

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

Датум: 27.11.2024.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Душанке А. Поповић Минић, мастер инжењера прехрамбене технологије.

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета Универзитета у Београду број: 32/1-5.1. од .30.10.2024. године, именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: „**Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстракта гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus***“, кандидата Душанке А. Поповић Минић, мастер инжењера прехрамбене технологије.

Комисија у саставу: др Ивана Средовић Игњатовић, ванредни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Јелена Миоциновић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Анита Клаус, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Немања Станисављевић, виши научни сарадник Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, др Јована Петровић, 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

1. ОСНОВНИ ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ И ДИСЕРТАЦИЈИ

Основни подаци о кандидату. Душанка (Александар) Поповић Минић је рођена у Београду 13.10.1993. године, где је завршила основну школу и Четрнаесту београдску гимназију (природно-математички смер), обе као носилац Вукове дипломе. На Пољопривредном факултету је 2012. године уписала основне академске студије на смеру Прехрамбена технологија, модул Технологија конзервисања и врења, које је завршила 2016. године са просечном оценом 9,98 и оценом 10 на завршном раду из области технолошке микробиологије. Добитница је награде Задужбине Николе Спасића за најбољег студента треће године Пољопривредног факултета, као и похвалнице за изузетан успех током студија од матичног факултета. Мастер студије је завршила 2017. године такође на Прехрамбеној технологији, модул Микробиологија хране и животне средине са просечном оценом 9,83 и оценом 10 на мастер раду из области технолошке микробиологије и технологије јаких алкохолних пића.

Исте године на Пољопривредном факултету уписала је докторске студије на Катедри за хемију и биохемију, где је у периоду од 2017. до 2019. године била ангажована као хонорарни сарадник на предмету Основи биохемије. Положила је све испите на докторским студијама са просеком 10,00. Изабрана је у звање истраживач приправник 2018. године, а у звање истраживач сарадник 2020. године. Током свих нивоа студија била је стипендиста Министарства просвете, науке и

технолошког развоја (студентска стипендија; стипендија за изузетно надарене студенте; стипендија за студенте докторских академских студија). Била је учесница једног националног пројекта („Коришћење биљних извора протеина, дијеталних влакана и антиоксиданаса у производњи хране“, TR 31069), а током 2022. године била је учесница пројекта „*Functional products based on goat's milk proteins and bioactive compounds extracted from grape pomace and edible mushrooms – FUNPRO*“ Фонда за науку Републике Србије у оквиру позива ИДЕЈЕ.

До сада је као аутор или коаутор објавила двадесет научних радова и саопштења, од тога једно поглавље (M13), пет радова (2 рада у категорији M21a, 2 рада у M21, један у категорији M51) и четрнаест саопштења са конференција (категирије M34 и M64). Била је рецензент у часописима *Foods* и *International Journal of Molecular Sciences*. Области истраживања су хемија, биохемија и микробиологија хране и базиране су на конституентима хране, њиховим интеракцијама, биоактивним супстанцама, дигестији хране, функционалним и техно-функционалним својствима хране.

Основни подаци о дисертацији. Школске 2017/2018. године кандидат је уписао 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 61206-4491/2-19 од 12.11.2019. године. За ментора докторске дисертације је одређена др Мирјана Б. Пешић, редовни професор Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду. Докторска дисертација Душанке Поповић Минић, мастер инжењера прехранбене технологије, под насловом: „**Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстракта гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus***“ написана је у складу са „Упутством о облику и садржају докторске дисертације која се брани на Универзитету у Београду“, на укупно 240 страна, од којих је 216 нумерисано. Ненумерисани делови дисертације су: насловне стране на српском и енглеском језику, страница са информацијама о члановима комисије, странице са захвалницом, странице са сажетком (*Abstract*) на српском и енглеском језику са кључним речима, странице са садржајем, листом скраћеница, слика и табела. Нумерисани део дисертације садржи следећа поглавља: Увод (стр. 1-2), Преглед литературе (стр. 3-40), Материјал и методе (стр. 41-53), Резултати и дискусија (стр. 54-155), Закључци (стр. 156-159), Литература (стр. 160-203), Биографија аутора (стр. 204), Прилози (стр. 205-216). Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, и Резултати и дискусија су подељени на више потпоглавља. У оквиру дисертације приказано је 59 слика и 26 табела. Цитирано је 559 литературних извора.

2. ПРЕДМЕТ И ЦИЉ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Предмет истраживања ове дисертације је формулација нових функционалних производа на бази протеина козјег млека и екстракта јестивих и лековитих гљива из рода *Laetiporus* и *Agaricus*, што проширује постојећу употребу козјег млека и ових гљива у производњи функционалне хране. Поред тога, детаљном биохемијском карактеризацијом добијених производа, оптимизацијом поступка њиховог добијања, испитивањем биодоступности и примене, доприноси се проширењу постојећег знања у области хемије и биохемије хране.

3. ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ ОД КОЈИХ СЕ ПОЛАЗИЛО У ИСТРАЖИВАЊУ

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

- Термички третирано и нетретирано козје млеко и њихове казеинске фракције поседују различита функционална и техно-функционална својства.
- Екстракти гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus* представљају извор биоактивних компонената.
- Додатак екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus* нетретираном козјем млеку и термички третираном козјем млеку ће као резултат имати протеинске производе са побољшаним функционалним и техно-функционалним својствима у односу на почетне узорке.
- Биохемијска карактеризација и испитивање функционалних и техно-функционалних карактеристика указаће на могућност примене оваквих добијених протеинских производа у прехранбеној индустрији као функционалних адитива.

4. КРАТАК ОПИС САДРЖАЈА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. Уводно поглавље засновано је на предмету истраживања докторске дисертације. Указано је на промене начина савременог живота, развој функционалне хране, значај проучавања млека и млечних производа, а указано је и на козје млеко у светлу профитабилније алтернативе крављем млеку. Наглашено је да студије које се баве интеракцијама конституената козјег млека са другим супстанцама недостају, као и студије везане за проучавање структуре казеинске мицеле козјег млека и адитива на бази козјег млека. Дат је осврт и на биолошка и нутритивна својства гљива због којих су оне обухваћене великим бројем научних радова, као и то да се користе за фортификацију различитих врста прехранбених производа, али не и млека. Аутор такође наглашава да је неопходно повећати обим научних истраживања везаних за примену техника експерименталног дизајна у науци о храни, као и на растуће тржиште функционалне хране и производа на бази гљива. На крају уводног поглавља побројани су и циљеви истраживања.

Преглед литературе. Кандидат је у овом поглављу обухватио литературне податке повезане са тематиком истраживања докторске дисертације и груписао их у пет потпоглавља. У првом потпоглављу под насловом *Функционална храна*, кандидат се осврнуо на историјат функционалне хране, затим је указано на различите дефиниције функционалне хране, регулаторна тела које проверавају тврдње о здравственом бенефиту функционалних производа у Европи и Америци, уз осврт на превазилажење проблема у овој области. У потпоглављу *Адитиви*, поред историјата коришћења адитива, њиховог дефинисања и основне поделе, поменут је однос конзумента према адитивима, студија о заступљености адитива у прехранбеним производима, трендови на тржишту хране, као и предности и ограничења коришћења адитива природног порекла.

У трећем потпоглављу под називом *Козје млеко* приказани су подаци о основном хемијском и нутритивном саставу козјег млека уз упоредни приказ са крављим и хуманим млеком, затим протеини козјег млека, њихова подела на казеине и серум-протеине, уз посебан осврт на структуру казеинске мицеле (поднаслови *Хемијски састав и нутритивна својства козјег млека* и *Протеини козјег млека*). Поднаслов *Термички третман козјег млека* обухвата промене протеина услед загревања, формирање WP/CN комплекса и поређења са променама на протеинима крављег млека, док се у поднаслову *Техно-функционална својства козјег млека* кандидат осврнуо на пенива и

емулгујућа својства козјег млека и њихових протеина. У поднаслову *Функционална својства и примена козјег млека и козјих млечних производа* побројани су различити здравствени бенефити козјег млека и његових пептида, протеина и осталих компонената (антимикробно дејство, антидијабетско, антиинфламаторно, пребиотско, итд.). Последњи поднаслов у овом потпоглављу (*Конституенти крављег млека као носачи супстанци од интереса*) бави се техникама и примерима примене конституената крављег млека у преносу и инкапсулацији различитих супстанци. Четврто потпоглавље под називом *Јестиве гљиве* обухвата поднаслов *Хемијски састав и нутритивна својства гљива са нагласком на биолошку активност*, где је указано на биохемијски састав гљива и њиховог ћелијског зида, а кандидат посебно наглашава биоактивну улогу полисахарида и протеина гљива. Поднаслови *Agaricus blazei* и *Laetiporus sulphureus* обухватају детаљан опис њихових компонената (полисахариде, протеине, липиде, фенолна једињења, терпене и терпеноиде, као и друга једињења). У *Примени гљива у производњи функционалних прехранбених производа* побројани су функционални производи на бази гљива уз објашњење предности њиховог коришћења, док је дат посебан осврт на примену гљива у производњи функционалних млечних производа, као што су јогурт, сир, кефир, сирни намаз, итд. У петом потпоглављу насловљеном *Експериментални дизајн и оптимизација* аутор се фокусирао на употребу експерименталног дизајна, поређење једноваријабилних и мултиваријабилних статистичких метода, опис методологије одговора површина, као и централног композитног и фракционог факторијског дизајна.

Материјал и методе. Ово поглавље подељено је у деветнаест потпоглавља са више поднастова. Прво потпоглавље (*Обезмашћивање узорака млека*) објашњава поступак обезмашћивања уз податак о пореклу млека. У другом потпоглављу *Одређивање садржаја укупних протеина, казеина и серум протеина у млеку* дат је поступак и резултат одређивања просечног протеинског састава млека. Треће потпоглавље *Термички третман и фракционисање узорака млека* описује како је део обезмашћеног млека термички третиран на 90 °C 10 минута. Овде је такође описано и фракционисање казеина нетретираног и термички третираног млека изоелектричном преципитацијом на рН вредности 4,2. Аутор након ових описа сумира да су овако добијена четири узорка – обезмашћено термички нетретирано млеко (RM), термички третирано обезмашћено млеко (TRM), казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN), казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN). Наводи се да је већи део овако припремљених узорака лиофилизован и коришћен у експериментима након реконституције, док су на течним узорцима извршена DLS (динамичко расејање светлости – *Dynamic Light Scattering*) мерења и припрема за електрофоретске анализе (разблаживање у одговарајућим пуферима). Потпоглавље *Добијање екстракта гљива* обухвата део где је дато порекло коришћених гљива *Agaricus blazei* Murrill *ss.* *Heinet* и *Laetiporus sulphureus*, као и кратак опис добијања осушеног праха ових гљива. Овде су такође у два поднастова дате процедуре за добијање водених (водени екстракт *A.blazei* – VA и водени екстракт *L. sulphureus* – VL) и полисахаридних екстракта гљива (полисахаридни екстракт *A.blazei* – PA и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* – PL). Пето потпоглавље *Припрема мешавина козјег млека и екстракта гљива* описује процедуру добијања мешавина растварањем лиофилизованог праха екстракта гљива у реконституисаном млеку. Аутор је овде дао преглед назива и скраћеница узорака мешавина. У шестом потпоглављу *Одређивање садржаја протеина* дат је приказ методе по Брадфорду, док потпоглавље седам насловљено као *Одређивање садржаја глукана* приказује методу одређивања садржаја α - и β - и укупних глукана. Следеће потпоглавље – *Анализа фенолних једињења - UHPLC-DAD MS/MS анализа* описује методу за испитивања

фенолних једињења од интереса. Овде су такође наведена фенолна једињења коришћена као стандардна, као и начин припреме узорака. У потпоглављу *DLS мерења ζ-потенцијала и величине честица* дат је кратак приказ ове методе. Десето потпоглавље *Електрофоретске анализе* подељено је на три поднаслова. У првом поднаслову дата је процедура припреме пуфера за узорке, узорака и стандарда за анализу; други поднаслов бави се нативном полиакриламидном гел електрофорезом (Native PAGE); трећи поднаслов описује SDS полиакриламидну гел електрофорезу у редукујућим (SDS-R-PAGE) и нередукујућим условима (SDS-NR-PAGE). У једанаестом и дванаестом потпоглављу (*FTIR спектроскопија* и *Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)*, респективно) дат је приказ коришћених метода и уређаја за анализу мешавина протеина козјег млека и екстракта гљива. У тринаестом потпоглављу (*Експериментални дизајн*) аутор објашњава даљи ток дисертације и примену експерименталног дизајна како би се на систематичан начин пронашли оптимални услови припреме адитива и уочиле интеракције између различитих фактора. Први поднаслов овог потпоглавља описује припрему мешавина протеина козјег млека и екстракта гљива за експериментални дизајн, док други поднаслов описује фракциони факторијски дизајн (FFD), помоћу кога је испитиван утицај пет фактора (независно променљиве) на три антиоксидативна својства (одговори; зависно променљиве). Аутор је овде дао објашњења коришћења одређених нивоа параметара на основу искуствених и литературних података, као и шему експерименталних фактора и њихових нивоа код FFD. У четрнаестом потпоглављу, *Одређивање антиоксидативних својстава*, дат је приказ процедура одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест), способности хелирања јона Fe^{2+} (FCC тест), способности редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ; FRP тест), као и укупног антиоксидативног редукујућег капацитета (садржај укупних фенолних једињења; TPC). Потпоглавље *Одређивање техно-функционалних својстава* обухвата процедуре одређивања пенивих и емулгујућих својстава које су испитиване током експерименталног дизајна и на оптимизованим адитивима. У шеснаестом поглављу (*Одређивање антимикуробне активности*) приказана је микродилуциона метода за одређивање антимикуробних својстава на по шест патогених бактерија и микромицета, како би се добиле минималне инхибиторне (MIC - *minimum inhibitory concentrations*), минималне бактерицидне (MBC - *minimum bactericidal concentrations*) и минималне фунгицидне концентрације (MFC - *minimum fungicidal concentrations*). Седамнаесто потпоглавље насловљено *Симулирана in vitro гастроинтестинална дигестија* обухвата детаљан протокол *in vitro* гастроинтестиналних дигестија (ГИД) уз табеларно приказан састав основних раствора и симулираних дигестивних сокова. У потпоглављу осамнаест насловљеном *Убацивање оптимизованог адитива у дехидрисане супе – модел* аутор објашњава да су ради испитивања својстава оптимизованих адитива у склопу прехранбеног производа, као и ради финализације истраживања припремљене дехидрисане супе са додатком оптимизованих мешавина са гљивама *A. blazei* и *L. sulphureus*. У овом потпоглављу дат је састав три узорка супа направљених према рецептури из литературе, као и састав три узорка базирана на комерцијалним супама. У последњем потпоглављу Материјала и метода, *Обрада података*, описани су коришћени статистички тестови и софтвери за обраду резултата.

Резултати и дискусија. Резултате истраживања аутор је изнео у осам потпоглавља са више поднаслова. Резултати су приказани прегледно, јасно и концизно кроз текстуалну анализу, слике и табеле, док је дискусија дата заједно са поређењима са резултатима релевантних истраживања у областима које се тичу теме дисертације. У првом потпоглављу *Биохемијска карактеризација екстракта гљива* показано је да су водени екстракти гљива имали висок садржај протеина (34,06

$\pm 0,61 - 56,2 \pm 0,91$ g/100 g). Аутор наводи да су варирања у структури и биолошкој активности веома честа код гљива. Испитивања садржаја глукана указала су на нижи садржај глукана у односу на литературу, као и на већи садржај укупних, α - и β -глукана у VA у односу на PA и обрнуто, на нижи садржај укупних, α - и β -глукана код VL у односу на PL. UHPLC-DAD MS/MS анализа садржаја фенолних једињења у екстрактима *A. blazei* и *L. sulphureus* је показала да су од 13 стандарда код *A. blazei* нађена само два фенолна једињења – ескулетин и кофеинска киселина, док код *L. sulphureus* није пронађено ниједно од 13 стандардних једињења. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет, тј. укупни садржај фенолних једињења (TPC) за VL био је скоро дупло мањи у односу на VA. Аутор наводи и да су приноси фенолних једињења већи уколико се користе друга екстракциона средства, али да је због безбедности употребе као прехранбеног адитива направљен компромис, те да је зато коришћена вода. Потпоглавље два насловљено је *DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива* и у првом поднаслову дискутовани су резултати DLS мерења на мешавинама на бази екстраката *A. blazei*. Додатак екстраката гљиве није значајно утицао на величину мицеле RM, али је утицао на величину мицеле TRM, што се објашњава стварањем WP/CN комплекса на површини казеинске мицеле након термичког третмана, који повећавају могућност за формирање интеракција са компонентама екстраката гљива као што су нпр. глукани, што повећава дијаметар и утиче на неправилнији облик мицела. Код узорка CN и TCN, као и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* мерења су мање репродуктивна, а код два узорка (CN, CNPA) се јавља бимодална дистрибуција, што је последица поступка добијања казеина изоелектричном преципитацијом и лиофилизације. Термички третман и додатак екстраката делују стабилизујуће на мешавине протеина козјег млека и екстраката гљива, те се јавља унимодална дистрибуција. Апсолутне вредности ζ -потенцијала RM, TRM и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* биле су ниже у односу на CN, TCN и њихове мешавине, што опет може бити последица поступка њиховог добијања изоелектричном преципитацијом и губитка калцијума код CN и TCN узорка. Додатак екстраката *L. sulphureus* није значајно утицао на величину мицела RM и TRM, па је претпоставка аутора да су интеракције конституената PL и VL и термички индукованих WP/CN комплекса, као и група са површине нетретираних казеинске мицеле слабије јачине него код мешавина са *A. blazei* и да већи део молекула PL и VL коегзистира у раствору млека, а да је само мањи део укључен у интеракције са казеинском мицелом. Код узорка CN и TCN и њихових мешавина са екстрактима гљива, резултати мерења нису довољно репродуктивни, осим код узорка TCN и TCNVL. Апсолутне вредности мерења ζ -потенцијала мешавина са екстрактима *L. sulphureus* биле су ниже у односу на аналогне мешавине са екстрактима *A. blazei*, што може указивати на мању стабилност ових мешавина. У трећем потпоглављу (*Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива*) је помоћу анализа протеинских профила узорка на SDS-R-PAGE, SDS-NR-PAGE и Native-PAGE геловима установљено да код мешавина са VA постоје разлике у протеинском саставу у односу на све остале узорке, тј. може се уочити доста трака са молекулском масом мањом од 30 kDa, насталих хидролизом β -CN и α ₂-CN. Ово може бити последица активних протеаза пореклом из воденог екстракта *A. blazei*, што даље доприноси функционалности повећањем садржаја полипептида који се у литератури сматрају биоактивнима. Осим овога, наводи се и да су траке протеинских профила мешавина полисахаридних екстраката обе гљиве, као и воденог екстракта *L. sulphureus* дифузне и мање јасне, што може бити последица слабих интеракција конституената екстраката и казеина (видљиво једино у нативним условима). Четврто потпоглавље насловљено је *FTIR карактеризација козјег*

млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива. Аутор објашњава да су FTIR анализе спроведене како би се потврдило присуство појединачних компонената у узорцима и да би се добиле додатне информације везане за потенцијалне интеракције конституената мешавина. Као региони од интереса одабрана су четири региона (амидни регион I, II, III и регион IV – регион отиска прста, тј. угљено-хидратни регион). На област $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$, као и на сва четири региона засебно, спроведена је PCA (анализа главних компонената). FTIR карактеризација и PCA анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* указала је на раздвајања узорака на бази млека и на бази казеина услед различитих протеинских профила, затим промене секундарне структуре протеина попут β -окрета, α -хеликса/петље и β -равни, које се јављају као последица промене структуре мицеле услед термичког третмана, на раздвајања узорака услед одсуства лактозе у казеинима и узорцима казеина, итд. Мешавине на бази казеина раздвојене су од казеина и могу се груписати према типу додатог екстракта; мешавине на бази TRM одвојене су од мешавина на бази RM, као и од узорака млека, TRM и RM. Аутор закључује да је могуће да термички третирано обезмашћено козје млеко представља најбољи протеински производ од анализираних за мешање са екстрактима *A. blazei* јер конституенти екстраката имају највећи афинитет ка интеракцијама са TRM. Додатне анализе казеина показале су да су у три амидна региона раздвајања мешавина била према типу казеина на бази кога су направљене, тј. да су промене у протеинској структури након термичког третмана биле кључне, док је у угљено-хидратном региону раздвајање мешавина на бази додатог екстракта, услед њиховог различитог биохемијског састава. Додатне анализе мешавина екстраката *A. blazei* са узорцима млека (RM, TRM) указале су на раздвајање узорака на основу хетерогености биохемијских састава и термичког третмана, што се види по присуству узорака у сва четири квадранта. Услед чињенице да се казеини реконституишу као 2%, а млека као 10%, удео полисахарида пореклом из гљива у односу на протеине је већи код мешавина на бази казеина него код мешавина на бази млека, па се због овога RM и TRM не могу јасно раздвојити од својих мешавина. Раздвајање узорака TRMPA и TRMVA од осталих дешава се и због специфичних интеракција између WP/CN комплекса и глукана. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* указала је на сличну ситуацију као са аналогним мешавинама код *A. blazei*, уз одређене разлике. Услед хетерогености састава екстраката овде се не могу раздвојити мешавине казеина са воденим екстрактом *L. sulphureus* (TCNVL, CNVL) од мешавина казеина са полисахаридним екстрактом *L. sulphureus* (TCNPL, CNPL). Код ових мешавина се може видети присуство већег броја таласних трака које у литератури указују на полисахариде различите од глукана. Додатне анализе спектра млека и мешавина екстраката *L. sulphureus* са узорцима млека (RM, TRM) указале су на хетерогеност састава узорака одсуством груписања. Закључено је да раздвајању доприносе биохемијски састави екстраката *L. sulphureus*, тј. присуство протеина у великој концентрацији код VL, разнолики полисахаридни састав, као и термички третман млека. У потпоглављу пет, *Микроструктура мешавина козјег млека и казеина са екстрактима гљива*, приказане су микроструктуре мешавина млека и казеина са екстрактима гљива снимљене SEM под различитим увећањима. Видљиве су разлике између узорака на бази млека и казеина. Неправилна структура са љуспицама уочена на мешавинама на бази RM и TRM је последица примењене лиофилизације, односно акумулације протеина преко угљених хидрата током лиофилизације, а такође и одсуства масти које делују као заштитни слој који спречава кретање воде. Порозна и неравна структура мешавина на бази CN и TCN последица је сублимације кристала леда током лиофилизације, јер се код мешавина са високим садржајем воде (2% казеини) стварају велики

кристали који нарушавају микроструктуру, као и процедуре добијања казеина изоелектричном преципитацијом. На узорцима није видљиво присуство екстраката, нити разлика између водених и полисахаридних екстраката, микроструктурне разлике између мешавина са *L. sulphureus* и *A. blazei*, као ни ензимско дејство воденог екстракта *A. blazei*.

У шестом потпоглављу (*Шематски приказ казеинских мицела у узорцима козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима A.blazei*) сумирани су закључци из претходних потпоглавља како би се шематски приказале казеинске мицеле у термички третираном и нетретираном млеку и мешавинама са екстрактима *A.blazei*, док су мешавине козјег млека и казеина са екстрактима *L. sulphureus* показале далеко већу полидисперзност услед хетерогености биохемијског састава, па аутор наводи да из овог разлога није могуће шематски приказати интеракције. Седмо потпоглавље насловљено *Примена експерименталног дизајна у оптимизацији састава адитива на бази термички третираног обезмаишеног козјег млека и екстраката гљива* подељено је на више делова. Испитивања су настављена на одабраним узорцима са аспекта најбољег потенцијала за формулацију адитива. Приступљено је експерименталном дизајну како би се утврдио оптимални однос мешавина у будућем адитиву који обезбеђује максимално корисна испитивана биолошка и техно-функционална својства. Наводи се да је предност дата воденим екстрактима гљива због разноврсности састава (високог садржаја протеина, активних протеаза из VA), као и да је због бимодалне/полимодалне расподеле честица из поједних узорака казеина и њихових мешавина, као и због корака изоелектричне преципитације предност дата млеку, и то термички третираном, због обогаћивања мицеле денатурираним серум протеинима, што омогућава већу разноврсност интеракција. Такође, FTIR карактеризација и PCA анализа су указале на јасна раздвајања мешавина на бази TRM. За прелиминарна истраживања коришћен је фракциони факторијски дизајн (FFD) који је садржао по 27 експеримената са три понављања у централној тачки за мешавине на бази екстраката две гљиве. Одабрано је пет фактора - концентрација екстраката гљива – w(ME), концентрација термички третираног млека – w(MPP), температура мешања - T, време мешања – t и рН вредност и испитиван је њихов утицај на одабрана биолошка, тј. антиоксидативна својства помоћу три различита теста заснована на различитим механизмима, односно хемијским реакцијама – ABTS, FCC и FRP тест. Анализа и поређење резултата извршено је помоћу три врсте дијаграма – Парето графика, графика главних ефеката и дијаграма интеракција. ABTS тест мешавина на бази обе гљиве показао је да су носиоци укупног антиоксидативног капацитета мешавина протеини млека и биоактивна једињења гљиве. Резултати FCC теста указују на највећи, односно једини утицај концентрације млека (мешавине на бази *A. blazei* и *L. sulphureus*, респективно). Резултати FRP теста указују на највећи утицај концентрације екстраката гљиве. У наставку истраживања, централни композитни дизајн испитује варирања два најутицајнија параметра - % ME и % MPP, како би се пронашао оптимални однос конституената са више аспеката. Поред већ испитиваних антиоксидативних својстава, у овој фази експерименталног дизајна анализирана су и техно-функционална својства. Аутор наводи да је ово урађено како би се осим испитивања антиоксидативности утврдило како концентрације утичу на техно-функционална својства због потенцијалне апликативности у прехранбеним производима, будући да се мешавине неће користити самостално, већ као састојак хране. CCD је садржао по 14 експеримената за сваку гљиву, а матрица са експерименталним условима, за две променљиве и три нивоа, са четири централне тачке, пет централних просторних и четири аксијалне тачке, према изабраном централном композитном дизајну, добијена је коришћењем статистичког софтвера MINITAB. Антиоксидативни тестови су овде потврдили раније тврдње из FFD, тј. утицај обе концентрације

на резултате ABTS теста, утицај концентрације млека на резултате FCC теста и утицај концентрације екстракта гљиве на резултате FRP теста. Када су у питању техно-функционална својства, резултати су зависили од типа екстракта гљиве, тј. може се закључити да једињења из воденог екстракта *A.blazei* делимично блокирају протеине млека да испоље добра пенива својства, вероватно због интеракција, што може бити искоришћено за смањење пенивости тамо где она није пожељна. Ипак, додатак екстракта *A.blazei* утиче на побољшање емулгујућих својстава козјег млека. Код мешавина на бази екстракта *L. sulphureus* ситуација је обрнута. При средњим и високим концентрацијама млека постигнут је добар капацитет пене, уз што већу концентрацију екстракта *L. sulphureus*, те се може закључити да водени екстракт *L. sulphureus* утиче позитивно на пенива својства млека, док се у овом односу мешавине на бази екстракта *L. sulphureus* не могу користити за побољшање емулгујућих својстава. Примена *функције пожељности* (енгл. *The Desirability Function*) омогућила је сумирање свих резултата и добијање по једне оптималне мешавине дефинисаног односа за сваку гљиву (МА – финална оптимизована мешавина, тј. адитив термички третираног млека и воденог екстракта *A.blazei*; ML - финална оптимизована мешавина, тј. адитив термички третираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*) на којима су настављена даља испитивања. Осмо потпоглавље *Истраживања на оптимизованим адитивима* подељено је на више делова. У првом делу приказана су антиоксидативна својства оптимизованих адитива и почетних конституената – млека и водених екстракта гљива. Закључено је да једињења пореклом из млека и из гљива различитим механизмима делују антиоксидативно, као и адитиви, који нпр. код FCC теста значајно премашују антиоксидативност својих полазних компонената, те се могу користити за побољшање функционалних својстава производа. Испитивање техно-функционалних својстава показало је да адитиви имају већи капацитет формирања пене у односу на почетне конституенте, као и да показују стабилност пене након три минута коју немају почетни конституенти, чак и при ниским концентрацијама. Адитиви су имали нижи индекс активности емулзије од екстракта гљива, али виши од млека, док адитив МА има умерену вредност индекса стабилности емулзије, а адитив ML не формира стабилне емулзије. У трећем делу овог потпоглавља приказани су резултати антибактеријске и антифунгалне активности оптимизованих адитива и почетних конституената преко MIC и MBC/MFC вредности и упоређене са активностима два комерцијална адитива. Сви узорци су испољили умерену антибактеријску и антифунгалну активност, док су MIC/MBC/MFC вредности адитива биле мало више, можда због интеракција или хетерогености састава, што донекле умањује доступност антимикуробних региона, али се уз друге факторе може искористити и антимикуробни потенцијал додатих адитива за побољшање функционалности прехранбених производа. Даље следе симулиране *in vitro* ГИД оптимизованих адитива. Већина тестова (осим FRP теста код ML) указала је на значајан пораст антиоксидативности оба адитива након дигестија, као и добре вредности капацитета недигестованих мешавина, што указује на потенцијалну функционалност адитива. У последњем делу овог потпоглавља испитана су антиоксидативна својства дехидрисаних супа са додатком оптимизованих адитива. Анализом антиоксидативних својстава помоћу четири различита теста утврђено је да се протеини млека могу заменити оптимизованим адитивима, јер доприносе повећању или очувању антиоксидативности у већини испитиваних случајева. Аутор наглашава да су пожељна додатна истраживања других потенцијално функционалних својстава, као и испитивања различитих врста производа у које су додати адитиви како би испољили максимално корисна техно-функционална својства.

Закључци. У овом поглављу сумирани су резултати истраживања и изведени су релевантни

закључци. Екстракти гљива садржали су укупне протеине у високом проценту, садржај глукана је био умерен, док је фенолних једињења било мало (*A.blazei*) или нису детектована применом доступних стандарда (*L. sulphureus*). ζ -потенцијал узорака млека и мешавина са *A.blazei* указао је на одличну стабилност, а добре вредности показале су и вредности ζ -потенцијала узорака млека и мешавина са *L. sulphureus*. Мерења средњег дијаметра честица узорака указала су на разноликост структуре мешавина. Средњи дијаметар узорака TRMPA и TRMVA значајно је већи у односу на RM, RMPA, RMVA, што указује на потенцијалне интеракције полисахарида *A.blazei* са термички индукованим WP/CN комплексима, а могуће је и да се ради о тројним интеракцијама у које су укључене и фенолне киселине пореклом из *A.blazei*. Узорци казеина и мешавине на бази казеина су показали мању репродуктивност мерења средњег дијаметра честица и бимодалну структуру код два узорка, вероватно због промена на мицелама услед снижавања рН вредности током преципитације казеина и услед процеса рехидрације мицела током реконституције млека. Додатак екстракта *L. sulphureus* није значајно утицао на величину мицела RM и TRM. Претпоставка аутора је да аналогних интеракција нема или су врло слабог интензитета и да једињења PL и VL коегзистирају у раствору са једињењима млека. На основу електрофоретских анализа установљено је присуство протеаза пореклом из *A.blazei*. Кандидат закључује да су код ових мешавина активни фунгални ензими и да разлажу казеине на нове полипептиде, чиме могу потенцијално допринети повећању функционалне вредности адитива. Нема разлика између протеинских профила узорака млека и казеина и мешавина полисахаридних екстраката обе гљиве, као и воденог екстракта *L. sulphureus*, што значи да нема ковалентних веза између ових конституената. Native-PAGE електрофореграми мешавина полисахаридних екстраката обе гљиве, као и воденог екстракта *L. sulphureus* су дифузни и мање јасни, што може указивати на постојање слабих интеракција. Ове интеракције могу бити електростатичке интеракције полисахарида и протеина (κ -CN) или нпр. водоничне везе. FTIR анализе мешавина, као и PCA анализа различитих региона у оквиру области $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$ указале су на раздвајања на бази додатог екстракта или типа млека или казеина, односно на постојање интеракција у појединим случајевима, које је допринело раздвајању узорака и њиховом груписању. Указано је на промене протеинске структуре у амидним регионима, као и на присуство α - и β -аномера глукана и других полисахарида у угљенохидратном региону. Типови могућих интеракција између конституената млека и екстракта *A.blazei* су водоничне и гликозидне везе, као и хидрофобне интеракције, већински између казеина и полисахарида или гликозилизованог дела κ -CN и полисахарида. Поделе и класификација су мање јасни код мешавина на бази екстракта *L. sulphureus*. Микроструктура мешавина указала је на неправилну структуру узорака која подсећа на љуспице или разбијено стакло, типичну за узорке млека након лиофилизације. Видљиве су разлике између мешавина на бази млека и казеина, док разлике између додатка екстракта две различите гљиве, као и два различита типа екстракта нису видљива овом методом. На основу претходних резултата дат је шематски приказ структуре мешавина на бази *A.blazei*. Шематски приказ мешавина млека и казеина са екстрактима *L. sulphureus* није приказан због веће полидисперзности услед хетерогености биохемијског састава. Употребом FFD извршен је скрининг система и од пет фактора одабрана су два која највише утичу на антиоксидативна својства мешавина – концентрације екстракта гљива и термички третираног млека. Остали параметри (рН, T, t) су у наставку истраживања фиксирани на вредности које су се показале оптималним са становишта антиоксидативности, као и потенцијалне примене у индустријским условима. Употребом CCD је испитан утицај концентрације екстракта гљива и млека на антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина. Утврђено је да мешавине са VL имају

боља пенива својства, док мешавине са додатком VA имају боља емулгујућа својства, па се према врсти гљиве могу додати у различите прехранбене производе. Применом функције пожељности добијен је по један оптимизован адитив дефинисаног односа за сваку гљиву (MA: w(ME) 0,62%; w(MPP) 7% и ML: w(ME) 0,79%; w(MPP) 9,4%). Анализе антиоксидативних својстава адитива и њихових конституената указале су на одличан укупан антиоксидативни капацитет свих узорака, одличан капацитет хелирања млека и адитива, умерену редукујућу моћ адитива и релативно низак укупан антиоксидативни редукујући капацитет узорака. Адитиви су показали добар капацитет пене и одређену стабилност, а ML у односу на MA има боља пенива својства, вероватно због већег удела протеина. Млеко и адитив MA су показали добра емулгујућа својства. MA због утицаја интеракција конституената гљива са WP/CN комплексима показује оваква својства, док хетерогеност састава ML и мањак интеракција утичу на велика варирања ESI вредности. Антибактеријско и антифунгално дејство адитива је било слабо до умерено, тј. уз друге факторе, антимикробни потенцијал који имају додати адитиви може утицати на побољшање функционалности прехранбених производа. Захваљујући свом биохемијском саставу, пре свега макромолекуларном, адитиви доприносе очувању и побољшању антиоксидативности проласком кроз симулирани дигестивни тракт, што су показала четири различита антиоксидативна теста на узорцима пре и након симулација *in vitro* ГИД. Додатак оптимизованих адитива у две врсте дехидрисаних супа указао је на одлична антиоксидативна својства оваквих производа, односно на функционалност у сложенем матриксу, тј. храни.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 559 литературних извора. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања докторске дисертације.

Прилози. Као прилог дати су: полипептидни састав узорака козјег млека и просечан састав казеина узорака одређени помоћу денситометријске анализе SDS-R-PAGE електрофореграма, антиоксидативна својства мешавина и анализа варијанси (ANOVA) код FFD, антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина код CCD.

5. ОСТВАРЕНИ РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ДИСЕРТАЦИЈЕ

Реализацијом ове дисертације детаљно су испитане мешавине термички третираног и нетретираног обезмашћеног козјег млека и казеина и екстраката гљива *A.blazei* и *L. sulphureus*. Окарактерисани су екстракти гљива, испитани су ζ -потенцијали, средњи дијаметри честица узорака мешавина протеина козјег млека и екстраката гљива, као и њихови протеински профили и FTIR спектри како би се проучили састави и потенцијалне интеракције између компонената мешавина и одабрале најбоље компоненте за формулацију адитива. Примена експерименталног дизајна послужила је за утврђивање оптималног односа конституената и проучавање интеракција између фактора који највише утичу на испитиване мешавине протеина козјег млека и екстраката гљива. Дисертација укључује и испитивања на оптимизованим адитивима који су показали одличну функционалност и имају велики комерцијални потенцијал. У научни допринос могу се убројити проширења постојећих знања из више области, као и проширење употребе козјег млека и јестивих гљива у производњи функционалне хране. Допринос ове докторске дисертације се не огледа само у карактеризацији, разумевању интеракција, утицају на различита функционална својства, већ и у процедури испитивања која подразумева почетна истраживања, оптимизацију система, испитивања на оптимизованим адитивима и убацивање у модел прехранбеног производа, чиме се испитивања заокружују и могу се применити и на друге модел системе.

6. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ

У сарадњи са другим ауторима кандидат је написао један научни рад који је садржински повезан са дисертацијом и објављен у међународном часопису изузетних вредности (M21a) који квалификује кандидата за одбрану докторске дисертације:

1. **Popović Minić, D. A.**, Milinčić, D. D., Kolašinac, S., Rac, V., Petrović, J., Soković, M., Banjac, N., Lađarević, J., Vidović, B. B., Kostić, A. Ž., Pavlović, V. B., Pešić, M. B. (2023). Goat milk proteins enriched with *Agaricus blazei* Murrill ss. Heine extracts: Electrophoretic, FTIR, DLS and microstructure characterization. *Food Chemistry*, 402, 134299, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134299>

као и једно поглавље у истакнутој монографији међународног значаја (M13) :

2. **Popović A. D.**, Milinčić D. D., Pešić M. B., Kalušević A.M., Tešić Ž. Lj. and Nedović V.A. (2019): Encapsulation technologies for polyphenol-loaded microparticles in food industry In: *Green Food Processing Techniques Preservation, Transformation and Extraction*, Eds: Chemat F., Vorobiev E. Chapter 12: 335-368 ISBN: 978-0-128-15353-6 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815353-6.00012-4>

Поред тога, објављена су и два саопштења на конференцијама која су садржински повезана са дисертацијом (саопштења са међународног скупа штампано у изводу - M34):

3. **Popović Minić, D.A.**, Milinčić, D.D., Rac, V., Vidović, B., Soković, M., Petrović, J., Pešić, M.B. (2021): Zeta-potential and particle size of functional additives based on goat milk proteins and *Agaricus blazei* Murrill extracts. 2nd Unifood Conference, Belgrade, 24th and 25th September, 2021
4. **Popović Minić, D. A.**, Sredović Ignjatović, I., Petrović, J. D., Soković, M., Pešić, M.B. (2024): Central composite design-based investigation of antioxidant properties of goat milk / *Laetiporus sulphureus* extract mixtures. 3rd Unifood Conference, Belgrade, 28th and 29th June, 2024.

7. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу анализе докторске дисертације под насловом: „Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*“ коју је поднела Душанка А. Поповић Минић, 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 аутор је детаљно анализирао литературу везану за функционалну храну и адитиве, затим детаљно изнео податке о козјем млеку, његовом саставу, својствима и примени, као и код јестивих гљива, њихове примене и експерименталног дизајна. На основу прегледа литературе успешно је образложена тематика докторске дисертације, предмет и циљеви истраживања су правилно дефинисани и постављени, док је програм истраживања добро осмишљен. Методе примењене у експерименталном делу су савремене и поуздане, а резултати су прегледно приказани, правилно анализирани и упоређени са резултатима других аутора. Из резултата су правилно изведени закључци. Научни допринос докторске дисертације се огледа у функционалности формулисаних адитива, њиховој апликативности у великом броју прехранбених производа, као и у проширењу постојеће употребе козјег млека и јестивих гљива у производњи функционалних производа. Поред карактеризације екстраката гљива, разумевања интеракција између конституената козјег млека и екстраката гљива, предлагања модела дела интеракција са

екстрактами *A. blazei*, употребљен је и експериментални дизајн и испитани су фактори који највише утичу на мешавине протеина козјег млека и екстракта гљива, као и њихов оптимални однос са аспекта најбољих антиоксидативних и техно-функционалних својстава. Поред овога, извршена су истраживања антиоксидативних и техно-функционалних својстава на оптимизованим адитивима, анализирана су антиоксидативна својства адитива пре и након симулираних *in vitro* ГИД, док су оптимизовани адитиви убачени у модел производ – дехидрисане супе, које су подвргнуте анализама антиоксидативних својстава, чиме је истраживање заокружено све до конкретног прехранбеног производа са побољшаном функционалношћу. Резултати приказани у овој дисертацији могу наићи на разумевање и ширу експертизу у прехранбеној технологији, фармацији и медицини. Произведени и окарактерисани адитиви се могу успешно користити као функционални адитиви. 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 Душанке А. Поповић Минић, маг. инж. технол., под насловом: „Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстракта гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*“ и да након завршетка процедуре омогући кандидату јавну одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

Београд – Земун
Датум: 27.11.2024. године

Чланови Комисије:

др Ивана Средовић Игњатовић, ванредни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет,
ужа научна област Хемија

др Јелена Миочиновић, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет,
ужа научна област Технологија анималних производа

др Анита Клаус, редовни професор
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет,
ужа научна област Технолошка микробиологија

др Немања Станисављевић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (IMGGI),
ужа научна област Молекуларна биологија

др Јована Петровић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију (IBISS),
ужа научна област Микологија

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: „**Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстраката гљива из родова *Letiporus* и *Agaricus***“ аутора Душанке Поповић Минић, констатујем да утврђено подударане текста износи 3%. 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, 2.10.2024.

Ментор

Проф. др Мирјана Пешић