

## Lista odgovora na komentare Recenzenata

### A. Odgovori na komentare recenzenta „Reviewer A“ i izvršene promene

Komentar recenzenta: „Rad je dobro napisan i prezentuje nova istraživanja koja mu daju svojstva naučnog rada, a koji može biti prihvaćen u časopisu Hemijska industrija. Pre publikovanja rada, potrebno je da autori urade manje korekcije koje su u pdf dokumentu navedene.“

*Autori upućuju veliku zahvalnost recenzentu „Reviewer A“ na korisnim sugestijama i ukazivanju nedostataka rukopisa, čija bi korekcija pomogla poboljšanju kvaliteta naučnog rada. Autori se nadaju da bi revidirana verzija rukopisa mogla biti korisna za bolje razumevanje postupka inkapsulacije hidrolizata proteina soje, biološke karakterizacije lipozoma sa peptidima, i mogućnosti primene ultrazvuka u cilju redukcije veličine lipozomnih čestica. U revidiranom rukopisu, sve promene teksta obojene su žutom bojom radi lakšeg pregledanja koristeći Text Highlight Color opciju.*

1. Komentar recenzenta: U poglavlju 1. potrebno je reč „neinkapuliran“ pravilno napisati – „neinkapsuliran“.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji. Reč „neinkapuliran“ je izbrisana i napisana u pravilnom obliku „neinkapsuliran“ (strana 3, red 54).*

2. Komentar recenzenta: U poglavlju 2. potrebno je reč „apsorpcija“ pravilno napisati – „apsorpcije“.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji. Reč „apsorpcija“ je izbrisana i napisana u pravilnom obliku „apsorpcije“ (strana 6, red 119).*

3. Komentar recenzenta: U poglavlju 3. prikazati tačan sastav smeše fosfolipona i procentualni udeo zasićenih i nezasićenih lipida u smeši.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na ukazanoj primedbi. Prema specifikaciji proizvođača (na engl. Phospholipon® 90G), fosfolipon predstavlja komercijalnu lipidnu smeša koja sadrži fosfatidil-holin (94,0–102,0 %), lizofosfatidil-holin (4,0 %) i tokoferol (0,3 %), koja je stabilizovana askorbil-parmitatom (0,1 %). U revidiranom rukopisu u potpoglavlju 2.1 naveden je tačan hemijski sastav smeše korišćenog fosfolipona prema deklaraciji proizvođača (strana 9, red 169–179).*

4. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.2 izbrisati dupliranu reč „nakon“.

*Odgovor autora: Duplirana reč „nakon“ je izbrisana (strana 10, red 200).*

5. Komentar recenzenta: Nije navedena metoda kojom su merenja vršena, na koji način se došlo do tačne koncentracije - da li je to spektroskopska metoda ili koja? Dopuniti eksperimentalni deo u delu metode.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji i predočenom nedostatku opisa metode. Uviđeno je da u potpoglavlju 2.4., efikasnost inkapsulacije nije kompletno objašnjena u pogledu definisanja metode za kvantitativnu analizu proteina, tako da su u revidiranom rukopisu predočena detaljna pojašnjenja i unete korekcije.*

*Konkretno, kvantitativna analiza sadržaja ukupnih proteina soje unetih u sistem na početku postupka inkapsulacije i neinkapsuliranih proteina soje zaostalih u supernatantu nakon centrifugiranja suspenzije lipozoma izvršena je spektrofotometrijskom metodom po Loriju (Lowry) merenjem promene apsorbance na 500 nm [1]. Iz očitanih vrednosti apsorbanci, korišćenjem prečišćenog albumina iz goveđeg seruma, kao standarda, izračunate su koncentracije proteina izražene u jedinicama  $\text{mg cm}^{-3}$ . U toku eksperimentalnog rada, merene su sve neophodne zapremine, tako da su množenjem koncentracije sa zapreminama dobijene mase proteina. Naveden način kvantifikovanja, identičan je sa metodama kvantifikovanja opisanim u dostupnim literaturnim podacima. Preciznije, kada je reč o inkapsulaciji proteinskih hidrolizata, autori efikasnost inkapsulacije upravo izražavaju na identičan način, s time što do potrebnih vrednosti mase proteina dolaze primenom različitih spektrofotometrijskih metoda. Na primer, prilikom inkapsulacije hidrolizata kazeina ukupan sadržaj proteina u hidrolizatu, kao i neinkapsuliranih proteina, istraživači su kvantifikovali metodom po Loriju [2] i metodom po Bredfordu [3]. Indirektnim određivanjem inkapsuliranih peptida, tj., određivanjem koncentracije neinkapsuliranih peptida, efikasnost inkapsulacije proteinskog hidrolizata mišićnog tkiva ribe odredili su i Zavareze i saradnici, 2014 [4]. BCA kit za kvantifikovanje sadržaja proteina pre i posle inkapsulacije koristili su Luo i He, 2018 [5].*

6. Komentar recenzenta: Rezultati prikazani u ovom delu (potpoglavlje 3.1) jasno ukazuju na nestabilnost dobijenih lipozoma. Posebno pitanje se nameće: kada su merenja veličine čestica disperzija kao i zeta potencijala vršena? Da li neposredno nakon pripreme ili nakon stajanja (na sobnoj temperaturi, u frižideru i koliko dugo?). Usled stajanja se menjaju osobine lipozomnih disperzija, dolazi do agregacije, itd. Autori trebaju precizirati kada su merenja obavljena. Takođe, ukoliko postoje rezultati merenja nakon pripreme i nakon izvesnog vremena, treba uključiti i te rezultate.

*Odgovor autora: Hvala na komentaru i sugestiji. Analize merenja srednje veličine čestica, polidisperznog indeksa i zeta-potencijala su vršena 2 h nakon pripreme suspenzije koja je za to vreme čuvana u frižideru na temperaturi 4 °C. U potpoglavlju 2.5 revidiranog rukopisa dopunjeno je vreme nakon koga su merenja vršena, kao i mesto na kojem su čuvane suspenzije lipozoma. Slažemo se da su suspenzije lipozoma pokazale nestabilnost prilikom ovog eksperimenta, pa upravo zbog toga razmatramo da u sledećim fazama istraživanja uvedemo prisustvo određenog stabilizatora, kao i da aktivnosti rada usmerimo ka unapređenju*

*tehnološkog postupka dobijanja lipozoma koristeći druge lipidne sirovine. Zbog nestabilnosti koja je ustanovljena merenjem zeta-potencijala nakon 2 h nismo pratili stabilnost nakon nekoliko dana ili nedelja, ali u narednim fazama aktivnosti razvoja sistema lipozoma sa hidrolizatima proteina soje, imamo u planu praćenje stabilnosti.*

7. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 3.1. potrebno je reč „izdeven“ pravilno napisati – „izveden“.

*Odgovor autora: Hvala na korekciji. Reč „izdeven“ je u revidiranom rukopisu izbrisana i napisana je u pravilnom obliku „izveden“ (strana 16, red 329).*

8. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 3.1. potrebno je reč „literaturu“ pravilno napisati – „literaturi“.

*Odgovor autora: Hvala na korekciji. Reč „literaturu“ je u revidiranom rukopisu izbrisana i napisana je u pravilnom obliku „literaturi“ (strana 16, red 341).*

9. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 3.2 potrebno je preformulisati deo prve rečenice koji se odnosi na „kao najbolje okarakterisanih“ i napisati je jasnije.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na korekciji. Rečenica je u revidiranom rukopisu preformulisana i napisana jasnije tako što je navedeno tačno sa kojim je uzorkom dalje rađena analiza antioksidativnog potencijala (strana 22, red 427–435).*

10. Komentar recenzenta: S obzirom na jako mali stepen inkapsulacije dalja ispitivanja treba usmeriti ka unapredjenju tehnološkog postupka izrade. takođe, sam sastav fosfolipida može uticati na proces inkapsulacije te dalja istraživanja treba usmeriti na drugim lipidnim sirovinama pored phospholipon 90.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji i svrsishodnim savetima. Slažemo se sa Vašim predlogom, tako da smo u skladu sa navedenim korigovali zaključak i buduća istraživanja u revidiranom rukopisu (strana 27, red 530–535).*

*Literatura:*

[1] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193:265–275.

[2] Rao PS, Bajaj RK, Mann B, Arora S, Tomar SK. Encapsulation of antioxidant peptide enriched casein hydrolysate using maltodextrin–gum arabic blend. *J Food Sci Tech.* 2016; 53(10):3834–843.

[3] Sarabandi K, Mahoonak AS, Hamishehkar H, Ghorbani M, Jafari SM. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *J Food Eng.* 2019; 251:19–28.

[4] da Rosa Zavareze E, Telles AC, El Halal SLM, da Rocha M, Colussi R, de Assis LM, Suita de Castro LA, Guerra Dias AR, Prentice-Hernández C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from *Whitemouth croaker (Micropogonias furnieri)* muscle and byproduct. *LWT-Food Sci Technol.* 2014; 59(2):841–848.

[5] Luo P, He DP. Preparation of liposome encapsulating angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates. *Mol Med Rep.* 2018; 17(4):5306–5311.

## **B. Odgovori na komentare recenzenta „Reviewer B“ i izvršene promene**

Komentar recenzenta: Znanstveni rad “Priprema i karakterizacija lipozoma sa inkapsuliranim bioaktivnim hidrolizatom proteina soje” autora Neda V. Pavlović, Jelena R. Jovanović, Verica B. Đorđević, Bojana D. Balanč, Branko M. Bugarski i Zorica D. Knežević-Jugović, predstavlja originalan doprinos znanstvenom području prehrambene tehnologije, osobito tematici pripreme proteinskih hidrolizata soje gdje su isti prvi puta inkapsulirani u obliku liposoma te je u okviru rada optimiran postupak pripreme liposoma i istražen utjecaj inkapsulacije na farmakokinetička svojstva inkapsuliranih peptida kao i njihovu antioksidacijsku učinkovitost (antiradikalnu i redukcijsku sposobnost). Ipak, smatram da je potrebno dopuniti odnosno izmijeniti pojedine dijelove rada kako bi rad dobio na jasnoći, kako bi se bolje objasnili određeni metodološki pristupi te kako bi se doprinjelo jasnoći zaključaka koji proizlaze iz analize i diskusije dobivenih rezultata.

*Autori se zahvaljuju recenzentu „Reviewer B“ na sugestijama, komentarima i korisnim primedbama, u nadi da bi revidirana verzija rukopisa mogla da pruži dobar naučni i praktični doprinos boljem razumevanju postupka inkapsulacije hidrolizata proteina soje u lipozomalne sisteme, uticaj inkapsulacije na antioksidativna svojstva peptida, kao i mogućnost otpuštanja inkapsuliranih peptida. Revidiran rukopis mogao bi da ima poseban naučni značaj u oblasti prehrambene tehnologije, u kojoj inače antioksidativni peptidi i njihova implementacija kao suplemenata funkcionalne hrane zauzima važno mesto. U revidiranom rukopisu, sve promene teksta obojene su žutom bojom radi lakšeg pregledanja koristeći Text Highlight Color opciju.*

## **OPŠTI KOMENTARI**

1. Komentar recenzenta: Uvod treba izmijeniti. Predložene izmjene odnose se na skraćivanje opširnog opisivanja nutritivnih karakteristika soje, što predstavlja općepoznato znanje i nije usko vezano s ciljem istraživanja rada. Umjesto toga potrebno se odmah fokusirati na važnost i primjenu proteinskih hidrolizata soje te važnost njihove inkapsulacije. Bitno je pobliže

pojasniti koje se inkapsulacijske tehnike već koriste u tom smislu i koja bi bila prednost pripreme liposoma (u odnosu na već postojeće inkapsulacijske tehnike).

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na ukazanom propustu i sugestijama u kom smeru bi trebalo poglavlje Uvod koncipirati. U skadu da datim sugestijama, u revidiranom rukopisu, deo koji se odnosi na opisivanje nutritivnih svojstava proteina soje je izbrisan, a primena i važnost proteinskih hidrolizata zauzela je posebno mesto. Dodatno, objašnjene su i tehnike inkapsulacije sa osvrtom na prednost sistema lipozoma u odnosu na druge tehnike inkapsulacije.*

2. Komentar recenzenta: Potrebno je bolje definirati ciljeve i hipoteze istraživanja. Naime jedan od ciljeva je postići odgođeno oslobađanje peptida mada nije jasno zašto? Naime ne radi se o lijeku? Koja je svrha navedenog? i
3. Komentar recenzenta: Istraživali ste antioksidacijsku sposobnost hidrolizata te utjecaj inkapsulacije u liposome an antioksidacijsku aktivnost. Da li je to njihovo važno biološko svojstvo? Ukoliko je, to treba jasno naglasiti u uvodu. Ovako, nije jasno zašto su autori odlučili istraživati antioksidacijsku sposobnost?

*Odgovor autora: Hvala na korisnim sugestijama i pitanjima postavljenim pod rednim brojem 2 i 3. Shodno predloženom, u revidiranom rukopisu u Abstraktu i u Uvodu definisani su ciljevi i hipoteze naučnog istraživanja konkretnije. Dodatno, u Uvodu je detaljnije opisana biološka aktivnost hidrolizata proteina soje.*

*U našim prethodnim istraživanjima, ispitivana su biološki aktivna svojstva hidrolizata proteina soje, a sposobnost neutralizacije slobodnih radikalskih grupa (DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, OH<sup>•</sup>), sposobnost heliranja jona metala, sposobnost redukcije lipidne peroksidacije u sistemima sa linolnom kiselinom utvrđena je i verifikovana, između ostalog, i za hidrolizat pripremljen dvostepenim enzimskim postupkom, koji je korišćen u ovom istraživanju. Shodno činjenici da proteini soje spadaju u nutritivno vredne proteine, bogate esencijalnim aminokiselinama (naročito lizinom), njihovi peptidi predstavljaju nosioce biološke aktivnosti, koja isključivo zavisi od dužine polipeptidnog lanca i sekvence aminokiselina [1-3]. Peptidi, nosioci biološke aktivnosti vrlo često su unutar kvaternarne strukture nativnih proteina, iz kojih vode poreklo, neaktivni i ne mogu ispoljiti svoje bioaktivno dejstvo. Međutim, kada se složena kvaternarna struktura nativnih proteina naruši, peptidi se oslobode. Postupak kontrolisane i ciljane enzimske hidrolize delovanjem različitih vrsta proteolitičkih enzima sa endo- i egzo-peptidaznom aktivnošću, dovodi do oslobađanja peptida željenih dužina lanaca i sekvenci aminokiselina. Ovako nastali peptidi, ispoljavaju biološki aktivna svojstva, čime je postupak enzimske hidrolize opravdan i isplativ [4-6]. U zavisnosti od bioaktivnog svojstva (antioksidativna, antimikrobna, antiproliferativna, antihipertenzivna, antiinflamatorna, antiviralna, antitrombinska svojstva, i dr.), javljaju se posebne težnje za njihovom primenom, ali i njihovim izolovanjem, prečišćavanjem i inkapsulacijom. To znači da se ponekad teži izolovanju zasebnog peptida, tačno definisane dužine i sekvence, nekada smeše di- i tripeptida, a vrlo često i smeše oligopeptida [6,7]. Kao takvi, peptidi primenu nalaze, kako u formulacijama prehrambenih proizvoda u vidu*

*funkcionalne hrane (gde učestuju kao prirodni antioksidanti), tako i u najrazličitijim formulacijama farmaceutika i kozmetičkih proizvoda. U oblasti našeg istraživanja i trenutnoj fazi istraživanja, posmatramo peptide i smeše peptida (proteinske hidrolizate i/ili njihove frakcije), kao potencijalne dodatke prehranbenim proizvodima u kojima treba da ispolje svoje antioksidativno dejstvo, ukoliko ga poseduju nakog hidrolize. Da bi se mogli inkorporirati u prehranbene proizvode, sastavljene od velikog broja prirodnih organskih jedinjenja, kako bi se sprečila interakcija između peptida i organskih jedinjenja i time sačuvala njihova sekvenca, bioaktivni peptidi se inkapsuliraju u različite čestice [8]. Ukoliko se bioaktivni peptidi nakon inkorporiranja u prehranbene proizvode ne bi inkapsulirali, u gastrointestinalnom traktu bili bi dostupni digestivnim proteolitičkim enzimima (pepsin, tripsin, himotripsin, ekopeptidaza, karboksipeptidaza i aminopeptidaza). Digestivni proteolitički enzimi vršili bi hidrolizu unetih peptida do slobodnih aminokislinea, di- ili tripeptida, pre nego što ispolje svoje bioaktivno dejstvo. Nakon hidrolize, uneti peptidi, usled promene dužine lanaca i sekvence aminokislinea, mogli bi delimično ili potpuno da izgube svoje bioaktivno svojstvo [9,10]. Utvrđeno je da većina bioaktivnih peptida poreklom iz proteina hrane, koji sadrže 2–3 i više aminokiselinska ostatka, ne mogu izdržati simulirane gastrointestinalne uslove, razgrađuju se i slabi ili potpuno gube svoju bioaktivnost [11].*

*U skladu sa gore navedenim hipotezama, osnovi cilj naučnog istraživanja prezentovanog u recenziranom rukopisu jeste inkapsulacija hidrolizata proteina soje koji ispoljava antioksidativnu aktivnost u lipozomne vezikule i ispitivanje uticaja inkapsulacije na antioksidativnu aktivnost hidrolizata proteina soje. Kako je osnovi cilj naučnog istraživanja bio inkapsulacija hidrolizata proteina soje, posledično radi boljeg razumevanja ponašanja pripremljenih jednodamelarnih vezikula, ispitana je kinetika otpuštanja inkapsuliranih peptida. Tom prilikom, nije praćeno ciljno otpuštanje, tj. farmakokinetička studija nije sprovedena, niti je bila deo istraživanja, već je samo praćeno otpuštanje/oslobađanje inkapsuliranih peptida koji nose biološku aktivnost u uslovima koji simuliraju gastrointestinalni trakt u prisustvu digestivnih enzima (želudačni i žučni sok). Shodno tome, poslednji cilj ovog naučnog istraživanja jeste ispitivanje uticaja inkapsulacije na oslobađanje inkapsuliranih peptida.*

4. Treba jasnije napisati metodologiju. Konkretni komentari su u tekstu. Odnose se na određivanje postotka inkapsulacije, određivanje antioksidacijskog potencijala i određivanje farmakokinetike peptida, gdje nije jasno na koji način su autori došli do rezultata. Osobito je nejasan prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti. Rezultate ne bi trebalo izražavati kao postotak već kao ekvivalente nekog standarda. Osim toga, trebalo bi ih izraziti po masi proteina. Također, autori u materijalima i metodama tvrde da svi analizirani uzorci sadrže istu količinu proteina, a u interpretaciji rezultata manju antioksidativnu aktivnost tumače manjim udjelom proteina. Također iznose se pretpostavke o utjecaju pomoćnih tvari za pripremu liposoma na rezultat, umjesto da je napravljena slijepa proba? Molim autore da pogledaju konkretne komentare u tekstu i peprave što je potrebno.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na korisnim prijedbama i sugestijama. Shodno predloženom, u revidiranom rukopisu, detaljno su ispraćeni sve konkretni komentari i ispravljeno je prema rečima Recenzenta. Objašnjenja i odgovore možete naći u nastavku teksta u kome su pojedinačni komentari.*

*Literatura:*

- [1] Chatterjee C, Gleddie S, Xiao CW. Soybean bioactive peptides and their functional properties. *Nutrients*. 2018; 10(9):1211.
- [2] Agyei D. Bioactive proteins and peptides from soybeans. *Recent Pat Food Nutr*. 2015; 7(2):100–107.
- [3] Nakamori T. Soy Peptides as Functional Food Materials. In: Mine Y, Li-Chan E, Jiang B, eds. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010:265–271.
- [4] Coscueta ER, Campos DA, Osório H, Nerli BB, Pintado M. Enzymatic soy protein hydrolysis: A tool for biofunctional food ingredient production. *Food Chem: X*. 2019; 1:100006.
- [5] Perez Espitia PJ, de Fátima Ferreira Soares N, dos Reis Coimbra JS, de Andrade NJ, Souza Cruz R, Alves Medeiros EA. Bioactive peptides: synthesis, properties, and applications in the packaging and preservation of food. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2012; 11(2), 187-204.
- [6] Mine Y, Li Chan EC, Jiang B. Biologically active food proteins and peptides in health. In: Mine Y, Li-Chan E, Jiang B, eds. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010:5–12.
- [7] Samaranayaka AG, Li-Chan EC. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Funct Foods*. 201; 13(4), 229–254.
- [8] Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L., Udenigwe, C. C. Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *RSC advance*. 2015; 5(97):79270-79278.
- [9] Amar-Yuli I, Aserin A, Garti N. Controlled Release and Delivery Technology of Biologically Active Proteins and Peptides. In: Mine Y, Li-Chan E, Jiang B, eds. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010:359–382.
- [10] McClements DJ. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018; 253:1-22.
- [11] Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D, Hernandez-Escalante VM. Bioavailability of bioactive peptides. *Food Rev Int*. 2011; 27(3):213–226.

## POJEDINAČNI KOMENTARI

1. Komentar recenzenta: U sažetak dodati cilj istraživanja i hipotezu.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji. U revidiranom rukopisu, Izvod rada je preformulisan dopisivanjem konkretnijeg cilja istraživanja i polaznih hipoteza istraživanja (strana 2, red 23–26 i 29–32).*

2. Komentar recenzenta: Ne pisati zaštićena imena na ovaj način. Ili staviti ime preparata sa oznakom R ili u potpunosti izbaciti vrste enzima korištene ili napisati o kojim se skupinama enzima radi (proteaze...).

*Odgovor autora: Hvala na zapažanju i svrshodnom komentaru. U revidiranom rukopisu, najpre u Izvodu, a potom i u celom rukopisu, nazivi komercijalno dostupnih proteolitičkih enzima bez oznake R su zamenjeni pravim nazivima, a u zagradi je ostavljen komercijalni naziv (Izvod: strana 2, red 34–35).*

3. Komentar recenzenta: U Izvodu je potrebno prikazati numeričke podatke povećanja veličine lipozoma.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji. U poglavlju Izvod dodati su numerički podaci povećanja veličine lipozoma za formulacije tretirane ultrazvuknim talasima i formulaciju lipozoma bez tretmana (strana 2–3, red 43–44).*

4. Komentar recenzenta: U Izvodu je potrebno prikazati numeričke podatke kinetike otpuštanja peptida iz lipozoma i reč „neinkapuliran“ napisati pravilno „neinkapsuliran“.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji. U poglavlju Izvod dodati su numerički podaci povećanja kinetike otpuštanja peptida za formulacije tretirane ultrazvukom (strana 3, red 52–54). Reč „neinkapuliran“ je izbrisana i napisana je u pravilnom obliku „neinkapsuliran“ (strana 3, red 54).*

5. Komentar recenzenta: Ovaj uvodni dio skratila, a veći naglasak bih stavila baš na hidrolizate proteina soje, njihovu primjenu i nedostatke te prokušane metode inkapsulacije tih hidrolizata i prednosti razvijanaj liposoma kao sustava za inkapsulaciju. Jer to je cilj rada. Ove općenite stvari o soji nam zapravo nisu toliko bitne. Dakle, samo malo promijeniti naglasak uvodnog dijela.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji. Slažemo se sa recenzentom da Uvodni deo koji se odnosi na osnovna nutritivna svojstva sojinih proteina odstupa od teme naučnog rada, i da je najprihvatljivije akcenat staviti na hidrolizate proteina soje, njihove biološke aktivnosti ukoliko ih poseduju, nedostatke pilikom upotrebe i načine rešavanja istih. U skladu sa time, u revidiranom rukopisu, u poglavlju Uvod tekst koji se odnosi na opšte činjenice o sojinim*



*porteinima je obrisano, a kompletan Uvod dodatno je upotpunjen tekstom o hidrolizatima proteina soje (strana 5–7, red 98–134).*

6. Komentar recenzenta: U Uvodu potrebno je reč „apsorpcija“ napisati u pravilnom obliku - „apsorpcije“.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji. U revidiranom rukopisu, reč „apsorpcija“ napisana je u pravilnom obliku „apsorpcije“ (strana 6, red 119).*

7. Komentar recenzenta: U Uvodu potrebno je reč „lečenje“ zameniti adekvatnijim izrazom kao što su: „dijetoterapija, prevencija“.

*Odgovor autora: Hvala na sugestiji. U revidiranom rukopisu, reč „lečenje“ zamenjena je ispravnijim i adekvatnijim izrazom „prevencija“ (strana 6, red 122).*

8. Komentar recenzenta: Komentar recenzenta: U Uvodu je potrebno skratiti i preformulisati rečenicu u kojoj se navodi aminokiselinski sastav proteina soje. Naime, nepotrebno je nabrajati esencijalne aminokiseline, zna se što je biološka vrijednost proteina. Znači: „zbog kvalitetnog aminokiselinskog sastava“ ili sl.

*Odgovor autora: Hvala na ukazanom komentaru. Slažemo se da je nepotrebno navođenje esencijalnih aminokiselina kojima proteini soje obiluju. U revidiranom rukopisu, uvod je izmenjen i data rečenica je izbrisana.*

9. Komentar recenzenta: U Uvodu je potrebno u delu gde se govori o tehnikama inkapsulacije navesti neke najčešće korištene metode inkapsulacije i njihove nedostatke.

*Odgovor autora: Hvala na ukazanom komentaru. Slažemo da je smisljeno dopisati najčešće korišćene tehnike inkapsulacije i njihove nedostatke. U revidiranom rukopisu, nabrojane su najčešće korišćene tehnike inkapsulacije, među kojima se ubrajaju i lipozomi. Takođe, navedeni su nedostaci tih tehnika i istaknut je značaj i prednost lipozoma (strana 7, red 141–149).*

10. Komentar recenzenta: U Uvodu je potrebno preformulisati cilj rada i pojasniti zašto je praćeno kontrolisano oslobađanje peptida u gastrointestinalnim uslovima.

*Odgovor autora: Hvala na ukazanoj pribedbi. Slažemo da onako kako je prvobitno napisano, cilj rada nije bio najjasnije izolovan, ali takođe nije na najadekvatniji način objašnjeno zašto se pratilo oslobađanje peptida u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. U revidiranom rukopisu, cilj rada je preformulisan i jasnije napisan (strana 8, red 163–167), dok je u skladu sa literaturnim navodima dato pojašnjenje praćenja otpuštanja inkapsuliranih peptida u simuliranim gastrointestinalnim uslovima (strana 8, red 163–166).*

11. Komentar recenzenta: U Uvod potrebno je preformulisati poslednju rečenicu jer je napisano „ali je i praćena kinetika“. Takođe, potrebno je objasniti zašto je ispitivana antioksidativna aktivnost peptida inkapsuliranih u liposome.

*Odgovor autora: Hvala na ukazanoj primedbi. U poglavlju Uvod u revidiranom rukopisu, poslednja rečenica je preformulisana i iz iste je izbrisana fraza „ali je i...“. Opisivanjem proteinskih hidrolizata soje i njihovih bioloških funkcija u poglavlju Uvod objašnjeno je njihovo antioksidativno svojstvo. Pregledom dostupne literature, evidentno je da nakon inkapsulacije dolazi, kako do povećanja [1,2], tako i do zadržavanja i/ili smanjenja [3,4] antioksidativne aktivnosti inkapsuliranih hidrolizata i/ili peptida. Navedena odstupanja povezuju se sa ostvarenom efikasnošću inkapsulacije i dostupnošću bioaktivnih peptida tokom ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Naime, neki peptidi mogu biti izloženi, odnosno podložni lakšem oslobađanju iz lipozmih vezikula što rezultira većom antioksidativnom aktivnošću. Dejstvo ultrazvučnih talasa, tj. soniciranje, koje se koristi za smanjenje i standardizaciju veličine vezikula, takođe je faktor koji može uticati na aktivnost inkapsuliranih peptida. Tako, ultrazvučna sonda uzrokuje veću štetu od ultrazvučnog kupatila, jer dovodi do lokalnog pregrevanja, tj. kavitacionog efekta, što za posledicu ima delimičnu denaturaciju peptida i smanjenje bioaktivnosti.*

*Literatura:*

[1] da Rosa Zavareze E, Telles AC, El Halal SLM, da Rocha M, Colussi R, de Assis LM, de Castro LAS, Guerra Dias AR, Prentice-Hernández C. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT-Food Sci Technol.* 2014; 59(2):841–848.

[2] Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chem.* 2017; 234:220–229.

[3] Hosseini SF, Ramezanzade L, Nikkhah M. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *Int J Biol Macromol.* 2017; 105:1455–1463.

[4] Corrêa APF, Bertolini D, Lopes NA, Veras FF, Gregory G, Brandelli A. Characterization of nanoliposomes containing bioactive peptides obtained from sheep whey hydrolysates. *LWT-Food Sci Technol.* 2019; 101:107–112.

12. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.3 potrebno je umesto fraze „peptida soje“ napisati „proteinskog hidrolizata soje“.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na korekciji. U revidiranom rukopisu umesto fraze „peptida soje“ napisano je „proteinskog hidrolizata soje“ (strana 11, red 222-223).*

13. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.3 potrebno je izbrisati skraćenicu „tzv.“ i korišćenje kosih slova, a napisati „prazni lipozomi bez dodatka proteinskog hidrolizata soje“.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na korekciji. U revidiranom rukopisu izbrisana je skraćenica „tzv.“ i umesto nje napisano je „prazni lipozomi bez dodatka proteinskog hidrolizata soje“ (strana 11, red 227).*

14. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.4 potrebno je izbrisati „naime“ i ostavi samo „Nakon pripreme“.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na korekciji. Tražena reč je izbrisana iz revidiranog rukopisa.*

15. Komentar recenzenta: Bolje objasniti efikasnost inkapsulacije. Naime ukupan sadržaj proteina određen je na početku metodom po Kjehldalu. Ti se podaci ne mogu uspoređivati sa podacima dobivenim metodom po Lowry-ju? Ili ste jednako tretirali otopinu hidrolizata soje sa liposomima i bez liposoma i obje frakcije (ukupnu i neinkapsuliranu) određivali prema Lowry-ju. Ako je tako, to treba jasno napisati (dakle dodatno napisati kako je određena ukupna proteinska frakcija). Da ne bude zabune.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na ukazanoj sugestiji. Potrudili smo se da u revidiranom rukopisu detaljnije objasnimo postupak određivanja efikasnosti inkapsulacije (strana 11–12, red 238–253).*

*Ukupan sadržaj sirovih proteina u pripremljenom hidrolizatu određen je standardizovanom metodom po Kjeldalu (Kjeldahl;  $N \times 6,25$ ), i dobijeni rezultati korišćeni su za pripremu polaznog rastvora hidrolizata. Preciznije, dobijen prah hidrolizata proteina soje rastvoren je u destilovanoj vodi tako da ukupna koncentracija proteina bude  $5 \text{ mg cm}^{-3}$ . Kvantifikovanjem količine proteina u ovako pripremljenom uzorku hidrolizata metodom po Loriju, dobija se nešto manja vrednost, što je i očekivano zbog specifičnosti spektrofotometrijske metode. Pošto se dobijeni rezultati dvema metodama ne mogu upoređivati, a kako metoda po Kjeldalu daje validne rezultate samo sa veće količine uzoraka, kojih u slučaju formulacija lipozoma nije bilo, metoda po Kjeldalu nije korišćena za kvantifikovanje proteina u daljim fazama istraživanja, već metoda po Loriju (Lowry). Naime, za određivanje efikasnosti inkapsulacije, polazni rastvor hidrolizata proteina soje, lipozomi sa inkapsuliranim peptidima i lipozomi bez inkapsuliranih peptida (u cilju kvantifikovanja ukupnih proteina i proteina koji nisu inkapsulirani) analizirani su na identičan način očitavanjem promene apsorbance na 500 nm prema proceduri po Loriju. Koncentracije dobijene na ovaj način, poznavanjem zapremine svih rastvora, prevedene su u mase proteina potrebne za proračun efikasnosti inkapsulacije. U revidiranom rukopisu, izmenjena je jednačina za proračun efikasnosti i jasnije je predložen postupak određivanja efikasnosti inkapsulacije.*

16. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.6 potrebno je dodatno napisati kako su izraženi rezultati. Naime, obično se rezultati izražavaju kao ekvivalenti nekog standardnog antioksidansa (Troloxa, L-askorbinske, itd.). Vi ste rezultate izrazili kao postotak; dakle treba biti jasno opisano što taj postotak znači.

Odgovor autora: Zahvaljujemo se na ukazanom komentaru. Potrudili smo se da u revidiranom rukopisu detaljnije objasnimo način izražavanja antioksidativne aktivnosti u skladu sa komentarom (strana 14, red 291–300), a rezultati antioksidativne aktivnosti dopunjeni su vrednostima koje su izražene kao ekvivalenti odgovarajućeg standarda (potpoglavlje 3.2, Slika 3).

Antiksidativna aktivnost ispitana je na nekoliko različitih uzoraka radi poređenja i utvrđivanja, kako uticaja samog postupka inkapsulacije na antioksidativnu aktivnost hidrolizata proteina soje, tako i korišćene komercijalne smeše fosfolipida koja prema deklaraciji proizvođača sadrži dobro poznat antioksidant tokoferol. Detaljnije, analizirani su sledeći uzorci: a) polazni hidrolizat proteina soje sa sadržajem peptida 10 mg, b) polazni hidrolizat proteina u kojem je sadržaj peptida odgovarao vrednosti ukupne efikasnosti inkapsulacije 19 %, c) uzorci supernatanta koji sadrže neinkapsulirane peptide i d) formulacija praznih lipozoma. **Stepen redukcije**  $ABTS^{*+}$  radiklaskog katjona i/ili **stepen heliranja** jona metala izraženi u procentima izračunati su kao odnos proreagovala količine  $ABTS^{*+}$  radiklaskog katjona i/ili jona gvožđa i ukupne količine radiklaskog katjona i/ili jona gvožđa unetih u reakcioni sistem, redom. Navedeno se matematički prikazuje na sledeći način:

$$ABTS (\%) = \frac{ABTS_{proreagovalo}}{ABTS_{ukupno}} \cdot 100 = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{kontrola}} \cdot 100$$

$$MJHA (\%) = \frac{Fe_{proreagovalo}}{Fe_{ukupno}} \cdot 100 = \frac{A_{kontrola} - A_{uzorak}}{A_{kontrola}} \cdot 100$$

gde  $A_{kontrola}$  i  $A_{uzorak}$  predstavljaju spektrofotometrijski očitane vrednosti apsorbanaci na odgovarajućim talasnim dužinama. U slučaju formulacije sa inkapsuliranim lipozomina,  $A_{uzorak}$  predstavlja apsorbanču inkapsuliranih peptida, koja se izračunava kao:

$$A_{uzorak} = A_{uk} - A_{neink}$$

gde je  $A_{uk}$  apsorbanča ukupnih proteina u formulaciji lipozoma (odgovara vrednosti hidrolizata proteina soje u kojem je sadržaj proteina odgovarao vrednosti ukupne efikasnosti inkapsulacije 19 %), a  $A_{neink}$  apsorbanča neinkapsuliranih proteina u odvojenom supernatantu.

Radi poređenja sa literaturni podacima, rezultati su izraženi i kao ekvivalenti određenog standarda, Trolox i EDTA, za  $ABTS^{*+}$  radiklaskog katjona i  $Fe^{2+}$  jone, redom. Kapacitet redukcije  $ABTS^{*+}$  radiklaskog katjona izražen je kao Trolox ekvivalent antioksidativna aktivnost (na eng. Trolox Equivalent Antioxidant Activity, TEAA) u  $\mu\text{mol TE/mg}$  proteina. Sposobnost heliranja jona metala predstavljena je kao EDTA ekvivalent antioksidativne aktivnosti (na eng. EDTA equivalent antioxidant activity, EEAA) u  $\mu\text{mol EDTA/mg}$  proteina. Standardna prava sa Troloxom konstuisana je pripremanjem serije razblaženja u opsegu  $0\text{--}0.2 \text{ mg cm}^{-3}$  i merenjem promene apsorbanče na  $734 \text{ nm}$  po isteku inkubacionog perioda sa ABTS reagensom, dok je

standardna prava sa EDTA konstuisana pripremanjem serije razblaženja u opsegu 0–0.3 mM i očitavanjem promene apsorbance nakon inkubacionog vremena sa reganeisma na 562 nm.

17. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 2.1 potrebno je opisati primenu želudačnog i pankreasnog soka.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na ukazanom komentaru. U potpoglavlju Materijali u revidiranom rukopisu nabrojane su hemikalije korišćene za pripremu želudačnog i pankreasnog soka, kao i njihovi proizvođači (strana 9, red 187–189).*

18. Komentar recenzenta: Na koji način je određena masa proteina nakon digestije? Navedite metodu. Ovako zvuči kao da ste proteine u otopini određivali gravimetrijski.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji. U potpoglavlju Kontrolisano otpuštanje hidrolizata proteina iz lipozoma u revidiranom rukopisu navedena je metoda kojom je određena masa proteina nakon digestije, metoda po Loriju (strana 15, red 315–317).*

19. Komentar recenzenta: U potpoglavlju 3.1 potrebno je reč „literaturu“ pravilno napisati – „literaturi“.

*Odgovor autora: Reč „literaturu“ je izbrisana i napisana u pravilnom obliku „literaturi“ (strana 16, red 341).*

20. Komentar recenzenta: U nazivu Slike 2 potrebno je ispraviti frazu „nijeznačajno“ u „nije značajno“.

*Odgovor autora: „Nijeznačajno“ je obrisano i napisano je „nije značajno“ (strana 20, red 391).*

21. Komentar recenzenta: Zašto niste izrazili rezultate po masi proteina? Čini mi se da ste u Materijalima i metodama napisali da ste pazili da svi uzorci imaju jednak sadržaj proteina? Na taj način biste izbjegli ovakve upitne pretpostavke i procjene o tome kako inkapsulacija utječe ili ne utječe na antioksidativnu aktivnost.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo na pitanju i ukazanoj sugestiji. U revidiranom rukopisu u opisu metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti objašnjeno je kako je izvršeno merenje, a radi uklanjanja nastalih nejasnoća oko mase peptida (sve uzorke smo neporedno pre merenja sveli na istu koncentraciju peptida, zato smo i tvrdili da mogu da se porede), rezultati su prikazani ne samo procenatualno, već i po masi peptida. Na taj način, sada možemo odgovorno tvrditi da se uzorci mogu porediti i da razlici u antioksidativnoj aktivnosti isključivo doprinosi sam postupak inkapsulacije. Rezultati izraženi po masi peptida prikazani su na Slici 3B i nadamo se da će ovako prikazni biti jasniji čitaocima.*

22. Komentar recenzenta: Zašto niste napravili antioksidativnu aktivnost praznih liposoma?

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na primedbi. Uporedo sa analiziranjem antioksidativne aktivnosti uzoraka hidrolizata i uzoraka lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom, određivana je i antioksidativna aktivnost praznih lipozoma bez inkapsuliranih peptida. U originalnom rukopisu, ove rezultate nismo prikazali zajedno sa ostalima, pa smo u revidiranom rukopisu ovu grešku ispravili i rezultate prikazali na Slici 3A. Shodno tome, diskusiju rezultata smo prilagodili prikazanim rezultatima i svoje prethodno napisano objašnjenje visoke antioksidativne aktivnosti suspenzije lipozoma sa inkapsuliranim hidrolizatom proteina soje potkrepili i rezultatima. Činjenica je da je komercijalna smeša fosfatidilholina i tokoferola u lipozomnoj formulaciji prisutna u mnogo većoj koncentraciji u odnosu na peptide ( $20 \text{ mg cm}^{-3}$  fosfolipona u odnosu na  $0,38 \text{ mg cm}^{-3}$  hidrolizata), tako da ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti suspenzije lipozoma doprinose i inkapsulirani peptidi i fosfolipid sa tokoferolom.*

23. Komentar recenzenta: U poglavlju Zaključak potrebno je preformulisati rečenicu koja se odnosi na hidrolizat proteina soje i napisati je jasnije.

*Odgovor autora: Zahvaljujemo se na sugestiji. Rečenica je preformulisana i napisana jasnije (strana 26, red 516).*