltracija (NF) i reverzibilna osmoza (RO). Membrana za MF ima veće pore te propušta čestice veće od 100 nm zbog čega je potreban manji hidrostatski tlak, pogodna je za uklanjanje bakterija i masnoća iz sirutke, stoga često prethodi procesu UF. UF je proces frakcioniranja ili zadržavanja proteina molekularne mase između 10 000 – 50 000 Da dok se čestice manje mase poput laktoze i minerala propuštaju kroz polupropusnu membranu. Ultrafiltracijom se proizvode sve vrste koncentrata sirutkinih proteina koji mogu imati udio proteina 25-80% (de Wit, 2001), npr. koncentrat proteina sirutke (KPS) sa 34-90% udjela proteina (slika 2). Za dobivanje izolata proteina sirutke koji ima udio proteina veći od 90% potrebno je koncentrat proteina sirutke provesti kroz proces diafiltracije (DF) kojom se dodatno uklanja laktoza, a povećava udio proteina. Za odstranjivanje minerala iz sirutke uglavnom se primjenjuje NF, dok se RO koristi za ukljanjanje vode i koncentraciju proteina pod visokim hidrostatskim tlakom s obzirom da membrana ima manje pore. Individualni proteini sirutke, posebno  $\alpha$ -laktalbumin i  $\beta$ -laktoglobulin, odvajaju se nakon što se ultrafiltracijom dobije koncentrat proteina sirutke iz kojeg se zatim frakcioniraju individualni proteini.  $\beta$ -laktoglobulin odvojen kombinacijom procesa membranske filtracije i ionske izmjene pokazuje izvrsna svojstva stvaranja gelova i pjenjenja te se može koristiti kao sredstvo za stabiliziranje i teksturiranje mliječnih proizvoda dok  $\alpha$ -laktalbumin odvoje procesom ultrafiltracije i taloženja može koristiti umjesto bjelanjka i gelova s obzirom na svojstvo vezanja vode, stvaranja gelova i viskoznost (Akpınar-Bayzıt i sur., 2009).



**Slika 2.** Proces membranske filtracije odvajanja proteina sirutke (Akpinar-Bayzit i sur., 2009).

### 2.2.3. Suhi pripravci sirutkinih proteina

Sušenje je dio tehnološkog procesa dobivanja koncentrata i izolata proteina sirutke, a kojim se uklanjanja vlaga iz retantata s ciljem povećavanja njihove fizičke i mikrobiološke stabilnosti te se produžetka roka trajanja. Sirutkini proteini suše se postupcima sušenja s raspršivanjem (*eng. Spray Drying*) i sušenja smrzavanjem (*eng. Freeze drying*) koji se moraju kontrolirati i optimizirati kako bi se zadržala hranjiva vrijednost proteina.

*Spray Drying* iznimno je brzi proces koji se odvija u dvije faze; koncentracija krutina i sušenje u komorama, a kojim se dobivaju koncentрати i izolati proteina sirutke. Proteini se pomoću raspršivača raspršuju u komore za sušenje, a vrući zrak istovremeno struji uklanjajući vlagu iz proteina (Sabarez, 2016). Istraživanja pokazuju da se tekući retentate suši sa ulaznom temperaturom od 210°C i izlaznom temperaturom od 90°C (Carter i sur.,2018.) Proces može uzrokovati neke funkcionalne gubitke proteina te agregaciju i denaturaciju.

Kod *Freeze drying* procesa, proteini se raspršuju u hladnom mediju, odnosno tekući retentat se prvo zamrzava zatim suši sublimacijom leda pod smanjenim tlakom. Ovaj proces smatra se najboljom metodom proizvodnje visoko kvalitetnih sušenih proizvoda, a koristi se za sušenje osjetljivih materijala koji se mogu oštetiti procesom sušenja s raspršivanjem zbog njihove osjetljivosti na visoke temperature, no glavni nedostatak sušenja smrzavanjem je visoka energetska potrošnja (Sabarez, 2016).

#### 2.2.3.1. Koncentrat proteina sirutke

Koncentrat proteina sirutke (KPS) je prah koji se dobiva ultrafiltracijom odnosno procesom sušenja retantata, a koji sadrži do 60% proteina sirutke u suhoj tvari dok se veći udio do 80% postiže diafiltracijom. KPS sadrži različite povoljne bioaktivne lipide te manju razinu masti i kolesterola u usporedbi s izolatom proteina sirutke. S obzirom na koncentraciju proteina KPS se dijeli na koncentrat s malim sadržajem proteina (25-40% ukupne krute tvari), KPS sa srednjim sadržajem proteina (45-60%), KPS s visokim sadržajem proteina (60-80%) (Blažić i sur., 2018). KPS 35 se obično koristi kao zamjena za obrano mlijeko s obzirom da imaju sličan sastav odnosno udio laktoze, minerala i masti te kao stabilizator. Kapacitet prahova za vezanje vode raste s povećanjem ukupne čvrste tvari zbog čega se KPS 50 i 80 najčešće koriste u proizvodnji juha, pića, pekarskih proizvoda itd. (Chandrapala, 2018).

#### 2.2.3.2. Izolat proteina sirutke

Izolat proteina sirutke sadrži veći postotak proteina u suhoj tvari, više od 90%, prema čemu se i razlikuje od koncentrata proteina sirutke. Proizvodnja izolata može se odvijati kroz dva procesa, a to su ionska izmjena te mikrofiltracija oba praćena sušenjem raspršivanjem. Njihova prednost je u većem udjelu proteina, a manjem laktoze, masti i pepela. Izolati proteina sirutke upotrebljavaju se u namirnicama gdje odlučujuću ulogu imaju čvrstoća gela, viskoznost, vezanje vode i topljivost, pri čemu izolati mogu značajno poboljšati okus i teksturu gotovog proizvoda stoga se dodaju desertima, pićima i sladoledima (Herceg i Režek, 2006).

#### 2.2.3.3. Hidrolat proteina sirutke

Hidrolat proteina sirutke (HPS) dobiva se hidrolizom proteina sirutke uz djelovanje enzima, a njihov udio proteina iznosi oko 70-80%. Tijekom hidrolize proteini se razgrađuju na peptide i slobodne aminokiseline čije su veze prekinute utjecajem enzima zbog čega dolazi do brže apsorpcije hidrolata proteina sirutke u tijelu. HPS ima široku primjenu u proizvodnji pića i funkcionalne hrane s obzirom na povećane zdravstvene koristi povezane s bioaktivnim peptidima i smanjene alergnosti na protein zbog čega se, također, koristi u prehrani novorođenčadi koja su intolerantna na kravlje mlijeko (Chandrapala, 2018).

## 2.3. Primjena proteina sirutke u prehrambenoj industriji

Sirutkini proteini zbog svojih funkcionalnih svojstva i nutritivne vrijednosti imaju široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao funkcionalna hrana te u medicini kao različiti oblici nutraceutika. U posljednje vrijeme osim funkcionalnih vrijednosti, posebno se ističu i njihove tehnološka svojstva (geliranje, emulgiranje, vezanje vode, pjenjenje), stoga se pažnja usmjerava i na njihovu primjenu u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji za proizvodnju mliječne kiseline, bioplastike, biogoriva i sličnih vrijednih bioloških proizvoda, jestivih filmova, prevlaka, hidrogelova.

### 2.3.1. Funkcionalna hrana i nutraceutici

Funkcionalnu hranu ili nutraceutike predstavljaju uglavnom biokativni proteini, probiotici i prebiotici (de Wit, 2001). Budući da sirutkini proteini sadrže široki spektar bioaktivih peptida koji imaju potencijalni pozitivan učinak na zdravlje, smatra se da se mogu primjenjivati kao nutraceutici, odnosno kao tvari koje su hrana ili dio hrane, a pružaju medicinske ili zdravstvene pogodnosti uključujući prevenciju ili liječenje bolesti (Čalić i sur., 2011). Već je Hipokrat smatrao da sirutka ima zdravstvene pogodnosti dok se u srednjem vijeku koristila kao lijek za razne bolesti te kao balsam za kožu i opekline. Dosad je utvrđeno da sirutkini proteini imaju protuupalna, antibakterijska i antivirusna svojstva, potiču razvoj imuniteta, pozitivno utječu na kardiovaskularno zdravlje i fizičku spremnost. Također mogu pozitivno djelovati na zaražtanje ozlijeda i razvoj kostiju. Unosom sirutkinih peptida ( $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin i laktoferin) u organizam povećava se proizvodnja glutaciona, a time posljedično pojačava rad imunološkog sustava koji štiti organizam od stranih mikroorganizama poput bakterija, parazita i virusa. (Khaire i Gogate, 2019). Komponente sirutke kao što su imunoglobulini, laktoferin, laktofericin, laktoperoksidaza i glikomakropeptid štite organizam od bakterija, virusa i toksina. Laktoferin kontrolira raznoliki raspon mikroorganizma, odnosno zbog njegove sposobnosti da veže željezo sprječava rast štetnih patogenih bakterija (*Escherichia. coli* i *Listeria monocytogenes*) kojima je ono potrebno za razvoj, a podržava razvoj korisnih bakterija (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*) čime sudjeluje u uspostavljanju ravnoteže normalne bakterijske crijevne i vaginalne mikroflore te prevenciji probavnih bolesti. Laktoferin također djeluje antivirusno na virus humane imunodeficijencije, citomegalovirus, herpes, hepatitis C i B, humani papiloma virus sprječavajući njihovu replikaciju i prijanjanje na epitelne stanice debelog crijeva. Osim toga, sirutkini proteini

blagotvorno djeluju na želučanu sluznicu zbog prisutnosti sulfhidrilne skupine u aminokiselini cistein koja zajedno s glutaminskom kiselinom sudjeluje u proizvodnji glutaciona koji je važan antioksidans. Imunoglobulini u crijevnom traktu imaju antimikrobna svojstva tako što se vežu za toksine čime se smanjuje proljev, dehidracija i bolovi u mišićima. Unosom sirutkinih proteina može se smanjiti krvni tlak i rizik od hipertenzije, a pozitivno utječu i na vaskularno funkcioniranje kod pretilih osoba. Mnoga istraživanja pretpostavila su da određeni bioaktivni peptidi formirani hidrolizom proteina, imaju sposobnost inhibirati angiotenzin-konvertirajući enzim (ACE inhibitori) koji se koriste za liječenje hipertenzije odnosno povišenog krvnog tlaka (Tsutsumi, 2014) Implementacijom koncentrata sirutkinih proteina u prehranu smanjuje se količina triglicerida u krvi dok implementacija hidrolata smanjuje kolesterol zbog čega se njihovo korištenje preporuča u svrhu reduciranja rizika od srčanih bolesti. Sirutkini proteini koriste se za upravljanje težinom s obzirom da reduciraju količinu glukoze u krvi. Također, održavaju mišićnu masu, pojačavaju oslobađanje hormona sitosti i inzulina, a smanjuju lučenje hormona gladi stoga se njihov unos preporuča osobama s dijabetesom. Aminokiseline razgranutog lanca prisutne u sirutkinim proteinima metaboliziraju se izravno u mišićno tkivo te ga obnavljaju dok esencijalna aminokiselina leucin potiče sintezu mišićnih proteina i mišićni rast što pokazuje da sirutkini proteini imaju značajnu nutritivnu vrijednost za sportaše. Također, sirutkini proteini bogati su aminokiselinama argininom i lizinom koji potiču lučenje hormona rasta koji je stimulant za mišićni rast (Solak i Akin, 2012). Antikancerogeno djelovanje sirutkinih proteina povezuje se s njihovim sadržajem aminokiselina koje sadrže sumpor kao što su cistein i metionin, a koji sudjeluju u sintezi glutaciona. Glutacion je supstrat za dvije klase enzima koji kataliziraju detoksikacijske spojeve te veže mutagene i kancerogene olakšavajući tako njihovu eliminaciju iz tijela (Gupta i Prakash, 2017). Konzumacija sirutkinih proteina pokazala se najučinkovitijom za prevenciju odnosno umanjavanje rizika od razvoja raka debelog crijeva, tome pridonosi i činjenica da laktoferin veže željezo čime se inducira apoptoza odnosno programirana stanična smrt (Gupta i Prakash, 2017). Uz to, laktoferin povećava diferencijaciju osteoblasta i formira novu koštanu konstrukciju sprječavajući raspadanje kostiju, također terapijski djeluje na bolesti koštanog tkiva kao što je osteoporozna (Solak i Akin, 2012). Sirutkini proteini mogu se koristiti u terapijske svrhe s obzirom da su lako probavljivi i imaju visoku nutritivnu vrijednost potrebnu oboljelim osobama koje imaju poteškoća s apetitom i mučninom, stoga se dijete na bazi sirutke preporučaju trudnicama

koje imaju povećanu potrebu za unosom proteina, ali i osobama koje su imali različite kirurške zahvate u svrhu bržeg cijeljenja rana.

### 2.3.2. Emulgatori i stabilizatori

Koncentrati i izolati sirutkinih proteina zbog svoje iznimne hranjive vrijednosti imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji, osobito u proizvodnji mliječnih i pekarskih proizvoda, ribe i mesa, proizvoda za dojenčad te dijabetičkih mliječnih proizvoda. Dodatak sirutkinih proteina može povećati nutritivnu vrijednost različitih prehrambenih proizvoda, a zbog funkcionalnih svojstva kao što su geliranje, emulgiranje, kapacitet vezanja vode, viskoznost i pjenjenje, mogu iskoristiti u formulaciji različitih proizvoda (meso, mliječni proizvodi, pekarski proizvodi, sokovi itd.) s obzirom da utječu na konzistenciju namirnica i njenu stabilnost (Kumar i sur., 2018). Sirutkini proteini imaju sposobnost formirati emulziju tako što stvaraju membranu oko lipida sprječavajući time stvaranje kreme, izljevanje ulja, koalescenciju i flokulaciju. Kapacitet emulgiranja ovisi o topljivosti, što je topljivost veća to će kapacitet emulgiranja biti veći, stoga će on biti najveći kod što manje denaturiranih proteina. Pjenjenje nastaje mješanjem sirutkinih proteina u vodi uz prisutnost zraka, kapacitet pjenjena ovisi o udjelu proteina, iona i masti, a može se povećati smanjenjem udjela masti. Zagrijavanjem sirutkinih proteina pri posebnim uvjetima (pH vrijednosti iznad 7) nastaju elastični gelovi koji se mogu dodavati raznim prehrambenim proizvodima kako bi se povećala njihova nutritivna vrijednost.

U mlijekarstvu se sirutkini proteini najčešće koriste za proizvodnju sladoleda, jogurta i čokoladnih napitaka. Sirutka u prahu, koncentrati i izolati sirutkinih proteina mogu se koristiti u proizvodnji sladoleda mjenjajući obrano mlijeko u prahu, no najbolji učinak pokazuje koncentrat (s udjelom proteina više od 80%) s obzirom da iznimno povećava viskoznost, otpornost na topljenje te smanjuje vrijeme smrzavanja. Istraživanja su pokazala da se najbolja tekstura sladoleda dobiva kombinacijom obranog mlijeka u prahu i koncentrata proteina sirutke u omjeru 1:1, a pogodnosti korištenja sirutkinih proteina u proizvodnji sladoleda prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Funkcionalna svojstva sirutke i koristi od upotrebe sirutke u proizvodnji sladoleda i slastica (Krolczyk i sur.,2016)

Funkcija	Utjecaj	Korist
Viskoznost	Zbijanje	Stabiliziranje mjehurića zraka, kremasta struktura
Želiranje	Formiranje gela	otpornost na visoke temperature, poboljšanje strukture
Emulzija	Stvaranje stabilne emulzije	Djelomična zamjena kazeina
Okus i aroma	Blag, sladak, mliječni okus	Kompaktibilno s aditivima za miješanje

U proizvodnji jogurta slatka sirutka u prahu može zamijeniti 2-5 % ukupnog udjela obranog mlijeka u prahu, koncentrat proteina sirutke 2 %, dok veći postoci mogu rezultirati negativnim promjenama u okusu i aromi jogurta. Dodavanjem sirutke u prahu tijekom proizvodnje povećava se stabilnost i viskoznost čime se uspostavlja čvrsta teksturu jogurta, povećava se nutritivna vrijednost, sprječava sinereza odnosno odvajanje masti ili popuštanje gela te mijenja aroma, no dodavanjem koncentrata povećava se elastičnost i sposobnost zadržavanja vode. Također, sirutkini proteini mogu se koristiti u proizvodnji sireva ili dodavati mlijeku s manje masnoće kako bi se poboljšao okus i aroma s većim brojem proteina. Istraživanja su pokazala da se dodavanjem 1 % koncentrata sirutkinih proteina mlijeku prije zagrijavanja, udvostručuje krutost kiselih gelova, povećava udio proteina, smanjuje udio masti (Chandrajith i sur., 2018).

Budući da sirutka u prahu ima poželjna funkcionalna svojstva i hranjivu vrijednost (veliki udio laktoze), ona se može koristiti umjesto obranog mlijeka u prahu za proizvodnju pekarskih proizvoda. Miješanjem sirutke u prahu i emulgatora u brašnu postiže se duža svježina kruha, veća

hrskavost, stabilnost te volumen kruha. Pekarski proizvodi bogati su ugljikohidratima, a manjka im proteina. Kako bi se taj omjer reducirao, sirutka u prahu ili koncentrat proteina sirutke kombinara se s umjetnim zaslađivačima tijekom proizvodnje. Koncentrat sirutkinih proteina (80 % proteina) sadrži veliki broj istih funkcionalnih svojstva kao jaja stoga se može koristiti kao zamjena za bjelanjak ili općenito jaja prilikom proizvodnje kruha, kolača i muffina. Dokazano je da zamjena bjelanjka s koncentratom sirutke ili sirutkom u prahu utječe na boju proizvoda te kontrolira gubitak vlage tijekom pečenja i poboljšava struktura čime nastaju kvalitetni kolači s prihvatljivim rokom trajanja.

Koncentrati i izolati sirutkinih proteina koriste se u proizvodnji mesnih proizvoda od usitnjenog mesa (šunke, kobasice, mortadele, mesni doručak i slično) u svrhu stabilizacije istih te modifikacije udjela masti. Zbog sposobnost sirutkinih proteina da vežu vodu, sprječava se trošenje mase tijekom termičke obrade i skladištenja proizvoda, također povećava se sočnost konačnog proizvoda te olakšava rezanje hladnih mesnih proizvoda na kriške (Krolczyk i sur., 2016). Koncentrat sirutkinih proteina koristi se u proizvodnji mesnih emulzija odnosno umaka, najčešće su to kiseli umaci i juhe s obzirom da koncentrat veže vodu tijekom zagrijavanja te ima svojstvo topljivosti u kiselinama, a u kombinaciji s kazeinom dodatno poboljšava gustoću juhe.

### 2.3.3. Jestivi filmovi i prevlake na bazi sirutkinih proteina

Jestivi filmovi su tanki slojevi jestivog materijala koji se nanose na površinu hrane procesima ručnog premazivanja, prskanja, omotavanja, potapanja ili procesom rotirajuće posude, a glavna uloga im je očuvati kvalitetu i poboljšati izgled hrane. Oni osiguravaju barijeru između okoline i hrane čime kontroliraju prijenos različitih spojeva (ulje, plinove, aromu) te povećavaju rok trajanja proizvoda, a istovremeno ih potrošači mogu konzumirati s obzirom da su probavljivi u ljudskom traktu i biorazgradivi u prirodi. Jestive prevlake su tanji jestivi filmovi koje se nanose na površinu hrane procesom umakanja ili prskanja čime se učvršćuje integritet proizvoda, dok su filmovi sami po sebi čvršći i deblji (0.050-0.250 mm) pa se koriste u proizvodnji vrećica, kapsula i omota.

Primjeri jestivih filmova u prehrambenoj industriji su prirodni ovitci za kobasice, čokoladne ili šećerne glazure za bombone i kolače te voskovi za voće. Prednosti primjene istih su relativno niski troškovi, smanjuje se udio otpadnog materijala, mogu poboljšati nutritivna svojstva proizvoda te se mogu koristiti unutar heterogene hrane s obzirom da filmovi čine barijeru između



komponenti hrane (Galić, 2009). Navedeni filmovi uglavnom su načinjeni od biopolimera dobivenih izdvajanjem iz biomase, točnije od proteina, polisaharida ili lipida. Biopolimeri na bazi proteina smatraju se najkompetentnijima s obzirom da imaju izvrsna svojstva plinskih barijera. Polisaharidi su lako dostupni, netoksični i termički obradivi, no glavni nedostatak im je što su hidrofilni zbog čega polisaharidni filmovi poput pektina, škrobi i celuloznih derivata predstavljaju slabu barijeru za vlagu dok suprotno njima lipidi imaju hidrofobna svojstva stoga su lipidni filmovi kvalitetna barijera za vlagu. Također, lipidni filmovi zapravo se koriste kao jestive prevlake zbog smanjenog svojstva elastičnosti.

**Tablica 3.** Prirodni plastifikatori koji se koriste u jestivim filmovima i prevlakama na bazi proteina (Chen i sur., 2019).

Materijali za izradu filmova	Plastifikatori
Zein	Oleinska, linolenska kiselina
Sirutkini proteini	Sorbitol, glicin
Pšenični gluten	Glicerol, zasićene masne kiseline
Kazein	Voda i sorbitol
Želatina	Saharoza, oleinska kiselina, sorbitol, limunska i vinska kiselina
Goveđa želatina	Sorbitol, glicin, masne kiseline

Formiranje filmova na bazi sirutkih proteina započinje procesom geliranja. Destabilizacija topljivih proteina sirutke postiže se dodavanjem kemikalija, hlađenjem, zagrijavanjem ili djelomičnom enzimskom hidrolizom čime dolazi do odmatanja proteina odnosno promjene trodimenzionalne strukture i agregatskog stanja proteina te posljedično do formiranja gleova sirutkih proteina iz kojih se dobivaju proteinski filmovi procesom dehidracije. Tijekom prevlačenja hrane polimernim filmovima prisutne su sile kohezije i adhezije čije će jačine ovisiti o strukturi i kemijskoj građi polimera, odnosno uređenosti polimernog lanca. Kako bi se

uspostavila otpornost na pucanje i povećala fleksibilnost, jestivim filmovima i prevlakama na bazi sirutke dodaju se plastifikatori koji smanjuju intermolekularne sile u polimernom lancu te povećavaju pokretljivost lanca čime se pojačava konstrukcija filmova. Tako se polisaharidi i lipidi dodaju za pojačavanje svojstva barijere, plastifikatori za pojačavanje svojstva elastičnosti, a emulgatori za stabilnost emulzije (Ramos i sur., 2012). Plastifikatori su različiti za pojedine filmove na bazi proteina (tablica 3), a kako bi bili funkcionalni moraju biti kompatibilni s polimerom i lako topljivi u otapalu u kojem se priprema jestivi film ili prevlaka.

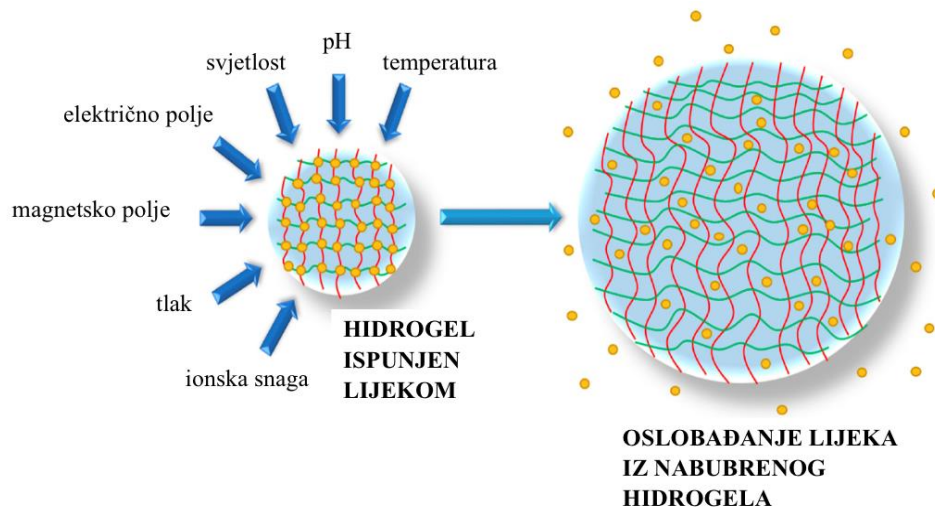
Jestivi filmovi i prevlake na bazi sirutkinih proteina dobra su barijera za kisik, aromu i ulje. Nepropusnost jestivih filmova za kisik povećava rok trajanja i početnu kvalitetu proizvoda jer sprječava oksidaciju sastojaka i gubitak nutritivne vrijednosti. Zbog hidrofilnog karaktera sirutkinih proteina jestivi filmovi i prevlake nisu dobra barijera za vlagu, što se može se regulirati dodatkom lipida koji će povećati hidrofobna svojstva filmova.

U prehrambenoj industriji filmovi i prevlake na bazi sirutkini proteina koriste se u svrhu produljenja roka trajanja i za zaštitu proizvoda poput jaja, orašastih plodova, mesa, ribe, voća i povrća. Kako bi se postigla željena svojstva pojedinog filma ili prevlake (barijerna, antimikrobna, i sl.), provedena su brojna istraživanja vezana uz dodatak različitih stabilizatora, plastifikatora, ovisno o vrsti proizvoda i željenim svojstvima filma ili prevlake na bazi sirutkinih proteina. Khan i sur. (2015) ispitali su kako prevlake na bazi sirutkinih proteina, uz plastifikatore sorbitol i glicerol, utječu na očuvanje kvalitete i oksidacijsku stabilnost ribljih fileta. Prevlake su se nanosile na filete procesom umakanja nakon čega su se sušili na sobnoj temperaturi. Uzorci s prevlakom i bez prevlake zamrzli su se na temperaturi od -18 °C, a analizom se ustanovilo da prevlake na bazi sirutkinih proteina štite riblje filete od oksidativnog i mikrobiološkog kvarenja čime se ujedino povećava njihov rok trajanja i kvaliteta. Orašasti plodovi osjetljivi su na oksidaciju lipida te brzo oksidiraju kada su izloženi kisku čime postaju neprihvatljivi za konzumiranje. Utvrđeno je da su filmovi i prevlake na bazi proteina dobra barijera za kisik kod orašastih plodova. Također produljuju rok trajanja jaja tako što reduciraju gubitak vode i ugljikovog dioksida kroz ljusku. Filmovi i prevlake na bazi sirutke uslijed svojih antimikrobnih svojstava mogu se koristiti i kao dodatni zaštitni sloj za gotove mesne proizvode poput dimljenog lososa i kobasica u svrhu sprječavanja razvoja bakterija *Escherichia coli* i *Salmonella enterica* (Jooyandeh, 2011). Ramos i sur. (2012) ispitali su kako prevlake na bazi izolata sirutkinih proteina s dodatkom antimikrobnih spojeva (natamicin, mliječna kiselina, hito-oligosaharidi) utječu na rok trajanja sireva. Zaključili

su da se prekrivanjem sireva jestivim prevlakama smanjuje gubitak vode, tvrdoća i promjena boje, a da prevlake sprječavaju mikrobiološko onečišćenje sira te rast patogenih mikroorganizama, dok omogućavaju rast bakterija mliječne kiseline u sirevima. Sogut i sur. (2019) ispitali su svojstva filmova na bazi izolata proteina sirutke i karagenana pomiješanih s uljem sjemenki nara s obzirom da pomiješani filmovi na bazi polimera s aktivnim sredstvom mogu imati bolja mehanička svojstva od samostalnih filmova na biološkoj osnovi. Izolati proteina sirutke imaju dobro svojstvo stvaranja barijere za kisik te funkcionalna svojstva kao što su emulgiranje, pjenjenje i stvaranje gelova, no imaju relativno smanjeno svojstvo stvaranja barijera za vlagu i niska mehanička svojstva stoga ulje sjemenki nara može djelovati kao zamjena za sintetička antioksidativna i antimikrobna sredstva za postizanje oksidativne i mikrobiološke stabilnosti. Istraživanjem su zaključili da filmovi nastali miješanjem IPS i karagenana s uljem sjemenki nara pokazuju svojstva manje propusnosti vodene pare, veći kapacitet istezljivosti filmova te plastificiranja.

#### 2.3.4. Hidrogelovi i nanočestice sirutkinih proteina

Hidrogelovi su hidrofilne trodimenzionalne mreže polimernih lanaca koji imaju sposobnost apsorbirati vodu ili biološku tekućinu i zadržati ih unutar pora, porozni su te meke konzistencije stoga se mogu koristiti kao biosenzori, sustavi za isporuku lijekova, nosači za stanice u tkivnom inženjstvu, u proizvodnji kontaktnih leća, obloga za rane i higijenske proizvode. Hidrogelovi mogu biti prirodni ili sintetički, a pod utjecajem kemijskih i fizikalnih svojstva odnosno promjenama uvjeta okoline (pH, temperature, tlak, ionska snaga) bubre te oslobađaju prethodno ugrađene spojeve npr. lijekove omogućujući organizmu potrebnu količinu lijekova (slika 3). Sposobnost bubrenja nanohidrogelova pripisuje se prisutnosti hidrofilnih komponenti odnosno hidroksilnih, amino i karboksilnih skupina. Zbog sposobnosti hidrogela da upijaju vodu i kompaktilnosti s ljudskim tkivom u pore mrežaste strukture mogu se ugraditi razne molekule od lijekova, vitamina pa tako i tkiva što je iznimno korisno za prekrivanje rana na koži kako bi one što prije zacijelile (Petrovčić i sur., 2011).



**Slika 3.** Oticanje hidrogela za isporuku lijekova pod utjecajem kemijskih i fizikalnih podražaja. Crvene i žute predstavljaju isprepletenu strukturu matriksa, a žute točke molekule lijeka (Harrison i Spada, 2018).

Proteini sirutke mogu se oblikovati u hidrogelove, nanofibrile i nanocijevi te se koriste kao nosači bioaktivnih spojeva. Proteinski hidrogelovi mogu se dobiti različitim tehnikama, najčešće tehnikom fizikalnog ili kemijskog geliranja  $\beta$ -laktoglobulina i izolata proteina sirutke (tablica 4). Najčešća metoda geliranja je ipak termičko geliranje tijekom kojeg se proteini pod utjecajem topline odmotavaju te ovisno o ravnoteži sila adhezije i kohezije odvajaju kao zasebne denaturirane molekule ili formiraju fibrilarne i čestične agregate. Temperatura potrebna za denaturaciju proteina iznosi 60-90 °C, a vrijeme zagrijavanja 10-60 minuta (Ramos i sur., 2017). Nakon zagrijavanja slijedi proces agregacije kojim se formiraju trodimenzionalne mreže.

Sirutkini proteini mogu se koristiti kao hidrogelovi i sustavi nanočestica za inkapsulaciju te kontroliranu isporuku bioaktivnih spojeva, a prednosti upotrebe gelova na bazi sirutkinih proteina u te svrhe je što su u potpunosti biorazgradivi i nema potrebe za kemijskim sredstvima umrežavanja u njihovoj pripremi što su dva osnovna zahtjeva za hidrogelova u farmaceutskoj i prehrambenoj primjeni (Gunasekaran i sur., 2005).

**Tablica 4.** Nanosustavi proteina sirutke i njihove karakteristike (Ramos i sur., 2017).

Struktura	materijal	Tehnika	Primjena
Hidrogelovi	$\alpha$ -laktalbumin	toplinsko geliranje	Strukturiranje
	$\beta$ -laktoglobulin $\alpha$ -laktalbumin	zagrijavanje i hladno geliranje	Strukturiranje
	IPS	zagrijavanje i visoki tlak	Strukturiranje
	KPS	zagrijavanje i prilagođavanje pH	inkapsulacija/ isporuka
	$\beta$ -laktoglobulin	Zagrijavanje	inkapsulacija/ isporuka

Farmaceutska i prehrambena industrija pokazale su veliki interes za nanočestice proteina sirutke s obzirom da se jednostavno pripremaju, zbog svojstva geliranja proteina i mogućnosti nadzora raspodjele veličina. Nanočestice proteina sirutke dobivaju se umreživanjem denaturiranih proteina sirutke pri niskim temperaturama tijekom pH-ciklusa. Giroux i sur. (2010) proizveli su nanočestice u rasponu od 100-300 nm, a čija veličina proporcionalno raste s iznosom pH agregacije, dodanom koncentracijom kalcija i vremenom starenja pri agregacijskom pH. Izolati proteina sirutke mogu se formirati u nanočestice s obzirom da sadrže  $\beta$ -laktoglobulin i  $\alpha$ -laktalbumin koji imaju sposobnosti stvaranja zaštitinih filmova. Također, izolati proteina sirutka istaknuli su se kao najučinkovitije sredstvo za inkapsulaciju hidrofobnih bioaktivnih spojeva zbog svojih povoljnih svojstva emulgiranja i geliranja. Khan i sur. (2019) istražili su učinkovitosti nanočestica izolata proteina sirutke kao sredstva za inkapsulaciju 3,3'-diindolilmetana (DIM). DIM je bioaktivna komponenta prisutna u povrću, a koji ima biološke i farmakološke prednosti kao što antioksidantni, antikancerogeni i protuupalni učinci, no hidrofobno svojstvo ograničava njegovu farmaceutsku primjenu. Istraživanjem su zaključili kako nanočestice izolata proteina

sirotke razvijene u svrhu inkapsulacije DIM-a unaprijeđuju fizikalno-kemijska svojstva te pružaju zaštitu i stabilnost tijekom skladištenja. Soliman i Hassan (2018) ispitali su učinkovitost nanočestica izolata proteina sirotke za inkapsulaciju, odnosno zadržavanje i oslobađanje mikronutrijenta citrata cinka. Istraživanjem su zaključili kako nanočestice izolata proteina sirotke uspješno inkapsuliraju i štite cink (učinkovitost inkapsulacije 99.79-96.31%) koji se oslobađa iz nanočestica u kiselim medijima pH 1.2 te time dokazali učinkovitost primjene IPS u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju dosad objavljenih publikacija u području proizvodnje i primjene proteina sirutke u prehrambenoj industriji može se zaključiti sljedeće:

1. Sirutka i sastojci sirutke izvrsna su baza za razvoj novih proizvoda te imaju veliki potencijal za daljnje ekonomično iskorištavanje čime bi se potencijalno smanjila količina nusproizvoda mljekarske industrije.
2. Dodatak sirutkinih proteina može povećati nutritivnu vrijednost različitih prehrambenih proizvoda, a obzirom da sadrže i široki spektar bioaktivih peptida smatra se da imaju pozitivan učinak na zdravlje, stoga se često koriste kao nutraceutici i/ili funkcionalna hrana.
3. Zbog dobrih funkcionalnih svojstva pogodni su za formulaciju različitih proizvoda poput jestivih filmova i prevlaka, biorazgradivih hidrogelova ili nanočestica za inkapsulaciju i prijenos bioaktivnih spojeva. Biorazgradivi filmovi su "zelena" alternativa tradicionalnoj plastici stoga primjena sirutkinih proteina u njihovoj proizvodnji pomaže u kontroli zagađenja okoliša.
4. Filmovi na bazi sirutkinih proteina dobra su barijera za kisik, sprječavaju oksidaciju sastojaka i gubitak nutritivne vrijednosti čime je očuvana kvaliteta proizvoda i produžen rok trajanja. Zbog hidrofilnog karaktera sirutkinih proteina takvi filmovi nisu dobra barijera za vlagu što se regulira dodatkom različitih stabilizatora i plastifikatora.
5. Obzirom na veliki potencijal sirutke daljni napredak trebao bi težiti razvoju integriranih procesa i sustava za učinkovitije iskorištavanje sirutke, sirutkinih proteina, ali i ostalih komponenata sirutke.

#### 4. LITERATURA

1. Akpinar-Bayizit, A., Ozcan, T., Yilmaz-Ersan, L. (2009): Membrane processes in production of functional whey components. *Mljekarstvo*, **59**(4), 282-288.
2. Blažić M., Zavladač S., Kralj, E., Šarić, G. (2018): Production of whey protein as nutritional valuable foods. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, **10**(2), 255-260. doi: <https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.2.09>
3. Carter, B., Ptel, H., Barbano, D.M., Drake, M. (2018): The effect of spray drying on the difference in flavor and functional properties of liquid and dried whey proteins, milk proteins and micellar casein concentrates. *Journal of Dairy Science*, **101**(5), 3900-3909. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13780>
4. Çelik, K., Yuksel, Z. (2016): Whey every aspect. *Sonçağ Matbaacılık*.
5. Chandrajith, V., Karunasena, G. (2018): Applications of Whey as a Valuable Ingredient in Food Industry. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences*, **6**(5), 555698, doi: <https://doi.org/10.19080/JDVS.2018.06.555698>
6. Chandrapala, J. (2018): Whey Wastes and Powders, Microstructure of dairy products. *John Wiley & Sons*, 261-291.
7. Chen, H., Wang, J., Cheng, Y., Wang, C., Liu, H., Bian, H., Pan, Y., Han, W. (2019): Application of Protein-Based Films and Coatings for Food Packaging: A Review. *Polymers*, **11**(12), 2039. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109582>
8. De Wit, J.N. (2001): Lecturer's Handbook on whey and whey products. *European Whey Products Association*, Brussels.
9. Doultani, S., Turhan, N., Etzel, M.R. (2004): Fractionation of proteins from whey using cation exchange chromatography. *Process Biochemistry*, **39**(11), 1737-1743. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.07.005>
10. Farrell Jr, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K. (2004): Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of dairy science*, **87**(6), 1641-1674. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
11. Friganović, E., Čalić, S., Maleša, V., Mustapić, A. (2011): Funkcionalna hrana i potrošaći. *Praktični menadžment: stručni časopis za teoriju i praksu menadžmenta*, **2**(1), 51-57.
12. Galić, K. (2009): Jestiva ambalaža u prehrambenoj industriji. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4**(1-2), 23-31.



13. Giroux, H.J., Houde, J., Britten, M. (2010): Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment. *Food Hydrocolloids*, **24**(4), 341-346. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.013>
14. Grigoras, C., Alexa, I. C. (2012): Valorization of whey from dairy industry for agricultural use as fertilizer: Effects on plant germination and growth. *Environmental Engineering and Management Journal*, **11**(12), 2203-2210.
15. Gunasekaran, S., Ko, S., Xiao, L. (2005): Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Applied Polymer Science*, **99**, 2470-2476. doi: <https://doi.org/10.1002/app.22838>
16. Gupta, C., Prakash, D. (2017): Therapeutic Potential of Milk Whey. *Beverages*, **3**(3), 31. doi: <https://doi.org/10.3390/beverages3030031>
17. Harrison, I.P., Spada, F. (2018): Hydrogels for Atopic Dermatitis and Wound Management: A Superior Drug Delivery Vehicle. *Pharmaceutics*, **10**(2), 71. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020071>
18. Herceg, Z., Režek A. (2006): Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, **56**(4), 379-396.
19. Jooyandeh, H. (2011): Whey Protein Films and Coatings: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, **10**(3), 296-301.
20. Khaire, R.A., Gogate, P.R. (2019): Whey Proteins, Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications. Academic Press, 193-222.
21. Khan, A., Wang, C., Sun, X., Killpatrick A., Guo, M. (2019): Preparation and Characterization of Whey Protein Isolate- DIM Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, **20**(16), 3917. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20163917>
22. Khan, M.I., Adrees, M.N., Arshad, M.S., Anjum, F.M., Jo, C., Sameen, A. (2015): Oxidative stability and quality characteristics of whey protein coated rohu fillets. *Lipids in health and disease*, **14**(1), 1-9. doi: <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0060-z>
23. Krolczyk, J.B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., Solowiej, B.G. (2016): Use of whey and whey preparations in the food industry- A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **66**(3), 157-165. doi: <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0052>

24. Kumar, R., Chauhan, S.K., Shinde, G., Subramanina, V., Nadanasabapathi, S. (2018): Whey Proteins: A potential ingredient for food industry- A review. *Asian Journal of Dairy & Food Research*, **37**(4), 283-290. doi: <https://doi.org/10.18805/ajdfdr.DR-1389>
25. Lappa, I.K., Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Terpou, A., Koulougliotis, D., Eriotou, E., Kopsahelis, N. (2019): Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. *Foods*, **8**(8), 347. doi: <https://doi.org/10.3390/foods8080347>
26. Matijević, B. (2018): Mogućnosti iskorištavanja i upotrebe sirutke. 1st International conference „The holistic approach to environment“, Zbornik radova, Štrljak, A., Glavaš, Z., Kalambura, S. (ur.), *Veleučilište u Karlovcu, Sisak*, 438-449.
27. Papademas, P., Kotsaki P. (2019): Technological Utilization of Whey towards Sustainable Exploitation. *Adv. Dairy Res.*, **7**(4), 231.
28. Petrovčić, T., Pilipović, A. (2011): Hidrogelovi. *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, **32**(1), 31-33.
29. Ramos, O.L., Fernandes, J.C., Silva, S.I., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012): Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation and on Mechanical and Bioactive Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **52**(6), 533-552. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.500528>
30. Ramos, O.L., Pereira, J.O., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Franco, M.I., Lopes-da-Silva, J.A., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2012): Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science*, **95**(11), 6282-6292. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5478>
31. Ramos, O.L., Pereira, R.N., Martina, A., Rodrigues, R., Fucinos, C., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2017): Design of Whey Protein Nanstructures for incorporation and Release of Nutraceutical Compounds in Food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57**(7), 1377-1393. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.993749>
32. Sabarez, H. (2016): Drying of Food Materials. Module in Food Science, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965034168?via%3Dihub> pristupljeno: 21.2.2021.
33. Shimizu, N., Dairiki, K., Ogawa, S., Kaneko, T. (2006): Dietary Whey Protein Hydrolysate Suppresses Development of Atopic Dermatitis-like Skin lesions Induced by Mite Antigen

- in NC/Nga Mice. *Allergology International*, **55**(2), 185-189. doi: <https://doi.org/10.2332/allergolint.55.185>
34. Sogut, E., Balqis, A.M., Nur Hanani, Z.A., Seydim, A. (2019): The properties of k-carrageenan and whey protein isolate blended films containing pomegranate seed oil. *Polymer testing*, **77**, 105886. doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2019.05.002>
35. Solak, B.B., Akin, N. (2012): Health Benefits of Whey Protein: A Review. *Journal of Food Science and Engineering*, **2**(3), 129-137.
36. Soliman, T.N., Hassan, M. (2018): Preparation and Characterization of Sustained Released Zinc Citrate Encapsulated in Whey Protein Nanoparticles. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **21**(9), 448-453. doi: <https://doi.org/10.3923/pjbs.2018.448.453>
37. Tsutsumi R., Tsutsumi Y.M. (2014): Peptids and Proteins in Whey and Their Benefits for Human Health. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, **1**(1), 1002.