

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Датум: 30.3.2023.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Данијела Д. Милинчића, мастер инжењера прехрамбене технологије.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број: 32/16-5.1. од 29.03.2023. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „Споредни производи винске индустрије као извор биоактивних једињења: карактеризација и могућност примене у прехрамбеној индустрији“, кандидата Данијела Д. Милинчића, мастер инжењера прехрамбене технологије.

Комисија у саставу: др Слађана Станојевић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Александар Ж. Костић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Александар Петровић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Немања Станисављевић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Урош Гашић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду, на основу прегледа, анализе и оцене докторске дисертације подноси Наставно-научном већу Пољопривредног факултета следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ И ДИСЕРТАЦИЈИ

Данијел Д. Милинчић, рођен 29.11.1993. у Крушевцу. Дипломирао је на катедри за Прехрамбену технологију, смер Конзервисање и врење, на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, 2016. године, са просечном оценом 9.95 и оценом 10 на завршном раду из области хемије и биохемије хране, под називом: „Интеракције полифенолних једињења са протеинима млека“. Мастерирао је 2017. године на истом факултету, смер Хемија и биохемија хране, са просечном оценом 10, и оценом 10 на мастер раду из области хемије и биохемије хране под називом: „Карактеризације биолошки активних компонената сушених покожица грожђа“. Од школске 2016/2017 до данас је био ангажована као сарадник у настави ван радног односа на Катедри за Хемију и биохемију, Пољопривредног факултета, на предмету Основи биохемије. Од јуна 2018. године је изабран у звање истраживач сарадник, у области Биотехничких наука, ужа научна дисциплина Хемија производа биљног порекла. До сада је био стипендиста Министарства образовања, науке и технолошког развоја и Фонда за младе таленте Министарства омладине и спорта Републике Србије (Доситеј). Као стипендиста је био ангажован на пројекту TR31069, „Коришћење биљних извора протеина, дијеталних влакана и антиоксиданаса у производњи хране“. Ангажован је на пројекту FUNPRO из програма ИДЕЈЕ, који финансира Фонд за науку Републике Србије, ев. бр. 7744714. Члан је радне групе (WG2) у оквиру COST акције: „PIMENTO – COST ACTION CA20128–Promoting Innovation of ferMENTed fOods“. Награђен је за изузетан успех током студија на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду. Носиоц је друге награде за излагање рада на 10th International Conference of Students of Agronomy, University of Kragujevac, Faculty of Agronomy у Чачку, 2017. Аутор и ко-аутор је радова који су награђени годишњом наградом на Пољопривредном факултету, 2021 и 2022. године. Ко-аутор је рада који је био „Top Cited Article“, у часопису Cereal Chemistry, за 2020-2021 годину. Ко-аутор је на радовима који су награђени на фармацеутском факултету (2021-2022) и ИМГТИ-у 2019 године. Аутор је постера који је награђен првом наградом на 32nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry у Сарајеву, 2022 године. До сада је као аутор или коаутор, са колегама и професорима публиковао 28 научних радова на SCI листи (M21a; M21; M22; i M23); 3 поглавља у страним књигама; више од 50 саопштења на

међународним и националним конгресима и 1 лабораторијски приручник. Аутор је до сада био рецензент у неколико водећих међународних часописа. Члан је Удружења прехранбених технолога Србије, Српског хемијског друштва и Друштва за исхрану Србије. Као члан организационог одбора учествовао је у припреми и реализацији 2nd UNIFood International Conference (Belgrade 2021). Школске 2017/2018. године уписао је докторске академске студије, на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду. Тема дисертације је пријављена на Пољопривредном факултету, Универзитета у Београду, и одобрена је од стране Већа научних области биотехничких наука одлуком број 61206-4493/2-19 од 12.11.2019. године. За ментора докторске дисертације је одређена др Мирјана Б. Пешић, редовни професор Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду.

Докторска дисертација Данијела Д. Милинчића, мастер инжењера прехранбене технологије, под насловом: „Споредни производи винске индустрије као извор биоактивних једињења: карактеризација и могућност примене у прехранбеној индустрији“, написана је у складу са „Упутством о облику и садржају докторске дисертације која се брани на Универзитету у Београду“, на укупно 290 страна, од којих је 275 нумерисано. Ненумерисани делови дисертације су: насловне стране на српском и енглеском језику, страница са информацијама о члановима Комисије, странице са изјавама захвалности, странице са изводом (Abstract) на српском и енглеском језику са кључним речима, странице са листом скраћеница и странице са садржајем. Нумерисани део дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-48), Материјал и методе (стр. 49-68), Резултати и дискусија (стр. 69-217), Закључак (стр. 218-222), Референце (стр. 223-256), Прилози (стр. 257-270), Биографија аутора (стр. 271), Изјава о ауторству (стр. 272), Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације (стр. 273) и Изјава о коришћењу (стр. 274-275). Поглавља Преглед литературе, Материја и методе, и Резултати и дискусија су подељени на више потпоглавља. У оквиру дисертације приказано је 66 слика и графикона, и 43 табела. Цитирано је 534 литературна извора.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет истраживања докторске дисертације је искоришћење споредних производа винске индустрије у формулацији нових функционалних производа на бази козијег млека. Због тога, први циљ ове докторске дисертације је био да се испита употреба комине и њених конституената као значајних извора биолошки активних једињења у формулацији ферментисаних млечних производа (козијег јогурта) и неферментисаних функционалних адитива на бази протеина козијег млека који показују повећана антиоксидативна и техно-функционална својства у односу на почетне сировине. Други циљ је био да се испита биодоступност фенолних једињења у комплексним матриксама хране и формираним функционалним адитивима након *in vitro* дигестије.

3. ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ОД КОЈИХ СЕ ПОЛАЗИЛО У ИСТРАЖИВАЊУ

Основне хипотезе од којих се полази у оквиру ове докторске дисертације су следеће:

- Споредни производи из винске индустрије: комина или њени конституенти, покожица и семенка, могу бити значајан извор биолошки активних компонената, пре свих фенолних једињења.
- У зависно од сорте грожђа, технолошког поступка добијања комине, начина процесуирања комине и услова екстракције, постоје разлике у профилима фенолних једињења и антиоксидативним својствима добијених екстраката.
- Састав моно- и олигосахарида семенки и покожица, као и састав масних киселина семенки комине интернационалних и аутохтоних сорти грожђа се разликују као и њихова нутритивна вредност.
- Фенолни екстракти семенки могу се користити за добијање ферментисаних (применом стартер културе и одабраног *L. plantarum* соја) и неферментисаних функционалних адитива на бази козијег млека са побољшаним антиоксидативним и технофункционалним својствима и повећаном биодоступношћу фенолних једињења у различитим матриксама хране.

4. КРАТАК ОПИС САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. Ово поглавље је фокусирано на предмет истраживања докторске дисертације. Истакнут је значај валоризације споредних производа винске индустрије (комине, семенки, покожице и шепурине), као економски и еколошки прихватљивог извор за изолацију, екстракцију и искоришћење биолошки активних једињења, првенствено фенолних једињења. Указано је на значај функционалне хране, са посебним освртом на досадашњу потенцијалну примену фенолних екстраката или праха комине и њених конституената у формулацији различитих прехранбених производа. Наглашена је могућност формулације функционалних адитива на бази протеина козијег млека, због јединствених нутритивних и функционалних својстава овог млека. Посебно је наглашен потенцијал додавања фенолних екстраката у козије млеко, као обећавајући модел за развој нових функционалних прехранбених производа и адитива, који би додатно допринели бољем разумевању интеракција између фенолних једињења и протеина млека. На крају уводног дела је указано на значај коришћења различитих модела *in vitro* дигестије и ефекат различитих матрикса хране у анализи биодоступности фенолних једињења, као кључног параметра за предвиђање функционалне и нутритивне ефикасности ових биомолекула.

Преглед литературе. Аутор у овом поглављу приказује литературно доступне податке који су блиско повезани са предметом проучавања докторске дисертације групишући их у шест потпоглавља. У првом потпоглављу, *Грожђе-Интернационалне и аутохтоне сорте*, кандидат се позива на опште познате податке о грожђу као сировини у винској индустрији, конституентима бобице грозда и сортименту грожђа са посебним освртом на интернационалне и аутохтоне сорте грожђа. У другом потпоглављу, *Комина-споредни производ винске индустрије*, кандидат истиче важност валоризације комине и њених конституената (покожица, семенка и петелка). Даје детаљан преглед њиховог хемијског састава, са посебним освртом на дијетна влакна, моно- и олигосахариде, протеине, липиде, витамине и минерале, кроз неколико мањих потпоглавља. У трећем потпоглављу, *Комина и њени конституенти као извор фенолних једињења*, главни фокус је на фенолним једињењима која су у значајним количинама садржана у комини грожђа и њеним конституентима, и за које је познато да поседују позитиван утицај на здравље људи и испољавају различите биолошке активности. Дата је класификација фенолних једињења са посебним освртом на једињења која су испитивана и доминантно пронађена у грожђу, комини, покожици, семенки или шепурини. Указано је на значај обраде комине (сушење топлим ваздухом и лиофилизација). Наведене су предности и ограничења екстракције, изолације, карактеризације и квантификације фенолних једињења применом различитих техника. Сумирана су сва доступна истраживања везана за функционална својства и биолошку активност фенолних једињења комине и њених конституената. У четвртном потпоглављу, *Козије млеко*, дати су опште познати подаци везани за потрошњу, примену и потражњу козијег млека, са посебним освртом на његова јединствена функционална и нутритивна својства која му дају предност у односу на млека других животиња. Указано је на утицај термичког третмана на протеине козијег млека и формирање протеинских комплекса. Сумирана су сва истраживања везана за функционална својства протеина козијег млека, као и њихово понашање током *in vitro* и *in vivo* гастроинтестиналне дигестије. Дат је преглед техно-функционалних (емулгујућа и пенива својства) својства протеина козијег млека и њихових коњугата са фенолним једињењима. У петом потпоглављу, *Примена комине и њених конституената у прехранбеној индустрији*, су сумирана сва истраживања везана за валоризацију екстраката или прахова комине и њених конституената, као и њихова даља примену у формулацији различитих прехранбених производа. Истакнуте су предности и мане додавања екстраката/прахова у различите матриксе хране, као и ефекат на функционална и сензорна својства добијених производа. Посебан осврт је био на функционална, физичко-хемијска и сензорна својства ферментисаних млечних напитака на бази козијег млека коришћењем различитих *Lactobacillus plantarum* сојева. Дат је преглед радова везаних за оптимизовану производњу функционалних адитива на бази протеина млека и фенолних екстраката. У шестом потпоглављу, *Моделу симулиране гастроинтестиналне дигестије за одређивање биодоступности фенолних једињења*, дат је преглед модела и параметара за гастроинтестиналну дигестију фенолних екстраката или прахова. Сумирани су резултати за биодоступност појединачних и укупних фенолних једињења грожђа, вина, комине, семенке, покожице и шепурине, као и ефекат различитих матрикса хране на њихову

биодоступност, дигестивност и антиоксидативну активност. Посебан пажња је посвећена интеракцијама фенолних једињења са протеинима, првенствено утицају протеина млека/млека на биодоступност фенолних једињења.

Материјал и методе. Ово поглавље је подељено у десет потпоглавља са више подналова. У првом потпоглављу, *Технолошки параметри грозђа*, су одређени технолошки параметри (укупни шећери, киселине и рН) за узорке грозђа чија су семенке и покожице даље анализирани. Друго потпоглављу, *Припрема брашна семенки и покожица издвојених из неферментисане комине*, се базира на валоризацији комина, које нису ферментисале, издвојене одмах након мацерације и пресовања седам различитих интернационалних и аутохтоних сорти грозђа (Смедеревка, Италијански ризлинг, Тамјаника, Хамбург, Прокупац, Мерлот, Каберне Совињон). Конституенти осушених комина, посебно покожица и семенки су одвојени и коришћени као полазна сировина за добијање полифенолних екстраката применом два различита екстракциона средства: покожица-100% метанол+0,1%НCl и 50% етанол; семенка-80%метанол+0,1%НCl и 50% етанол. Након упаравања, суви остатак свих екстракта је реконституисан у води, што је представљало основу за даљу карактеризацију фенолних једињења. Овако добијени екстракти су даље окарактерисани коришћењем стандардних UV-Vis спектрофотометријских метода и применом хроматографских метода са масеном детекцијом (UHPLC-DAD MS/MS и UHPLC Orbitrap MS). Додатно су на узорцима покожица и семенки свих сорти, секвенционом екстракцијом изоловани и окарактерисани појединачни моно- и олигосахариди, коришћењем јоноизмењивачке хроматографије високих перформанси (HPLC) опремљене пулсно-амперометријским детектором (PAD) и дијетна влакна коришћењем ензимско-гравиметријског поступка. За брашно семенки је анализиран профил масних киселина, коришћењем гасне хроматографије, опремљене пламено јонизујућим детектором (GC-FID). Треће потпоглавље, *Припрема брашна/екстракта ферментисане комине Прокупца и њених конституената*, обухвата валоризацију комина након ферментације комина Прокупца, која је изабрана након детаљне карактеризације спроведене другом потпоглављу. Одмах након допремања узорка у лабораторију, пропремљена је: необрађена комина, комине осушена топлим ваздухом и лофилисана комине. Након тога, цела комина, као и њени конституенти семенка, покожица и петелка посебно за сваки третман, су екстраховани 80%метанола+0,1%НCl, упаравани под вакумом до сува и реконституисани у води. Овако добијени фенолни екстракти су детаљно хроматографски (UHPLC-DAD MS/MS и UHPLC Orbitrap MS) и спектрофотометријски окарактерисани. У потпоглављу четири, *Припрема функционалних адитива на бази протеина козијег млека*, су припремани функционални адитиви на бази протеина козијег млека у које су додавани фенолни екстракти семенки (TME прахови) и функционални адитиви на бази протеина козијег млека у које су додаване различите количине инулин/екстракт праха (TME прахови). Сви припремљени узорци су спреј осушени и даље окарактерисани коришћењем спектрометријских (UV Vis, ATR-FTIR и Raman спектрометрија), хроматографских (UHPLC-DAD MS/MS), електрофоретских техника (SDS-PAGE у редукујућим и нередукујућим условима и Native-PAGE). На скенирајућем електронском микроскопу (SEM) су дефинисане морфолошке карактеристике прахова, док су помоћу DLS мерења одређени Zeta (ζ) потенцијал и величина честица. За све узорке (0,1; 0,5; и 1,0% растворе) су одређена антиоксидативна и техно-функционална својства. У потпоглављу пет, *Припрема функционалних козијих јогурата и лиофилисаних козијих јогурата као функционалних адитива*, су припремани козији јогурти са/без екстракта семенки, коришћењем стартер култура и/или одабраног *L.plantarum* соја. *L.plantarum* SIL71 сој који је коришћен за ферментацију јогурта као стартер или костартер је изабран на основу резултата спектрофотометријског одређивања таназне активности, као сој са највећом таназном активншћу. Код свих јогурта су анализирана текстуална и сензорна својства. Поред наведеног, припремани су лиофилисани јогурти са циљем да се окарактерису као нови потенцијални ферментисани функционални адитиви. Сви лиофилисани јогурти и њима комплементрани неферментисани узорци као контроле су окарактерисани коришћењем спектрометријских (UV Vis, ATR-FTIR и Raman спектрометрија), хроматографских (UHPLC-DAD MS/MS) и електрофоретских техника (SDS-PAGE у редукујућим и нередукујућим условима и Native-PAGE). На скенирајућем електронском микроскопу (SEM) су дефинисане морфолошке карактеристике лиофилисаних прахова, док су за њихове 0,1; 0,5; и 1,0% растворе/колоидне растворе одређена антиоксидативна и техно-функционална својства. У

потпоглављу шест, *Припрема функционалних адитива за одређивање садржаја фенолних једињења, антиоксидативних и техно-функционалних својстава*, је описан поступак припреме метанолних екстраката функционалних адитива за UHPLC-DAD MS/MS анализу, као и поступак препреме водених раствора функционалних раствора за спектрофотометријску анализу укупних фенолних једињења, антиоксидативних (FRP, TAC, FCC, DPPH[•] и ABTS^{•+}) и техно-функционалних (емулгујућа и пенива) својстава. У потпоглављу седам, *Симулирана in vitro гастроинтестинална дигестија*, је коришћен опште прихваћен стандардизовани статички *in vitro* протокол дигестије - INFOGEST протокол, за процену биодоступности фенолних једињења из екстракта семенке и покожице грожђа које су издвојене из неферментисане комине Прокупаца без и у присуству сложеног матрикса хране. Поред тога, анализирани су одабрани неферментисани функционални адитиви (TMEЗ, TMEЗ, TMI, IE) на биодоступност и антиоксидативну активност фенолних једињења семенке грожђа након *in vitro* дигестије. У осмом потпоглављу, *Методе и инструменталне технике коришћене у докторској дисертацији*, су детаљно описане све методе и инструменталне технике које су коришћене у анализи припреманих екстраката комине и њених конституената, неферментисаних и ферментисаних функционалних адитива. Детаљно су описане спектрофотометријске методе (одређивање садржаја укупних фенолних једињења (TPC), флавоноида (TFC), про(анто)цијанидина (TPA), мономерних антоцијана (MAC) и протеина), антиоксидативна својства (Способност редукције Fe³⁺ јона-FRP, способност сакупљања ABTS^{•+} и DPPH[•] радикала, укупни антиоксидативни капацитет-TAC, мерење релативне способности сакупљања DPPH[•] радикала, способност уклањања водоник пероксида-HPS активност и способност хелирања Fe²⁺ јона-FCC) цитотоксична својства (МТТ тест и тест способност сакупљања унутарћелијских реактивних врста-CAA), хроматографске (UHPLC-DAD MS/MS и UHPLC Orbitrap MS), електорофоретске технике (SDS-PAGE у редукујућим и нередукујућим условима и Native-PAGE), ATR-FTIR и Raman спектроскопија, и SEM микроскопија. У деветом потпоглављу, *Техно-функционална својства*, је детаљно описано одређивање емулгујућих и пенивих својстава припремљених неферментисаних спреј осушених и ферментисаних лиофилисаних функционалних адитива. У десетом потпоглављу, *Статистичка обрада података*, су описани коришћени статистички тестови, модели и критеријуми за обраду резултата.

Резултати и дискусија. Резултати истраживања су обрађени у четири потпоглавља са више подналова и приказани су на прегледан начин кроз слике, табеле и текстуалну анализу, уз јасну и концизну дискусију и поређења са резултатима других сличних истраживања. У потпоглављу, *Карактеризација брашна семенки и покожица издвојених из неферментисане комине*, је показано да су сва тестирана брашна семенки имала добар састав масних киселина, односно низак садржај засићених и висок садржај незасићених масних киселина, првенствено линолне масне киселине (61,15%-83,47%). Највећи садржај линолне киселине је откривен у семенки сорте грожђа Мускат Хамбург, Италијански Ризлинг и Тамјаника. Олеинска киселина је била најзаступљенија моно-незасићена масна киселина, док је стеаринска киселина била најзаступљенија засићена масна киселина. Највећи регистрован садржај обе масне киселине је био у семенки аутохтоне сорте Прокупац. Значајна количина моно- и олигосахарида је регистрована у свим анализираним узорцима брашна семенки и покожица. У узорцима је пронађено петнаест различитих моно- и олигосахарида, међу којима су били доминантни глукоза и фруктоза. Поред наведеног, семенке свих анализираних сорти грожђа су имале висок садржај нерастворних и укупних дијетних влакана, док су код покожица зависно од сорте показане мале варијације у садржају растворних и нерастворних дијетних влакана. UHPLC-DAD MS/MS квантификација фенолних једињења у екстрактима семенки је показала доминантно присуство катехина, галне и елагинске киселине, а највиши садржај фенолних једињења је потврђен у семенки аутохтоне сорте Прокупац. Са друге стране, у екстрактима покожица од неантоцијанских фенолних једињења су доминантно потврђени кверцетин-3-О-галактозид и лутеолин-7-О-глукозид, а највиши садржај фенолних једињења је нађен у аутохтоним сортама Тамјаника и Прокупац. UHPLC Orbitrap MS карактеризација је потврдила присуство процијанидин димер и тример изомера у екстрактима семенки, као и малвидин, пеонидин, делфинидин, петунидин и цијанидин деривата у екстрактима покожица црних сорти грожђа. Највиши садржај антоцијана је потврђен у покожици интернационалне сорте Каберне Совињон, првенствено малвидин деривата као што су малвидин-3-О-глукозид и малвидин-3-О-(6"-

ацетил)хексозид. У другом потпоглављу, *Карактеризација екстракта ферментисане комине Прокупа и њених конституената*, UHPLC-DAD MS/MS анализом је одређен највиши садржај фенолних једињења (изузев флаван-3-ола и антоцијана) у екстрактима комине, покожице и семенки који нису сушене. Изузетак је шепурина са вишим садржајем фенолних једињења у осушеним узорцима. Са друге стране, UHPLC Orbitrap MS анализом је одређен највиши садржај антоцијана у екстрактима лиофилисане комине и покожице, док је садржај процијанидина и мономерних флаван-3-ола био највиши у екстрактима лиофилисане семенке. UHPLC Orbitrap MS анализом је окарактерисано и квантификовано 75 фенолних једињења (18 антоцијана и 57 осталих фенолних једињења). Први пут је регистрован садржај специфичног малвидин-3-О-хексозид-(8,8)-метилметине-(епи)катехина у воденим екстрактима покожице и целе комине, и предложен је пут његове фрагментације. Поред тога, примећен је значајан садржај етил-галата у свим анализираним узорцима, Такође, нови подаци за ове екстракте добијени су за цитотоксична својстава и антиоксидативну активност. Процијанидини (углавном процијанидин Б тип димери) и фенолне киселине (хидроксибензоеве киселине и њихови деривати) били су најзаступљенији у екстракту семенке и показано је да су јако допринели сакупљању ABTS⁺, DPPH[•] RDSC радикала и водоник-пероксида. Са друге стране, екстракт покожице је показао дозно зависну антиоксидативну активност на моделу хуманих ћелија колоректалног аденикарцинома, што се може приписати присуству флавонола и антоцијана, углавном ларицитрин-3-О-хексозида и глукозида малвидина и пеонидина. Екстракт шепурина сорте Прокупац се показао као добар извор стилбеноида. У трећем потпоглављу, *Примена екстракта семенке ферментисане комине Прокупа у формулацији прехранбених производа и адитива*, је урађена детаљна карактеризација функционалних адитива и производа на бази протеина козијег млека обогатених екстрактом семенке. *Функционални адитиви на бази протеина млека обогатених екстрактом семенке (ТМЕ)* су показали присуство интеракција између фенолних једињења и протеина козијег млека, односно WP/CN комплекса. Повећање количине екстракта у припремљеним ТМЕ праховима је утицало на повећање антиоксидативних својстава, као што су TAC, FRP, ABTS⁺, DPPH[•] активност, чему су највише допринела фенолна једињења (гална киселина, катехин и процијанидини) као и протеина козијег млека, првенствено на способност хелирања Fe²⁺ јона. Сви прахови (М, ТМ и ТМЕ) су показали унимодалну расподелу величине честица и ζ-потенцијал већи од -36 mV. ТМЕ прахови са различитим садржајем екстракта семенке су имали различиту дистрибуцију величине честица, међутим вредности за ζ-потенцијал ТМЕ узорака се нису значајно разликовале у поређењу са вредношћу за ТМ узорак. ATR-FTIR и Ramан спектроскопије у комбинацији са PCA анализом су показале промене у секундарној структури протеина млека (β-набрана структура, насумични структурни намотаји и α-хеликс/великих петљи), измењене вибрације неких аминокиселинских остатака -PO₃²⁻ групе и ν(C-C) истезања ароматичног прстена. Ове промене су узроковане примењеним термичким третманом, присуством слободних фенолних једињења, интеракцијама WP/CN комплекса и фенолних једињења и присуством производа Maillard-ових реакција. SEM анализа је показала различиту морфологију и облик честица М, ТМ и ТМЕ прахова, као последицу примењеног спреј сушења, термичког третмана и фенолна једињења-WP/CN интеракција. Повећање садржаја екстракта семенке у ТМЕ праховима доводи до смањења садржаја протеина. 0,1% раствори М, ТМ и ТМЕ прахова су показали добра емулгујућа својства и лошу способност стабилизације пене (осим CM узорка). Са друге стране, 0,5% и 1,0% раствори су показали слабија техно-функционална својства, што се може повезати са повећаним садржајем протеина у растворима који остају неапсорбовани на површини уље/вода или ваздух/вода. *Функционални адитиви на бази протеина козијег млека обогатени прахом инулин/екстракт семенке (ТМIE)*, су показали добра антиоксидативна и емулгујућа својства. UHPLC-DAD MS/MS анализа је показала повећан садржај фенолних једињења у ТМIE праховима са повећањем количине инулин/екстракт праха у формулацијама. Међутим, ТМIE прахови са већим садржајем IE праха у формулацији, као и сам IE прах су показали полимодалну (бимодалну) дистрибуцију. На основу резултата за величину честица и SEM слика, уочено је присуство мањих честица које могу потицати од I/WP/CN и IE/WP/CN растворних комплекса који су се одвојили са површине казеинске мицеле ТМI и ТМIE прахова. Интеракције фенолних једињења и/или инулина са протеинима су такође претпостављене на основу резултата електрофоретских анализа и садржаја укупних протеина. Међутим, повећане количине IE праха у ТМIE формулацијама утичу на повећано присуство

IE/WP/CN растворних комплекса као и на повећано присуство слободних фенолних једињења (одређени UHPLC-DAD MS/MS анализом) и IE честица које нису реаговале са присутним казеинским мицелама. Претпостављени модели су додатно потврђени ATR-FTIR и Raman спектроскопијама и PCA одвајањима. Уочене су променама у секундарној структури протеина и измењеним вибрацијама аминокиселинских остатака, које се јављају због интеракција инулина и фенолних једињења са WP/CN комплексима. Поред тога, измењене вибрације неких аминокиселинских остатака се могу јавити као одговор на измењену површину мицеле након одвајања IE/WP/CN комплекса. Због мултикомпонентног састава, 0,1% раствори IE и TMIE узорака су показали добра емулгујућа својства. Међутим, даље повећање садржаја узорака у раствору (0,5% и 1%) је утицало на смањење EAI и ESI вредности, што резултира слабијим емулгујућим својствима. Сви TMIE раствори су показали лоша пенива својства, а формиране пене биле су растресите са великим мехурима ваздуха, док IE раствори уопште нису показали пенива својства. *Јогурти са екстрактом семенке*, који су ферментисани са стартером и одабраним *L. plantarum* сојем су показали добра текстурална и сензорна својства, а њихови лиофилисани прахови најбоља антиоксидативна и емулгујућа својства, у поређењу са другим анализираним јогуртима. У јогуртима и лиофилисаним јогуртима који су ферментисани само са *L. plantarum* није примећена протеолитичка активност. ATR-FTIR и Raman спекторскопија различито групишу узорке лиофилисаних јогурта у амид регионима, што се објашњава различитим вибрационим карактеристикама биомолекула. Међутим, ове две вибрационе технике се идеално допуњују у интерпретацији резултата мултикомпонентних узорака, и конкретно на овим модел узорцима због специфичних груписања/одвајања у анализираним регионима: (1) указују на специфичне интеракције између потенцијално присутних егзополисахарида и протеина, као и фенолних једињења и протеина; (2) прате утицај микробних култура и њихов афинитет према појединачним макроконституентима (липидима и протеинима). Такође је показана веза између ATR-FTIR одвајања и резултата сензорне анализе која указује на липолитичку активност коришћеног *L. plantarum* соја. UHPLC-DAD MS/MS анализа указује на потенцијалну ензимску деградацију галне киселине. Међутим ове резултате треба додатно потврдити у будућим истраживањима. На SEM сликама се могу уочити потенцијални филаменти егзополисахарида које луче бактерије. Ови филаменти су одсутни код лиофилисаних јогурта са додатком екстракта. Сви лиофилисани јогурти који су ферментисани са *L. plantarum* су показали високу вијабилност ћелија ($>10^8$ ЦФУ/г СМ), па се ови прахови могу сматрати потенцијално пробиотичким производима. Штавише, највећи број вијабилних бактерија је нађен у лиофилисаном праху са екстрактом који је примарно ферментисан стартер културом и *L. plantarum*, чак $2,86 \cdot 10^9$ CFU/g SM. У четвртном потпоглављу, *Утицај матрикса хране на антиоксидативна својства и биодоступност фенолних једињења*, је анализирана биодоступност фенолних једињења покожице и семенке у присуству различитих матрикса. Биодоступност укупних фенолних једињења, изузев флаван-3-оли, из екстракта семенке је била скоро два пута мања након дигестије, у поређењу са екстрактом покожице грожђа, што би се могло објаснити ослобађањем хидроксициметних киселина (кофеинске и *p*-кумаринске), из екстракта покожице грожђа. Значајан губитак процијанидина и флаван-3-ола, са биодоступношћу од само 0,23% је потврђен након *in vitro* дигестије екстракта семенке, због њихове снажне способности да реагују и да се везују за компоненте дигестивног коктела. Додатак и мешање матрикса хране (месо, житарице) са екстрактом покожице грожђа није значајно утицао на биодоступност главних полифенола из покожице, у поређењу са њиховом дигестијом без матрикса хране, али је биодоступност главних класа полифенола била значајно нижа због значајног доприноса полифенола пореклом из матрикса хране на укупну количину фенолних једињења у узорку пре дигестије. Са друге стране, додавање и мешање матрикса хране са екстрактом семенке повећало је биодоступност процијанидина, флаван-3-ола и осталих полифенола у поређењу са њиховом дигестијом без матрикса хране, што је у складу са биодоступношћу флавоноида. Укупна биодоступност фенолних једињења из екстракта покожице и семенке у присуству матрикса на бази меса и житарица је било 44,1% и 50,9%. Поред тога, *in vitro* дигестија је значајно повећала укупан садржај фенолних једињења и антиоксидативна активност (хелирање и способност сакупљања ABTS радикала) код оба екстракта грожђа (покожица и семенка) након дигестије са матриксом хране, у поређењу са контролом дигестије, што би се осим ослобођених фенолних једињења, редукујућих шећера,

пептида и аминокиселина, могло приписати значајним редукционим својствима других састојака матрикса хране, попут хидролизата протеина меса. Такође не треба занемарити допринос дигестивног коктела и једињења матрикса хране на укупан садржај фенолних једињења и антиоксидативну активност. Са друге стране, биодоступност фенолних једињења екстракта семенки у присуству термички третираног козијег млека је била 18,11%. Значајно мање искоришћење фенолних једињења је потврђено у присуству комплексног матрикса који укључује протеине козијег млека и инулин, само 6,03%. Ниско или одсуство биодоступности укупних и појединачних фенолних једињења може бити последица њихове смањене стабилности и трансформације у интестиналном флуиду или последица задржавања у нерастворној фракцији, која може потенцијално бити доступна за ослобађање у фази дебелог црева. Електрофоретском анализом растворљиве фракције је показано потпуно одсуство полипептидних трака пореклом од дигерираних протеина козијег млека, код оба анализирана матрикса, што значи да су се током *in vitro* гастроинтестиналне дигестије ослободили мали пептиди и аминокиселине. Са друге стране, биодоступност фенолних једињења у присуству инулина је било значајно више у поређењу са протеинским матриксима (43,26%), чему највише доприноси биодоступност катехина, чак 64,13%. На основу добијених резултата се може закључити да се у присуству инулина већина фенолних једињења ослободи у интестиналној фази, док су у присуству протеинских матрикса већина фенолних једињења остала у нерастворној фракцији, што их потенцијално чини доступним у „colon“ фази. Сви примењени антиоксидативни тестови (осим FCC) су показали више вредности у дигерираним ТМЕ и ТМЕ узорцима, у поређењу са дигерираним ТМ узорком, што указује на добру антиоксидативну активност биодоступних фенолних једињења. Дигестивни коктел је такође показао антиоксидативни потенцијал, што треба узети у обзир при тумачењу ових резултата. Имајући у виду допринос дигестивног коктела на антиоксидативна својства узорака, показало се да дигерирани ТМЕ узорак који садржи дигестивни коктел има смањену ТАС (за 34,56%) и FRP (за 30,45%) активност, у поређењу са недигерираним узорком, док су код дигерираних ТМЕ и IE узорака вредности за сва испитивана антиоксидативна својства била мања, у поређењу са добијеним вредностима за њихове недигерираних узорке. Ово смањење антиоксидативних својстава може бити због ниске биодоступности фенолних једињења и њихове деградације и трансформације током дигестије.

Закључак. У овом поглављу су сумирани резултати експерименталних истраживања и изведени релевантни закључци. Резултати карактеризације су показале да су семенке неферментисаних аутохтоних и интернационалних сорти грожђа добар извор масних киселина (првенствено линолна масна киселина), нарастворних и укупних дијетних влакана, као и фенолних киселина (првенствено галне и елагинске киселине), флаван-3-ола и процијанидина. Покожице неферментисаних аутохтоних и интернационалних сорти грожђа су се показале као добар извор дијетних влакана фенолних киселина, флавонола (кверцетин, изорамнетин и кампферол деривата) и код црних сорти антоцијана (деривати малвидина и пеонидина). Међу анализираним узорцима се посебно издвајају семенке Прокупаца због свог јединственог профила масних киселина, добрих нутритивних параметара квалитета, високог садржај дијетних влакана и доминантног садржаја укупних фенолних једињења. UHPLC Orbitrap MS анализом лиофилисаних узорака комине и н+њених конституената је утврђено детектовано укупно 75 једињења, од чега је 34 фенолна једињења први пут у овој студији идентификовано и квантификовано у полифенолним екстрактима комине Прокупаца. Екстракт шепурине сорте Прокупац се показао као добар извор стилбеноида (ресвератрола и његових деривата). Показана је добра антиоксидативна активност екстракта лиофилисаних семенки, чему су највише допринели процијанидини (процијанидин Б тип димери) и фенолне киселине (хидроксибензоеве киселине и њихови деривати). Екстракт лиофилисане покожице је једини показао ћелијску антиоксидативну активност на моделу хуманих ћелија колоректалног аденокарцинома, што је корелирало са присуством флавонола (првенствено ларицитрин-3-О-гликозида) и антоцијана (деривата малвидина и пеонидина). Екстракт семенки су успешно инкорпорирани у неколико функционалних адитива на бази козијег млека и јогурата ферментисаних стартером и одабраним *L.plantarum* сојем, што представља занимљиву и иновативну стратегију у искоришћењу отпада у формулацији функционалних производа на бази козијег млека. Функционални адитиви добијени додатком екстракта семенки грожђа (ТМЕ прахови) или инулин/екстракт праха (ТМЕ

прахови) у термички третирано козије млеко су показали добра антиоксидативна својства, док су 0,1% водени раствори показали добра емулгујућа и лоша пенива својства. Показано је присуство интеракција између фенолних једињења и протеина козијег млека, односно WP/CN комплекса, што је приказано и моделом дистрибуције фенолних једињења на казеинској мицели термички третираног козијег млека, што може допринети разумевању интеракција фенолних једињења и протеина, односно будућим истраживањима фокусираних на биодоступност фенолних једињења током дигестије. На основу детаљне карактеризације функционалних ТМIE прахови, предложени су модели дистрибуције инулина и фенолних једињења у мултикомпонентним ТМI и ТМIE праховима. Сумирајући добијене резултате за техно-функционална својства, предложени су шематски прикази дистрибуције ТМ, ТМЕЗ, ТМI, ТМIEЗ и IE раствора на међуфазама уље/вода и ваздух/вода. Јогурти са екстрактом семенке, који су ферментисани са стартер културом и одабраним *L. plantarum* сојем су показали добра текстуална и сензорна својства, а њихови лиофилисани прахови најбоља антиоксидативна и емулгујућа својства, у поређењу са другим анализираним јогуртима и лиофилисаним праховима. Сви лиофилисани јогурти који су ферментисани са *L. plantarum* сојем су показали високу вијабилност ћелија, па се ови прахови могу сматрати потенцијално пробиотичким производима. Биодоступност фенолних једињења из покожице и семенки грожђа након *in vitro* дигестије била је различита и зависна од састава матрикса хране, и кретала се од 6,03% за матрикс козије млеко/инулин до 50.9% за матрикс месо/житарице. Протеини нису детектовани у растворним фракцијама дигерираних функционалних адитива. Дигерирани функционални адитиви показали су смањена (осим код месо/житарице матрикса) антиоксидативна својства у односу на недигериране узорке, што је било у корелацији са смањеном биодоступношћу фенолних једињења.

Литература. У дисертацији су на правилан начин наведене 534 литературна извора. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

Прилози. Ово поглавље садржи два дела. У првом делу су табеле са подацима за карактеризацију (MS^2 , MS^3 и MS^4 фрагменти за свако једињење појединачно) и квантификацију (линеарне једначине, корелациони коефицијенти, лимит детекције, лимит квантификације) фенолних једињења. У другом делу су слике ферментисане спрашене комине, семенке, покожице и шепурине Прокупца, затим слике ТМ, ТМЕ, ТМI, ТМIE и IE прахова, Раман спектар чистог инулина, и UV хроматограм ТМЕЗ узорка, на 254nm и 280nm.

5. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ДИСЕРТАЦИЈЕ

Реализацијом ове дисертације детаљно је окарактерисана комина различитих сорти грожђа, утицај начина обраде на фенолне профиле екстакта што значајно доприноси њеној валоризацији. Дисертације укључује формулацију и детаљну карактеризацију три различите врсте функционалних адитива и једног функционалног напитка, који могу наћи примену у прехранбеној индустрији. Допринос ове дисертације огледа се и у разумевању интеракција између фенолних једињења и протеина млека током формулације и утицаја на антиоксидативна, функционална и техно-функционална својства, и биодоступност након *in vitro* дигестије што се може применити и на друге модел системе.

6. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ

У сарадњи са другим ауторима кандидат је написао шест научних радова који су садржински повезани са дисертацијом и објављени у међународним научним часописима који се налазе на SCI листи. Радови су наведени у ПРИЛОГУ.

7. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу анализе докторске дисертације под насловом: „Споредни производи винске индустрије као извор биоактивних једињења: карактеризација и могућност примене у прехранбеној индустрији“, коју је поднео Данијел Д. Миљинчић, маг. инж. технол., Комисија сматра да је дисертација урађена према одобреној пријави теме и да представља оригинално и самостално научно дело.

У уводу и Прегледу литературе кандидат је детаљно анализирано доступне литературне податке везане за валоризацију споредних производа винске индустрије, њихову даљу примену у формулацији прехранбених производа и адитива, анализу биодоступности фенолних једињења из комине и њених конституената применом различитим *in vitro* гастроинтестиналних модела и успешно образложио тематику докторске дисертације. На основу прегледа литературе предмет и циљеви истраживања су правилно дефинисани и постављени, а програм истраживања је добро осмишљен. Методе примењене у експерименталном делу су савремене и поуздане. Добијени резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и упоређени са резултатима других аутора. Из резултата су правилно изведени закључци.

Научни допринос докторске дисертације је пре свега могућност валоризације споредних производа винске индустрије, који могу бити јефтин извор фенолних једињења погодних за развој функционалних производа, док се њиховим искоришћењем истовремено омогућава заштита животне средине и подиже еколошка свест. Формулосани су функционалних адитива на бази протеина козијег млека који су обogaћени екстрактом комине и инулин/екстракт прахом. Произведени су иновативни јогурти са/без додатка екстракта семенке, а по први пут је у ове сврхе као стартер или костартер коришћен сој *L.plantarum* SIL71. Штавише, лиофилисани јогурти који су ферментисани са одабраним *L.plantarum* сојем су високу вијабилност ових бактерија и потенцијалну пробиотичка својства, која треба додатно испитати. Детаљном карактеризацијом припремљених функционалних адитива омогућено је разумевање интеракција фенолна једињења и протеин млека, предложени су модели ових интеракција у растворима, емулзијама и пенама. Поред наведеног, анализирана је биодоступност појединачних и укупних фенолних једињења у присуству различитих матрикса хране. Резултати дисертације могу наићи на разумевање и ширу експертизу у прехранбеној технологији, фармацији и медицини. Произведени и окарактерисани функционални адитиви се могу успешно користити као функционални адитиви, или суплементи са додатом вредношћу.

Имајући у виду квалитет, обим и научни допринос постигнутих и приказаних резултата, Комисија предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да позитивно оцени и прихвати овај Извештај, заједно са поднетом дисертацијом кандидата Данијела Д. Милинчића, маг. инж. технол., под насловом: „**Споредни производи винске индустрије као извор биоактивних једињења: карактеризација и могућност примене у прехранбеној индустрији**“ и да након завршетка процедуре омогући кандидату јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Београд-Земун
Датум: 30.3.2023. године

Чланови Комисије:

др Слађана Станојевић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Александар Костић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Александар Петровић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Немања Станисављевић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

др Урош Гашић, виши научни сарадник,
Универзитет у Београду, Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од националног значаја Републике Србије

ПРИЛОГ

У сарадњи са другим ауторима кандидат је написао шест научних радова који су садржински повезани са дисертацијом и објављени у међународним научним часописима који се налазе на SCI листи.

Референце:

1. Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Kostić, A. Ž., Gašić, U. M., Stanojević, S. P., Tešić, Ž. L., & Pešić, M. B. (2022). Bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant properties of goat-milk powder fortified with grape-pomace-seed extract after in vitro gastrointestinal digestion. *Antioxidants*, 11(11), 2164. <https://doi.org/10.3390/antiox11112164>.
2. Milinčić D.D., Stanisavljević N.S., Kostić A.Ž., Soković Bajić S., Kojić M.O., Gašić U.M., Barać M.B., Stanojević S.P., Tešić Ž.Lj., Pešić M.B. (2021): Phenolic compounds and biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red variety. *LWT- Food Science and Technology* (ISSN: 0023-6438, IF2019 = 4,952 *Food Science and Technology* 29/144), 138, 110739. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110739>
3. Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Gašić, U.M., Lević, S., Stanojević, S.P., Barać, M.B., Tešić, Ž.Lj., Nedović, V., Pešić, M.B. (2021): Skimmed goat milk powder enriched with grape pomace seed extract: Phenolics and protein characterization and antioxidant properties. *Biomolecules* (ISSN: 2218-273X; IF2019=4.082. *Biochemistry and Molecular Biology*, 98/297) 11(7): 965; <https://doi.org/10.3390/biom11070965>
4. Milinčić, D.D., Kostić, A. Ž., Špirović Trifunović, B. D., Tešić, Ž. Lj., Tosti, T.B., Dramićanin, A. M., Barać, M.B., Pešić, M. B. (2020): Grape seed flour of different grape pomaces: Fatty acid profile, soluble sugar profile and nutritional value. *Journal of Serbian Chemical Society* (IF2019=1.097, *Chemistry, Multidisciplinary*, 138/177) 85(3): 305-319 <https://doi.org/10.2298/JSC190713117M>
5. Pešić, M.B., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Stanisavljević, N. S., Vukotić, G. N., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barać, M. B., Stanojević, S. P., Popović, D. A., Banjac, N. R., Tešić, Ž. Lj. (2019): In vitro digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? *Food Chemistry* (ISSN: 0308-8146; IF2019=6,306, *Food Science and Technology* 6/139), 284:28-44 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.107>
6. Milinčić D. D., Popović A. D., Lević, S. M., Kostić, A. Ž., Tešić Ž. Lj. Nedović V. A. and Pešić, M. B. (2019): Application of polyphenol-loaded nanoparticles in food industry. *Nanomaterials*, (ISSN: 2079-4991; IF2019=4.324. *Material Science, Multidisciplinary*, 89/314), 9 (11): 1629 <https://doi.org/10.3390/nano9111629>

Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације: „Споредни производи винске индустрије као извор биоактивних једињења: карактеризација и могућност примене у прехранбеној индустрији“ аутора Данијела Милинчића, констатујем да утврђено подударање текста износи 6%. Овај степен подударности последица је библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, назива инструмената, произвођача и хемијских једињења, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду, 3.3.2023.

Ментор

Проф. др Мирјана Пешић