

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Душанка А. Поповић Минић

**ФУНКЦИОНАЛНИ АДТИВИ НА БАЗИ
ПРОТЕИНА КОЗЈЕГ МЛЕКА И
ЕКСТРАКТА ГЉИВА ИЗ РОДОВА
LAETIPORUS И *AGARICUS***

докторска дисертација

Београд, 2024. године

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Душанка А. Поповић Минић

**ФУНКЦИОНАЛНИ АДТИВИ НА БАЗИ
ПРОТЕИНА КОЗЈЕГ МЛЕКА И
ЕКСТРАКТА ГЉИВА ИЗ РОДОВА
LAETIPORUS И *AGARICUS***

докторска дисертација

Београд, 2024. године

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dušanka A. Popović Minić

**FUNCTIONAL ADDITIVES BASED ON
GOAT MILK PROTEINS AND FUNGAL
EXTRACTS FROM GENUS *LAETIPORUS*
AND *AGARICUS***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

МЕНТОР:

др Мирјана Пешић, редовни професор

Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет,
ужа научна област Биохемија

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

Датум одбране: _____

Захвалница

Истраживања у оквиру ове дисертације делимично су финансирана помоћу стипендија – мањи део помоћу стипендије за изузетно надарене студенте МПНТР и већи помоћу стипендије за докторске студије МПНТР, као и из пројекта МПНТР „Коришћење биљних извора протеина, дијеталних влакана и антиоксиданаса у производњи хране“ (ев. број TR31069) и пројекта ИДЕЈЕ Фонда за науку Републике Србије „*Functional products based on goat's milk proteins and bioactive compounds extracted from grape pomace and edible mushrooms*“ (FUNPRO; ев. број 7744714). Највећи део ове дисертације урађен је у лабораторијама Катедре за хемију и биохемију Пољопривредног факултета, затим део на Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, док су мањи делови ове дисертације урађени у лабораторијама Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Технолошко-металуршког и Фармацеутског факултета, све у оквиру Универзитета у Београду.

Захваљујем се проф. др Мирјани Пешић на менторству током израде ове дисертације, као и на искуству које сам стекла током заједничке сарадње. Захваљујем се и проф. др Ивани Средовић Игњатовић, коју такође сматрам ментором, на срдачној сарадњи и помоћи која је дошла у право време, онда када ми је била највише потребна. Велико хвала и др Јовани Петровић на пријатељском ставу, позитивности и помоћи из њених, као и других области и на многим ишчитавањима, корекцијама и сугестијама. Дугујем захвалност професорима и колегама који су ми помогли са многобројним методама обухваћеним овом дисертацијом: проф. др Владиславу Рацу на помоћи приликом рада и тумачења замршених резултата DLS мерења, проф. др Владимиру Павловићу на помоћи око електронске микроскопије, др Марини Соковић на обезбеђивању узорака гљива, проф. др Небојши Бањцу, др Јелени Лађаревић, др Немањи Станисављевићу, др Урошу Гашићу, проф. др Бојани Видовић и др Стефану Колашинцу. Захваљујем се и лаборанту Дејану Ипачу на позитивном ставу и помоћи око свих непредвиђених ситуација током лабораторијског рада. Такође се захваљујем свим пријатељима, колегама и професорима који су подржавали мој научни рад. Изјаве захвалности не би биле потпуне без Љиљане Лике Џоковић, са којом сам провела сате учећи хемију (и не само хемију), којој се од срца захваљујем на ведрини и знању које несебично дели.

На крају, највећу захвалност дугујем мојим најближима, који су сведоци и саучесници великог труда, рада, борбе, ината, радости када истраживања дају резултате и нервирања када не иду. Без њих никада не бих успела. Захваљујем се моме оцу на усмеравању ка науци, обасипању књигама још од малена, подршци током целог школовања и наговору да упишем докторат; захваљујем се мајци на свим оним драгоценим стварима које мајке раде, а деца не примећују, па схвате када и они постану родитељи; захваљујем се тетци, која је далеко, али је увек успела да буде ту када највише треба; захваљујем се баки и деки, који више нису са нама, а имали су највећи утицај на мене, надам се да их нисам изневерила. Захваљујем се и моме мужу, који је веровао у мене и био стрпљив у немогућим околностима, јер се рад на докторату поклопио са формирањем породице и многим лепим, али и тешким тренуцима. Захвалност дугујем и мојој деци, која су такође претрпела део овог терета и навикла да мама седи за лаптопом и није ту (пише доктојат).

Ову дисертацију посвећујем мојим родитељима, тетци, баки и деки, који су кроз моје детињство, одрастање и школовање били пуни љубави и подршке, због којих сам оно што јесам;

моме мужу и саборцу, са којим највише делим сваки тренутак садашњости, са намером да саградимо и сачувамо оно што је вредно;

мојој деци, којима припада будућност, у жељи да буду добри, часни, срећни момци, поносни на своју маму.

ДПМ

ФУНКЦИОНАЛНИ АДТИВИ НА БАЗИ ПРОТЕИНА КОЗЈЕГ МЛЕКА И ЕКСТРАКАТА ГЉИВА ИЗ РОДОВА *LAETIPORUS* И *AGARICUS*

Сажетак

Циљ ове докторске дисертације била је формулација функционалних адитива који би објединили нутритивне и биолошке вредности козјег млека и екстраката гљива *L. sulphureus* и *A. blazei*. На мешавинама термички третираног (TRM) и нетретираног обезмашћеног козјег млека (RM) и казеина козјег млека и водених и полисахаридних екстраката гљива извршена је биохемијска карактеризација основних компонената (садржај укупних протеина, глукана и фенолних једињења), као и DLS мерења (динамичко расејање светлости), електрофоретске и FTIR анализе (инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом) и анализа мешавина скенирајућом електронском микроскопијом. Резултати ових анализа указали су на висок садржај укупних протеина водених екстраката гљива, потенцијалне интеракције млека (RM, TRM) са воденим екстрактом *A. blazei*, постојање полипептида насталих протеолитичким дејством ензима *A. blazei*, као и на хетерогеност састава, тј. полидисперзност мешавина на бази воденог екстракта *L. sulphureus*, што је утицало на одабир TRM и водених екстраката гљива за наставак истраживања. Фракционим факторијским дизајном испитан је утицај пет фактора на антиоксидативна својства мешавина. Централни композитни дизајн је у наставку истраживања искоришћен за испитивање утицаја два најважнија фактора (концентрације млека и екстраката гљива) на антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина. Применом Деринџерове функције пожељности утврђен је оптималан однос конституената, односно формулисан је по један оптимизован адитив за сваку гљиву. Оптимизовани адитиви су показали одличне резултате ABTS (способност сакупљања ABTS радикал катјона) и FCC теста (капацитет хелирања јона гвожђа), умерену до одличну редукујућу моћ и ниске резултате TPC теста (укупни антиоксидативни редукујући капацитет). Адитиви су показали ниску стабилност пене и добар капацитет пене, виши код адитива на бази *L. sulphureus* због већег удела протеина, док је адитив на бази *A. blazei* показао добра емулгујућа својства. Антимикробна својства адитива су умерена, уз неколико вредности минималних инхибиторних/ бактерицидних концентрација нижих од комерцијалних адитива. Након симулиране гастроинтестиналне дигестије утврђено је да укупан антиоксидативни капацитет адитива значајно расте, капацитет хелирања се оквирно дуплира, а TPC вредности се повећавају приближно 2,6 – 3,8 пута. Додатак адитива у модел производ (дехидрисане супе) такође је утицао на повећање или очување антиоксидативности производа у већини испитиваних случајева. Козје млеко пружа одличну основу за функционалне адитиве, а присуство биоактивних једињења гљива вишеструко утиче на повећање функционалности, чиме се задовољавају потребе тржишта за адитивима базираним на безбедним супстанцама пореклом из природе, функционалност, тј. потенцијално позитивна улога на људско здравље, као и економичност производње.

Кључне речи: обезмашћено козје млеко, казеини, *Laetiporus sulphureus*, *Agaricus blazei*, термички третман, функционална храна, адитиви, дизајн експеримента, фракциони факторијски дизајн, централни композитни дизајн

Научна област: Технолошко инжењерство

Ужа научна област: Наука о конзервасању и врењу

УДК број: 664.8.022.3:[637.12'636.39:582.28(043.3)]

FUNCTIONAL ADDITIVES BASED ON GOAT MILK PROTEINS AND FUNGAL EXTRACTS FROM GENUS *LAETIPORUS* AND *AGARICUS*

Abstract

The aim of this doctoral dissertation was to formulate functional additives that incorporate the nutritional and biological values of goat milk and fungal extracts from *L. sulphureus* and *A. blazei*. The mixtures of thermally treated (TRM) and untreated skimmed goat milk (RM), as well as goat milk caseins and aqueous and polysaccharide fungal extracts, were subjected to biochemical characterisation of their main components (total protein content, glucan content, and total phenolic content). The mixtures were also analysed using DLS measurements (*Dynamic Light Scattering*), electrophoretic and FTIR analyses (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), and scanning electron microscopy. The results of these analyses indicated a high total protein content in the aqueous fungal extracts, potential interactions between the milk (RM, TRM) and *A. blazei* aqueous extract, and the presence of polypeptides produced by proteolytic activity of *A. blazei* enzymes, as well as the heterogenic composition, i.e. the polydispersity of the mixtures based on *L. sulphureus* aqueous extract that influenced the selection of TRM and aqueous fungal extracts for further research. The antioxidant properties of the mixtures were evaluated using a fractional factorial design to assess the influence of five factors. In the subsequent research phase, a central composite design was used to examine the influence of two most important factors (concentration of milk and fungal extracts) on the antioxidant and techno-functional properties of the mixtures. Using Derringer's desirability function methodology, the optimal ratio of constituents was determined, leading to the formulation of one optimized additive for each fungus. The optimized additives showed excellent results in the ABTS (*ABTS radical scavenging activity*) and FCC tests (*Ferrous-ion-chelating capacity*), moderate to excellent reducing power, and low results in the TPC test (*Total Phenolic Content*). The additives exhibited low foam stability and good foaming capacity, with the *L. sulphureus*-based additive showing higher foaming capacity due to its higher protein content. The *A. blazei*-based additive demonstrated good emulsifying properties. Antimicrobial properties of the additives were moderate, with several minimum inhibitory/ bactericidal concentration values lower than those of commercial additives. After simulated gastrointestinal digestion, the total antioxidant capacity of the additives increased significantly, their chelating capacity roughly doubled, and TPC values increased approximately 2.6 – 3.8 times. The addition of these additives to a model product (dehydrated soups) also had the effect of increasing or preserving the antioxidant capacity of the products in most of the samples tested. Goat milk provides an excellent foundation for functional additives, and the inclusion of fungal bioactive compounds enhances functionality, meeting the market demand for additives derived from safe, natural substances with a potentially positive impact on human health, as well as low production costs.

Keywords: skimmed goat milk, caseins, *Laetiporus sulphureus*, *Agaricus blazei*, thermal treatment, functional food, additives, design of experiment, fractional factorial design, central composite design

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: The science of food preservation and fermentation

UDC: 664.8.022.3:[637.12'636.39:582.28(043.3)]

Садржај

1. Увод.....	1
2. Преглед литературе	3
2.1. Функционална храна.....	3
2.2. Адитиви.....	5
2.3. Козје млеко	7
2.3.1. Хемијски састав и нутритивна својства козјег млека	7
2.3.2. Протеини козјег млека.....	9
2.3.2.1. Казеини	10
2.3.2.2. Структура казеинске мицеле.....	11
2.3.2.3. Серум протеини.....	13
2.3.3. Термички третман козјег млека.....	13
2.3.4. Техно-функционална својства козјег млека	16
2.3.5. Функционална својства и примена козјег млека и козјих млечних производа.....	17
2.3.6. Конституенти крављег млека као носачи супстанци од интереса.....	18
2.4. Јестиве гљиве.....	23
2.4.1. Хемијски састав и нутритивна својства гљива са нагласком на биолошку активност	23
2.4.2. <i>Agaricus blazei</i>	25
2.4.2.1. Полисахариди <i>A. blazei</i>	26
2.4.2.2. Протеини <i>A. blazei</i>	28
2.4.2.3. Липиди <i>A. blazei</i>	28
2.4.2.4. Фенолна једињења <i>A. blazei</i>	29
2.4.2.5. Терпени и терпеноиди <i>A. blazei</i>	29
2.4.2.6. Остала једињења <i>A. blazei</i>	29
2.4.3. <i>Laetiporus sulphureus</i>	30
2.4.3.1. Полисахариди <i>L. sulphureus</i>	31
2.4.3.2. Протеини <i>L. sulphureus</i>	32
2.4.3.3. Липиди <i>L. sulphureus</i>	32
2.4.3.4. Фенолна једињења <i>L. sulphureus</i>	33
2.4.3.5. Терпени и терпеноиди <i>L. sulphureus</i>	33
2.4.3.6. Остала једињења <i>L. sulphureus</i>	33
2.4.4. Примена гљива у производњи функционалних прехранбених производа.....	34
2.4.4.1. Примена гљива у производњи функционалних млечних производа	37

2.5. Експериментални дизајн и оптимизација	38
3. Материјал и методе.....	41
3.1. Обезмашћивање узорака млека	41
3.2. Одређивање садржаја укупних протеина, казеина и серум протеина у млеку	41
3.3. Термички третман и фракционисање узорака млека.....	41
3.4. Добијање екстраката гљива.....	42
3.4.1. Добијање водених екстраката гљива.....	42
3.4.2. Добијање полисахаридних екстраката гљива.....	42
3.5. Припрема мешавина козјег млека и екстраката гљива.....	42
3.6. Одређивање садржаја протеина.....	43
3.7. Одређивање садржаја глукана	43
3.8. Анализа фенолних једињења - UHPLC-DAD MS/MS анализа	44
3.9. DLS мерења ζ-потенцијала и величине честица	45
3.10. Електрофоретске анализе	45
3.10.1. Припрема пуфера за узорке, узорака и стандарда за анализу.....	45
3.10.2. Нативна полиакриламидна гел електрофореза (Native PAGE).....	45
3.10.3. SDS полиакриламидна гел електрофореза у редукујућим (SDS-R-PAGE) и нередукујућим условима (SDS-NR-PAGE).....	46
3.11. FTIR спектроскопија.....	46
3.12. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)	46
3.13. Експериментални дизајн	46
3.13.1. Припрема мешавина	46
3.13.2. Фракциони факторијски дизајн (FFD)	47
3.14. Одређивање антиоксидативних својстава	48
3.14.1. Укупан антиоксидативни капацитет (ABTS тест)	48
3.14.2. Способност хелирања јона Fe ²⁺ (FCC тест).....	48
3.14.3. Способност редукције јона Fe ³⁺ (редукујућа моћ; FRP тест).....	48
3.14.4. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет (садржај укупних фенолних једињења; TPC)	49
3.15. Одређивање техно-функционалних својстава.....	49
3.15.1. Одређивање пенивих својстава.....	49
3.15.2. Одређивање емулгујућих својстава.....	49
3.16. Одређивање антимикуробне активности.....	50
3.17. Симулирана <i>in vitro</i> гастроинтестинална дигестија.....	50
3.18. Убацивање оптимизованог адитива у дехидрисане супе – модел.....	52
3.19. Обрада података.....	53

4. Резултати и дискусија.....	54
4.1. Биохемијска карактеризација екстраката гљива	54
4.1.1. Садржај протеина у воденим екстрактима <i>A. blazei</i> и <i>L. sulphureus</i>	54
4.1.2. Садржај глукана у екстрактима <i>A. blazei</i> и <i>L. sulphureus</i>	54
4.1.3. Садржај фенолних једињења у екстрактима <i>A. blazei</i> и <i>L. sulphureus</i>	55
4.2. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива	57
4.2.1. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i>	57
4.2.2. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	60
4.3. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива	65
4.3.1. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу SDS-R-PAGE.....	65
4.3.2. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу SDS-NR-PAGE.....	68
4.3.3. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу Native-PAGE	70
4.4. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива	73
4.4.1. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i>	73
4.4.2. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	80
4.5. Микроструктура мешавина козјег млека и казеина са екстрактима гљива.....	88
4.6. Шематски приказ казеинских мицела у узорцима козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i>	91
4.7. Примена експерименталног дизајна у оптимизацији састава адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и екстраката гљива.....	94
4.7.1. Фракциони факторијски дизајн (FFD) мешавина на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и екстраката гљива.....	94
4.7.2. Испитивање утицаја фактора на антиоксидативна својства мешавина са екстрактом <i>A. blazei</i> применом FFD	95
4.7.2.1. ABTS тест мешавина са екстрактом <i>A. blazei</i>	95
4.7.2.2. FCC тест мешавина са екстрактом <i>A. blazei</i>	99
4.7.2.3. FRP тест мешавина са екстрактом <i>A. blazei</i>	102
4.7.3. Испитивање утицаја фактора на антиоксидативна својства мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i> применом FFD	104

4.7.3.1. ABTS тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	104
4.7.3.2. FCC тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	107
4.7.3.3. FRP тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	109
4.7.4. Оптимизација мешавина применом централног композитног дизајна (CCD).....	113
4.7.5. Оптимизација мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i> применом CCD	114
4.7.5.1. ABTS тест мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i>	114
4.7.5.2. FCC тест мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i>	116
4.7.5.3. FRP тест мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i>	117
4.7.5.4. Пенива својства мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i>	118
4.7.5.5. Емулгујућа својства мешавина са екстрактом <i>A.blazei</i>	120
4.7.6. Оптимизација мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i> применом CCD.....	122
4.7.6.1. ABTS тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	122
4.7.6.2. FCC тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	124
4.7.6.3. FRP тест мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	125
4.7.6.4. Пенива својства мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	126
4.7.6.5. Емулгујућа својства мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i>	128
4.7.7. Функција пожељности.....	131
4.8. Истраживања на оптимизованим адитивима	134
4.8.1. Антиоксидативна својства оптимизованих адитива.....	134
4.8.2. Техно-функционална својства оптимизованих адитива.....	137
4.8.3. Антимикробна својства оптимизованих адитива.....	140
4.8.4. <i>In vitro</i> гастроинтестиналне дигестије оптимизованих адитива.....	144
4.8.5. Антиоксидативна својства дехидрисаних супа са додатком оптимизованих адитива	152
5. Закључци.....	156
6. Литература.....	160
7. Биографија аутора.....	204
8. Прилози.....	205
Прилог 1. Полипептидни састав (у %) узорака козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>Agaricus blazei</i> одређен помоћу дензитометријске анализе SDS-R-PAGE електрофореграма	205
Прилог 2. Просечан састав казеина (у %) узорака козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>Agaricus blazei</i> одређен помоћу дензитометријске анализе SDS-R-PAGE електрофореграма, израчунат као % укупних казеина.....	206
Прилог 3. Антиоксидативна својства мешавина са воденим екстрактом <i>A.blazei</i> – одговори (зависно променљиве) код фракционог факторијског дизајна (FFD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.4.	207

Прилог 4. Анализа варијанси (ANOVA), фракциони факторијски дизајн – одређивање антиоксидативних својстава мешавина са екстрактом <i>A. blazei</i> , кодиране вредности.	208
Прилог 5. Антиоксидативна својства мешавина са воденим екстрактом <i>L. sulphureus</i> – одговори (зависно променљиве) код фракционог факторијског дизајна (FFD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.4.	209
Прилог 6. Анализа варијанси (ANOVA), фракциони факторијски дизајн – одређивање антиоксидативних својстава мешавина са екстрактом <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности...	210
Прилог 7. Антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина са воденим екстрактом <i>A. blazei</i> – одговори (зависно променљиве) код централног композитног дизајна (CCD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.6.	211
Прилог 8. Антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина са воденим екстрактом <i>L. sulphureus</i> – одговори (зависно променљиве) код централног композитног дизајна (CCD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.6.	212
Прилог 9. Изјава о ауторству	213
Прилог 10. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	214
Прилог 11. Изјава о коришћењу	215

Листа скраћеница

A – узорак спрашене гљиве *A.blazei*

AA – еквиваленти аскорбинске киселине

ABTS – 2,2-азино-бис/3-етил-бензотиазолин-6-сулфонска киселина

ABTS тест – способност сакупљања ABTS радикал катјона

ADI – прихватљив дневни унос (*Acceptable Daily Intake*)

Adj. MS – средња вредност квадрата

Adj. SS – усклађена сума квадрата

Ala – аланин

ANOVA – анализа варијансе (*Analysis of Variance*)

Asx – аспарагинска киселина или аспарагин

BSA – серум албумин крви

C – катехин

CCD – централни композитни дизајн (*Central Composite Design*)

CCP – колоидни калцијум фосфат

СМР – казеинмакропептид

CN – узорак казеина обезмашћеног термички нетретираног млека

CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A.blazei*

CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*

CN₅ – садржај казеина

CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A.blazei*

CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

COVID-19 – коронавирусна болест 2019 (*Coronavirus disease 2019*)

CV – коефицијент варијације

di – појединачна функција пожељности

DKK – контрола дигестивног коктела

DLS – динамичко расејање светлости (*Dynamic Light Scattering*)

DMA – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу

DML – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу

DoE - експериментални дизајн (*Design of Experiments*)

DTRM 9,4% - дигестовано 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко

DVA – дигестовани водени екстракт *A. blazei*

DVL – дигестовани водени екстракт *L. sulphureus*

DW – сува маса (*Dry Weight*)

DTRM 7% - дигестовано 7% термички третирано обезмашћено козје млеко

EAI – индекс активности емулзије (*Emulsion Activity Index*)

EC – епикатехин

ECG – епикатехин галат

EDTA – етилендиаминететрасирћетна киселина (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

EFSA – Европска агенција за безбедност хране (*European Food Safety Authority*)

EGCG – епигалокатехин галат

ESI – индекс стабилности (*Emulsion Stability Index*)

FAO – Организација за храну и пољопривреду (*Food and Agriculture Organization*)

FC – капацитет пене (*Foaming Capacity*)

FCC – капацитет хелирања јона гвожђа (*Ferrous-ion-chelating capacity*)

FDA – Управа за храну и лекове (*Food and Drug Administration*)

FFD – фракциони факторијски дизајн (*Fractional Factorial Design*)

FOSHU – храна за специфичне здравствене потребе (*Foods Of Specified Health Use*)

FRP – редукација јона гвожђа (редукујућа моћ) (*Ferric Reducing Power*)

FS – стабилност пене (*Foam Stability*)

FTIR – инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

FUFOSE – Акција Европске комисије о науци о функционалној храни (*The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe*)

Glx – глутаминска киселина или глутамин

GRAS – опште признато као безбедно (*Generally Recognized As Safe*)

HMW – високомолекулски комплекси протеина (*High Molecular Weight*)

HTST – краткотрајан третман високом температуром (*High Temperature Short Time*)

Ig – имуноглобулини

ILSI – *International Life Sciences Institute Europe*

L – узорак спрашене гљиве *L. sulphureus*

Leu – леуцин

Lf – лактоферин

MA – оптимизиована мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*

MA K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу (контрола)

MBC – минимална бактерицидна концентрација (*Minimum Bactericidal Concentrations*)

MFC – минимална фунгицидна концентрација (*Minimum Fungicidal Concentrations*)

MIC – минимална инхибиторна концентрација (*Minimum Inhibitory Concentrations*)

ML – оптимизиована мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

ML K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу (контрола)

n.d. – није детектовано

Native PAGE – нативна полиакриламидна гел електрофореза

NCN – садржај неказеинског азота

NPN – садржај непротеинског азота

PA – полисахаридни екстракт *A. blazei*

PC1 – главна компонента 1 (*Principal Component 1*)

PC2 – главна компонента 2 (*Principal Component 2*)

PCA – анализа главних компонената (*Principal Component Analysis*)

PI - индекс полидисперзије (*Polydispersity Index*)

PL – полисахаридни екстракт *L. sulphureus*

Pro – пролин

r – Пирсонов корелациони коефицијент

RM – узорак обезмашћеног термички нетретираног млека

RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*

RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*

RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*

RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

RSM – методологија одговора (одзива) површина (*Response Surface Methodology*)

S1 – узорак дехидрисане супе са термички третираним обезмашћеним козјим млеком

S2 – узорак дехидрисане супе са оптимизованом мешавином термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*

S3 – узорак дехидрисане супе са оптимизованом мешавином термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

S4 – узорак комерцијалне дехидрисане супе

S5 – узорак комерцијалне дехидрисане супе са оптимизованом мешавином термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*

S6 – узорак комерцијалне дехидрисане супе са оптимизованом мешавином термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

SDS – натријум додецил сулфат (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-NR-PAGE – полиакриламидна гел електрофореза у нередукујућим условима

SDS-R-PAGE – полиакриламидна гел електрофореза у редукујућим условима

SEM – скенирајући електронски микроскоп

Seq. SS – секвенцијална сума квадрата

SS – степен слободе

SSF – ферментација у чврстом стању (*Solid-State Fermentation*)

T – температура мешања

t – време мешања

TCA – трихлоросирћетна киселина (*Trichloroacetic Acid*)

TCN – узорак казеина термички третираног обезмашћеног млека

TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*

TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*

TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*

TCNVL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

TN - садржај укупног азота

TP – садржај укупних протеина

TPC – укупни антиоксидативни редукујући капацитет / укупан садржај фенолних једињења (*Total Phenolic Content*)

TRM – узорак термички третираног обезмашћеног млека

TRM 7% К – разблажено 7% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола)

TRM 9,4% К – разблажено 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола)

TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A.blazei*

TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*

TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A.blazei*

TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*

UHPLC – ултра-ефикасна течна хроматографија

UHT – третман ултра-високом температуром (*Ultra-High Temperature Processing*)

VA – водени екстракт *A.blazei*

VA К – разблажени водени екстракт *A. blazei* (контрола)

VL – водени екстракт *L. sulphureus*

VL К – разблажени водени екстракт *L. sulphureus* (контрола)

w(ME) – концентрација екстракта гљива

w(MPP) – концентрација термички третираног млека

WHO – Светска здравствена организација (*World Health Organisation*)

WP – серум протеини (*Whey Proteins*)

WP/CN – комплекси денатурираних серум протеина и казеина

WP_s – садржај серум протеина

α -LA – α -лакталбумини

α_1 -CN – α_1 -казеин

α_2 -CN – α_2 -казеин

β -CN – β -казеин

β -LG – β -лактоглобулини

γ -CN – γ -казеин

к-CN – к-казеин

ГИД – гастроинтестинална дигестија

ПБ – полисахариди растворљиви у базама

ПВ – полисахариди растворљиви у води

Листа слика

Слика 2.1. Шематски упоредни приказ критеријума за функционалну храну у Јапану и дефинисања функционалне хране у европским земљама	4
Слика 2.2. Трансмисиони електронски микрограф свежег козјег млека.....	8
Слика 2.3. А: Шематски приказ модела казеинске мицеле; Б: Електронски микрограф казеинске мицеле	12
Слика 2.4. Утицај термичког третмана (90°C, 10 min) на казеинску мицелу козјег млека на природној рН вредности млека.....	15
Слика 2.5. Примери техника инкапсулације помоћу казеина; (А) везивање јона; (В) хидрофобно везивање; (С) спонтано окупљање (енгл. <i>self-assembly</i>); (D) реорганизација (нпр. додатком соли; енгл. <i>reassembly</i>); (Е) површинска активност	20
Слика 2.6. Структура ћелијског зида гљива	24
Слика 2.7. Плодоносна тела <i>Agaricus blazei</i>	25
Слика 2.8. Плодоносна тела <i>Laetiporus sulphureus</i>	30
Слика 2.9. Графички приказ утицаја нутријената пореклом из гљива на својства функционалних производа на бази меса и рибе.....	37
Слика 2.10. Шематски приказ корака RSM	40
Слика 4.1. Средњи дијаметар честица млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i>	58
Слика 4.2. ζ-потенцијал узорака млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i>	60
Слика 4.3. Средњи (<i>mean</i>) и најчешћи (<i>mode</i>) дијаметар честица млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	61
Слика 4.4. ζ-потенцијал узорака млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	64
Слика 4.5. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i> анализирани SDS-R-PAGE.....	65
Слика 4.6. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> анализирани SDS-R-PAGE	66
Слика 4.7. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i> анализирани SDS-NR-PAGE	68
Слика 4.8. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> анализирани SDS-NR-PAGE	69
Слика 4.9. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i> анализирани Native-PAGE.....	70
Слика 4.10. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> анализирани Native-PAGE.....	71
Слика 4.11. FTIR спектри узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A.blazei</i>	74

Слика 4.12. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i> за спектралне регионе: (a, b) 700-1700 cm ⁻¹ ; (c, d) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (e, f) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (g, h) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (i, j) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	75
Слика 4.13. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i> за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (c, d) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (e, f) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (g, h) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	78
Слика 4.14. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака млека и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i> за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (c, d) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (e, f) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (g, h) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	79
Слика 4.15. FTIR спектри узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	81
Слика 4.16. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> за спектралне регионе: (a, b) 700-1700 cm ⁻¹ ; (c, d) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (e, f) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (g, h) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (i, j) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	82
Слика 4.17. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (c, d) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (e, f) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (g, h) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	85
Слика 4.18. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектара узорака млека и њихових мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i> за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, 700-1200 cm ⁻¹ ; (c, d) амид III, 1200-1500 cm ⁻¹ ; (e, f) амид II, 1500-1600 cm ⁻¹ ; (g, h) амид I, 1600-1700 cm ⁻¹	86
Слика 4.19. Микроструктура мешавина млека и казеина са полисахаридним екстрактом <i>A. blazei</i> (A-D) и воденим екстрактом <i>A. blazei</i> (E-H)	88
Слика 4.20. Микроструктура мешавина млека и казеина са полисахаридним екстрактом <i>L. sulphureus</i> (A-D) и воденим екстрактом <i>L. sulphureus</i> (E-H)	90
Слика 4.21. Шематски приказ узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима <i>A. blazei</i>	92
Слика 4.22. Парето график, ефекат испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	96
Слика 4.23. График главних ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	97
Слика 4.24. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	98
Слика 4.25. Парето график, ефекат испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	100
Слика 4.26. График главних ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	101

Слика 4.27. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	101
Слика 4.28. Парето график, ефекат испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	102
Слика 4.29. График главних ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	103
Слика 4.30. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>A. blazei</i>	104
Слика 4.31. Парето график, ефекат испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	105
Слика 4.32. График главних ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	106
Слика 4.33. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	106
Слика 4.34. Парето график, ефекат испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	107
Слика 4.35. График главних ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	108
Слика 4.36. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	109
Слика 4.37. Парето график, ефекат испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	110
Слика 4.38. График главних ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	111
Слика 4.39. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са <i>L. sulphureus</i>	111
Слика 4.40. Дијаграм одговора површина; укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) мешавина са <i>A. blazei</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)).....	115
Слика 4.41. Дијаграм одговора површина; капацитет хелирања (FCC тест) мешавина са <i>A. blazei</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)).....	116
Слика 4.42. Дијаграм одговора површина; редукујућа моћ (FRP тест) мешавина са <i>A. blazei</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)).....	118
Слика 4.43. Дијаграми одговора површина; пенива својства мешавина са <i>A. blazei</i> (лево – капацитет пене; десно – стабилност пене) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)).....	119
Слика 4.44. Дијаграми одговора површина; емулгујућа својства мешавина са <i>A. blazei</i> (лево – индекс стабилности емулзије; десно – индекс активности емулзије) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)).....	121

Слика 4.45. Дијаграм одговора површина; укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP))	123
Слика 4.46. Дијаграм одговора површина; капацитет хелирања (FCC тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP))	124
Слика 4.47. Дијаграм одговора површина; редукујућа моћ (FRP тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP))	126
Слика 4.48. Дијаграми одговора површина; пенива својства мешавина са <i>L. sulphureus</i> (лево – капацитет пене; десно – стабилност пене) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP))	127
Слика 4.49. Дијаграми одговора површина; емулгујућа својства мешавина са <i>L. sulphureus</i> (лево – индекс стабилности емулзије; десно – индекс активности емулзије) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP))	129
Слика 4.50. Антиоксидативна својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената; А - способност сакупљања ABTS ^{•+} (ABTS тест); В - способност хелирања јона Fe ²⁺ (FCC тест); С - способност редукције јона Fe ³⁺ (редукујућа моћ; FRP тест); D – укупни антиоксидативни редукујући капацитет (TPC)	134
Слика 4.51. Пенива својства (FC – капацитет пене; FS – стабилност пене) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената	137
Слика 4.52. Емулгујућа својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената; А – ESI (индекс стабилности емулзије), В – EAI (индекс активности емулзије)	138
Слика 4.53. Антибактеријска својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената.....	141
Слика 4.54. Антифунгална својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената.....	142
Слика 4.55. Способност сакупљања ABTS ^{•+} (ABTS тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената.....	145
Слика 4.56. Способност хелирања јона Fe ²⁺ (FCC тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената.....	147
Слика 4.57. Способност редукције јона Fe ³⁺ (редукујућа моћ; FRP тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената	149
Слика 4.58. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет (TPC) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената	150
Слика 4.59. Антиоксидативна својства дехидрисаних супа без и са додатком оптимизованих адитива; А - способност сакупљања ABTS ^{•+} (ABTS тест); В - способност хелирања јона Fe ²⁺ (FCC тест); С - способност редукције јона Fe ³⁺ (редукујућа моћ; FRP тест); D – укупни антиоксидативни редукујући капацитет (TPC)	153

Листа табела

Табела 2.1. Основни хемијски састав козјег млека у поређењу са хуманим и крављим млеком.....	8
Табела 2.2. Инкапсулација/комплексација/пренос супстанци од интереса помоћу протеина млека	21
Табела 2.3. Функционални производи на бази гљива	36
Табела 3.1. Шема експерименталних фактора и њихових нивоа код FFD.....	47
Табела 3.2. Састав основних раствора и симулираних дигестивних сокова.....	51
Табела 4.1. Садржај глукана у воденим и полисахаридним екстрактима <i>A. blazei</i> и <i>L. sulphureus</i>	55
Табела 4.2. Садржај фенолних једињења екстракта <i>A. blazei</i> анализиран UHPLC-DAD MS/MS.....	56
Табела 4.3. Средњи (<i>mean</i>) и најчешћи (<i>mode</i>)* дијаметар полидисперзних честица казеина и мешавина са екстрактима <i>L. sulphureus</i>	62
Табела 4.4. FFD антиоксидативних својстава мешавина, реалне вредности	95
Табела 4.5. Експериментални фактори и њихови нивои код CCD.....	113
Табела 4.6. CCD антиоксидативних и техно-функционалних својстава мешавина, реалне вредности	114
Табела 4.7. Садржај глукана у воденим екстрактима <i>A. blazei</i> и <i>L. sulphureus</i> коришћеним за прављење мешавина током и након CCD	114
Табела 4.8. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности	115
Табела 4.9. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета хелирања (FCC тест) мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности	117
Табела 4.10. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања редукујуће моћи (FRP тест) мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности	118
Табела 4.11. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета пене мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности.....	120
Табела 4.12. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања стабилности пене мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности....	120
Табела 4.13. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса стабилности емулзије мешавина са <i>A. blazei</i> , кодиране вредности	122

Табела 4.14. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса активности емулзије мешавина са <i>A.blazei</i> , кодиране вредности	122
Табела 4.15. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности.....	123
Табела 4.16. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета хелирања (FCC тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности	125
Табела 4.17. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања редукујуће моћи (FRP тест) мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности	126
Табела 4.18. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета пене мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности....	128
Табела 4.19. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања стабилности пене мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности	128
Табела 4.20. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса стабилности емулзије мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности	130
Табела 4.21. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса активности емулзије мешавина са <i>L. sulphureus</i> , кодиране вредности	130
Табела 4.22. Параметри оптимизације одговора мешавина са <i>A.blazei</i> према функцији пожељности задати статистичком програму Minitab	131
Табела 4.23. Параметри оптимизације одговора мешавина са <i>L. sulphureus</i> према функцији пожељности задати статистичком програму Minitab	132
Табела 4.24. Оптимизација одговора мешавина са <i>A.blazei</i> према функцији пожељности ...	132
Табела 4.25. Оптимизација одговора мешавина са <i>L. sulphureus</i> према функцији пожељности	133
Табела 4.26. Статистички значајне корелације између антиоксидативних тестова коришћеним у истраживањима на оптимизованим адитивима и њиховим почетним конституентима	151

1. Увод

Промене начина живота које су настале у XX веку, укључујући и експоненцијални развој науке утицале су на подизање свести о храни и исхрани. Интересовање за функционалну храну и њен здравствени аспект је нагло порасло почетком XXI века, што се огледа у броју научних радова на ову тему, као и у растућем тржишту функционалних производа које прати њихову потражњу.

Због заступљености у људској исхрани, млеко као намирница, конституенти млека и млечни производи су једна од највише проучаваних тема у науци о храни. Козје млеко и његови производи могу бити профитабилна алтернатива крављем млеку, због великог броја својстава која то омогућавају, као нпр. балансираног садржаја нутритивних и биоактивних компоненти, ниских алергених својстава, ниже цене производње, репутације здравих природних производа, итд. (Park, 2017). Све је више истраживања карактеристика протеина млека које их чине погодним носачима биоактивних једињења, јер је показано да протеини крављег млека за себе могу везати разноврсне супстанце, као што су полифеноли, витамини, незасићене масне киселине, итд. (Moeller et al., 2017). Иако козје млеко има различит садржај појединачних казеина и серум протеина у односу на кравље млеко, као и другачије организовану казеинску мицелу као резултат свог састава, истраживања која се баве интеракцијама протеина козјег млека и других једињења недостају. Такође, козје млеко након термичког третмана који је чест корак у производњи млека и млечних производа садржи казеинске мицеле којима је измењена структура, односно може се рећи да је казеинска мицела обogaћена серум протеинима (Pesic et al., 2012). Ово може утицати на промену техно-функционалних и функционалних својстава козјег млека, а према литератури адитиви базирани на термички третираном козјем млеку до сада нису били проучавани.

Са друге стране, царство гљива и супстанце екстраховане из плодноносних тела макромрицета су у жижи интересовања научне заједнице, не само из области науке о храни, биологије и хемије, већ и фармације и медицинских наука, а посматрају се и са индустријског аспекта. Овакво интересовање дугују свом биохемијском саставу и бројним корисним биолошким активностима. Једна од најпроучаванијих јестивих и лековитих гљива је *Agaricus blazei*, која се због својих нутритивних и лековитих карактеристика сматра народним леком у државама Јужне Америке, а успешно се узгаја широм света, што је битно због доступности њених биоактивних једињења (de Miranda, 2022). Насупрот комерцијално доступној гљиви *Agaricus blazei*, гљива *Laetiporus sulphureus* се углавном користи у истраживањима као самоникла, иако може бити узгајана у лабораторијским условима, те стога студије везане за искоришћење њеног биоактивног потенцијала доприносе њеној употреби и популаризацији (Khatua et al., 2017).

Сушене гљиве или екстракти гљива се често користе за фортификацију немлечних производа или производа на бази млека, али не и млека, па постоји недостатак научних података који се односи на интеракције једињења пореклом из гљива и млека (González et al., 2020). Такође, ако се једињења гљива помињу у заједничком контексту са једињењима млека или млечним производима, увек се ради о крављем млеку. Према доступним сазнањима, термички третирано и нетретирано козје млеко, као и његова казеинска фракција нису коришћени као база за формулацију адитива са додатком екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*. Испитивањем ових сировина, као и могућности њихове примене може се попунити празнина у научној литератури везана

за неколико различитих тема, док се формулацијом адитива могу објединити корисне биоактивне супстанце пореклом из гљива и козјег млека са добрим техно-функционалним својствима протеина млека. Такође се мора нагласити и комерцијални и индустријски значај оваквих испитивања. Аутори покушавају да укажу на важност гљива јер се оквирно глобално тржиште гљива процењује на чак 55 трилиона (10^{12}) америчких долара, уз предвиђен раст тржишта јестивих гљива са 14,35 милиона тона у 2020. години на 24,05 милиона тона у 2028. (Łysakowska et al., 2023; Niego et al., 2023). Глобално тржиште функционалних производа процењено је на 258,80 милијарди америчких долара у 2020. години и очекује се да са растом од 9,5% на годишњем нивоу достигне близу 530 милијарди долара у 2028. (Dias et al., 2023).

Осим испитивања везаних за биохемијску карактеризацију полазних сировина, као и метода којима се могу испитивати њихове потенцијалне интеракције, централни део ове дисертације чини експериментални дизајн. Пажњу научника све више привлачи коришћење експерименталног дизајна за оптимизацију реалних система. Иако се технике као што је методологија одговора површина све више користе у науци о храни, већи број радова на ову тему допринео би помаку у овој области који аутори наводе као неопходан јер храна представља сложен систем (Madoumier et al., 2019). Такође, испитивањем биолошких и техно-функционалних својстава оптимизованих адитива и убацивањем у прехранбени производ испитивања се приближавају реалним условима, а истраживање обухвата читав процес од идеје, полазних испитивања, оптимизације, анализе оптимизованих адитива, све до конкретног прехранбеног производа са побољшаном функционалношћу.

На основу свега до сада представљеног, циљ ове дисертације је била формулација нових функционалних производа на бази протеина козјег млека и екстраката јестивих и лековитих гљива из рода *Laetiporus* и *Agaricus* што би проширило постојећу употребу и козјег млека и ових гљива у производњи функционалне хране. Поред тога, детаљном биохемијском карактеризацијом добијених производа, оптимизацијом поступка њиховог добијања, испитивањем биодоступности и примене требало би да се допринесе проширењу постојећег знања у области хемије и биохемије хране.

На основу свега изнетог, постављени су следећи циљеви истраживања:

- Анализа биохемијског састава екстраката гљива;
- DLS мерења, електрофоретске, FTIR анализе и снимање микроструктуре помоћу SEM мешавина термички третираног и нетретираног козјег млека, њихових казеинских фракција, као и екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus* како би се утврдило да ли постоје интеракције између конститuentата; уколико их има – ког су типа и које мешавине показују најбоља својства;
- Утврђивање оптималног односа екстраката гљива и млека са аспекта најповољнијих антиоксидативних и техно-функционалних својстава применом дизајна експеримента;
- Истраживања на оптимизованим адитивима како би се утврдило да ли мешавине имају својства функционалне хране кроз испитивања антиоксидативних, антимикуробних, техно-функционалних својстава, затим *in vitro* дигестије добијених адитива у симулираном дигестивном тракту, као и испитивања модел производа (дехидрисаних супа) у које је убачен оптимизовани адитив.

2. Преглед литературе

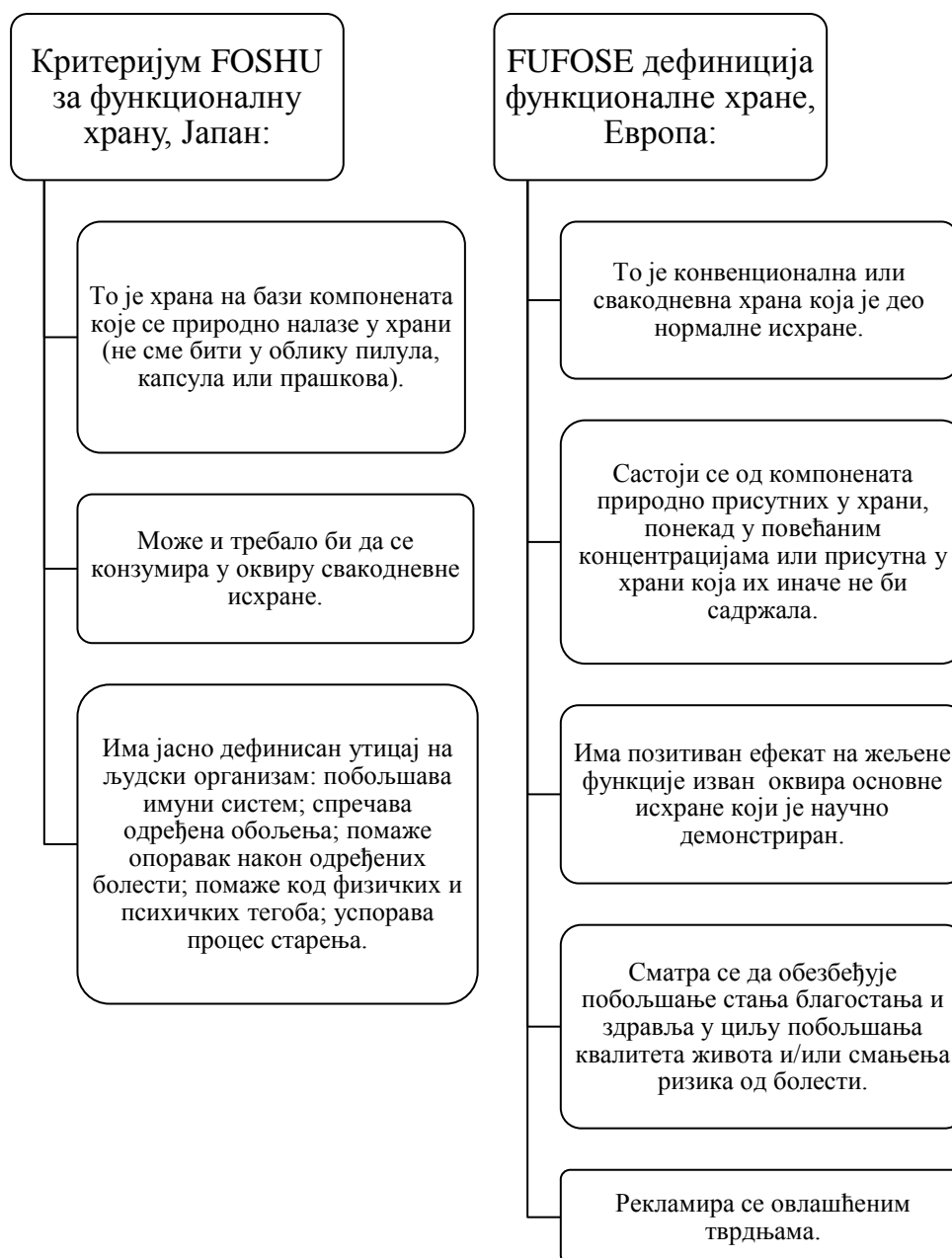
2.1. Функционална храна

Здрава исхрана је један од кључних елемената здравог начина живота. Позната изрека „Нека ти храна буде лек, нека ти лек буде храна“ често се приписује Хипократу, иако за то нема никаквих доказа (Witkamp & van Norren, 2018). Без обзира на то, интересовање за здравствени аспект компонената хране је постојало још у античкој Грчкој, Кини и многим другим цивилизацијама. Савремени термин „функционална храна“ је настао у Јапану 1984. године (Alongi & Anese, 2021). Овај термин подразумева храну, која осим нутритивне, енергетске или гастрономске улоге има додатну вредност, тј. функцију. Јапан је прва земља која је законски регулисала производе који могу спадају у ову категорију (*Foods Of Specified Health Use – FOSHU*) (López-Varela et al., 2002). Касније су САД, а након тога и европске земље усвојиле овај принцип. Под патронатом Европске уније и *ILSI* института (*International Life Sciences Institute Europe*) настала је консезусна дефиниција функционалне хране (слика 2.1.) у оквиру пројекта *FUFOSE (Functional Food Science in Europe)* (López-Varela et al., 2002).

Тврдње о здравственом бенефиту који следи након конзумирања функционалних производа се проверавају од стране различитих тела. У земљама Европске уније, за то је задужена Европска агенција за безбедност хране (*European Food Safety Authority - EFSA*), док је у САД задужена Управа за храну и лекове (*Food and Drug Administration – FDA*) и оба тела имају своје захтеве који се тичу потребних доказа које компаније које производе функционалну храну морају да прикажу како би могле да рекламирају нутритивне вредности и здравствене предности својих производа (González-Díaz et al., 2018). Интересовање за овај приступ храни константно расте, што се огледа у расту броја научних радова где се помиње функционална храна, као и у растућем тржишту (Alongi & Anese, 2021). Како би се превазишли проблеми попут различитих дефиниција и законске регулативе, као једно од могућих решења аутори наводе холистички приступ који би, осим ревидирања дефиниција и усаглашавања законских регулатива требало да умањи јаз између технолошког и нутритивног становишта налажењем најбољих компромисних решења између квалитета и функционалности, као и побољшање комуникације између заинтересованих страна (Alongi & Anese, 2021). Све већи број производа на тржишту са тврдњама о различитим бенефитима на функционалним производима захтева регулацију прописа на интернационалном нивоу због три главна разлога (Domínguez Díaz et al., 2020):

1. мора се избећи обмањујуће рекламирање, као и нелојална конкуренција у прехранбеној индустрији;
2. мора се дозволити слободан промет функционалних производа широм света;
3. потрошачи се морају заштитити тако што ће им се пружити све информације које су потребне како би могли да одаберу храну на адекватан начин.

Да би функционална храна била доступнија и конкурентнија, потребно је побољшати управљање ланцима снабдевања, с обзиром на то да се због животног циклуса производа мора водити рачуна о времену, као и едукацију произвођача о заштити иновативне интелектуалне својине кроз патентирање (Shegelman et al., 2020).



Слика 2.1. Шематски упоредни приказ критеријума за функционалну храну у Јапану и дефинисања функционалне хране у европским земљама (López-Varela et al., 2002).

Без обзира на проблеме везане за дефиниције и законе, граничне области између фармације и исхране су предмет истраживања све већег броја студија (Witkamp & van Norren, 2018). Биоактивне супстанце из функционалних производа директно утичу на биолошки одговор организма пружајући му разнолик здравствени бенефит (Aguiar et al., 2019). Значај функционалне хране је порастао након пандемије корона вируса (COVID-19), узимајући у обзир имуностимулишуће дејство функционалних компонента хране. Промоција здравог начина живота укључујући и функционалну храну се наводи као једна од стратегија за јачање урођеног имуног система која резултује отпорношћу на вирусе (Han & Hoang, 2020). Пријављено је да је стопа смртности од корона вируса била већа уколико су пацијенти имали једну или више хроничних болести (Hamid & Thakur, 2021). Ове болести слабе имуни систем и повећавају осетљивост на корона вирус и друге микроорганизме, па би исхрана богата

разним супстанцама које стимулишу имуни систем (фенолна једињења, терпеноиди, алкалоиди, стероли, пигменти, незасићене масне киселине, микронутријенти, витамини и минерали) била пожељна (Alkhatib, 2020; Hamid & Thakur, 2021). Функционална храна се наводи и као једно од решења за смањење стопе незаразних болести, као што су аутоимуне болести, мождани удар, хроничне болести, дијабетес, хипертензија, гојазност итд. (Sumaedi & Sumardjo, 2021).

2.2. Адитиви

Прехрамбени адитив је било која супстанца која није храна сама по себи, нити је састојак хране, али када се дода у производ за потребе прераде постаје део хране (Badora et al., 2019). У адитиве се не убрајају контаминанти или супстанце које се додају ради одржавања или поправљања нутритивног квалитета, као ни натријум хлорид (Carocho et al., 2015). Историјат коришћења адитива сеже још до античких времена. Међу првим адитивима који су коришћени у људској исхрани су сумпор диоксид (E220), сирћетна киселина (E260), натријум-нитрит (E250), док су се као прве боје користили куркумин (E100) и кармин (E120) (Badora et al., 2019). Током XIX века развијале су се хемија, биологија и медицина, што је довело до открића многих хемијских супстанци од којих су неке биле корисне, док су друге имале катастрофално дејство када су додаване у храну због недовољног знања везаног за њихову токсичност. Првенствено је развој адитива био везан искључиво за конзервирање хране, па се циљ полако проширио на побољшање органолептичких својстава помоћу боја, арома и заслађивача (Badora et al., 2019).

На глобалном нивоу, 1962. године Светска здравствена организација (*World Health Organisation - WHO*) и Организација за храну и пољопривреду (*Food and Agriculture Organization - FAO*) су издале *Codex Alimentarius* као збир стандарда, правила поступања, смерница и препорука везаних за храну. Иако ово није званичан закон, признат је у готово свим земљама света (Badora et al., 2019). У Европској унији и другим земљама Европе, 2002. године основана је *EFSA* која је заснована на *Codex Alimentarius*, али спроводи и своја независна истраживања. У САД се овиме бави *FDA*, тако да се листа адитива дозвољених у Европи (око 330 одобрених адитива) разликује од америчке (Badora et al., 2019; Carocho et al., 2015; Chazelas et al., 2020). У Републици Србији на снази је правилник (Pravilnik о Prehrambenim Aditivima, Službeni glasnik RS, 53/2018) који прописује правила везана за прехрамбене адитиве, подручје примене, дефиниције адитива, листе одобрених адитива, њихову употребу, означавање и др. У европским земљама ради стандардизације сваки адитив има свој код који се састоји од слова Е и три или четири цифре. Постоје детаљне класификације адитива на бази улоге коју имају у производу (Faustino et al., 2019), мада често један адитив може имати више улога у храни. Генерална подела према Е бројевима је (Badora et al., 2019):

- боје: E100 – E199;
- конзерванси и регулатори киселости: E200 – E299;
- антиоксиданти и синергисти: E300 – E399;
- стабилизатори, згушњивачи, емулгатори, средства за глазирање и повећање запремине: E400 – E499;
- друге супстанце: E500 и даље.

Током осамдесетих година XX века адитиви су сматрани опаснима и од тада постоји одређена доза неповерења и страха конзументата. Односи конзументата према адитивима варирају и предмет су бројних научних студија и испитивања тржишта (Carocho et al., 2015). Данас се могу наћи студије које показују штетност одређених адитива по

здравље, као нпр. сорбата или парабена (Carocho et al., 2015). Често се не може говорити уопштено о адитивима, с обзиром на то да обухватају широку групу супстанци. На пример, аутори са аспекта ефеката на микробиом наводе штетне ефекте које испољавају синтетички заслађивачи, док истичу да одређени шећерни алкохоли могу имати ефекат сличан пробиотицима (Gultekin et al., 2020). Иако регулаторна тела ажурирају своје листе и ADI вредности (*Acceptable Daily Intake* – прихватљив дневни унос), чак и за адитиве испитиване деценијама постоје недоумице око дугорочног излагања (Carocho et al., 2015). Ово, као и нераздевање научних изјава доводи ширу јавност у забуну о токсиколошким ефектима и процени ризика везаним за коришћење адитива (Jansen et al., 2020). Аутори истичу да је ажурирање аналитичких метода за детекцију адитива у храни, као и развој брзих метода од кључне важности због дозирања и правилне примене адитива, као и смерница за регулаторна тела (Oreopoulou et al., 2009; Wu et al., 2022). Такође се наглашава да је потребно и унапређење метода за проучавање токсичности (Kumar et al., 2019).

Једна студија која је обухватила више од 126.000 производа присутних на тржишту Француске показала је да се у више од 53% свих производа налази бар 1 адитив, а у 11,3% бар 5 адитива, од чега су најчешће коришћени лимунска киселина, лецитини и модификовани скробови (Chazelas et al., 2020). У 50 најчешће доданих адитива улазе и они са сумњивим последицама по здравље, као што су натријум нитрит, калијум нитрат, карагенан, мононатријум глутамат, итд., а научнике брине и то што нема података о здравственим ефектима истовременог коришћења више адитива, јер се могу истаћи кластери адитива који се често појављују заједно у производима (Chazelas et al., 2020). Чак и када студије докажу да одређени адитиви (као нпр. натријум ацетат, натријум диацетат и калијум сорбат) немају цитотоксична или генотоксична својства, аутори препоручују њихово замењивање природним супстанцама (Mohammadzadeh-Aghdash et al., 2018).

Услед презасићености адитивима и конзумирања „ултра-прерађене“ хране, адитиви природног порекла привлаче све више пажње конзументата. Информације о њима, као и пласирање на тржиште би били олакшани када би постојале јасне дефиниције природних адитива и одговарајућа законска регулатива (Carocho et al., 2015; Chazelas et al., 2020). Студије показују да конзументи радије бирају адитиве природног уместо хемијског порекла (Carocho et al., 2015). Растући део тржишта хране (тзв. *Clean Label Trend*) бира производе са природним, познатим и једноставним састојцима, без синтетских једињења, чије се етикете могу лако прочитати (Munekata et al., 2020). Природни адитиви могу се поделити на природне антиоксиданте, антимикробна средства, боје и заслађиваче; неки од најпознатијих су фенолна једињења, аскорбинска киселина, каротеноиди, токофероли, есенцијална уља, хлорофил, куркумин, итд. (Carocho et al., 2015). Предности њиховог коришћења леже у безбедности, синергистичком својству, ефективности и ширем спектру деловања. Као извори природних адитива се наводе и споредни производи из пољопривредне и прехранбене индустрије, где се поред функционалности и биоактивности промовише и концепт циркуларне економије и одрживости (Faustino et al., 2019; Rajković et al., 2020; Ueda et al., 2022). Поред предности, ипак се морају узети у обзир и одређена ограничења, као што је цена, дозирање, токсиколошка испитивања која се морају спровести и за природне адитиве, интеракције са компонентама хране, као и непостојећа глобална законска регулатива (Carocho et al., 2015). Због тога су научне студије у овој области увек интересантне и за науку и за индустрију, поготово када се ради о безбедним функционалним адитивима природног порекла.

2.3. Козје млеко

2.3.1. Хемијски састав и нутритивна својства козјег млека

Узгајање коза због меса и млека је у великом успону, а процењује се да се број ових животиња на светском нивоу повећао са 350 милиона на више од једне милијарде у последњих 60 година (Hammam et al., 2021). Узгајају се највише на простору Азије, Африке, Медитерана и Блиског истока (Hammam et al., 2021), а процењује се да чак 94% популације насељава најсиромашније земље Африке и Азије (Rai et al., 2022).

Иако постоје одређене разлике, основни хемијски састав козјег млека не разликује се пуно од крављег млека (табела 2.1.) (Turkmen, 2017). Услови од којих зависи хемијски састав млека су бројни - раса животиње, сама животиња у оквиру расе, њена исхрана, старост, паритет, услови окружења, услови у којима се животиња храни и чува, годишње доба, локалитет, фаза лактације, здравствени статус вимена (Clark & Mora García, 2017; Park, 2017; Qin et al., 2021; Turkmen, 2017; Zhao et al., 2022). Варирања су посебно изражена током различитих фаза лактације и годишњих доба – током ране фазе лактације садржај масти, суве материје и протеина је висок, затим брзо опада и достиже минимум током другог или трећег месеца лактације, а онда се повећава како се ближи крај лактације; отуда могу потицати варијације у саставу млека у литератури (Park, 2017). Најуочљивије разлике између козјег и крављег са једне и хуманог са друге стране је у садржају минерала и укупних протеина, што је везано за стопу раста новорођенчади ових врста, као и проценат енергије која се добија из лактозе и протеина (Park, 2017). Поређења козјег са крављим и хуманим млеком су најчешћа у литератури, оправдана су са нутритивног и комерцијалног становишта и добро су проучена (Farrell et al., 2006).

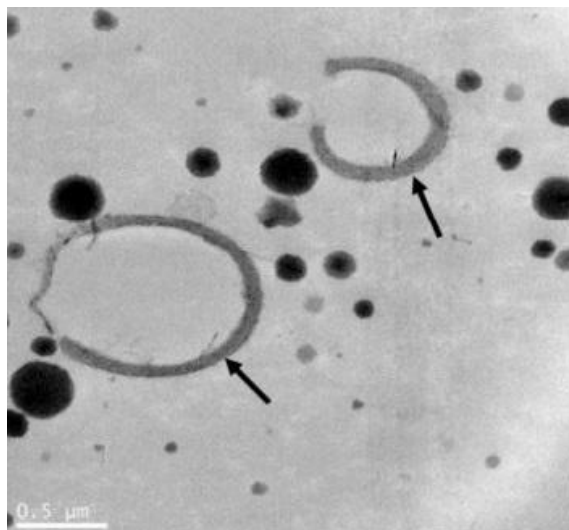
Први научни рад везан за козје млеко се појавио још 1902. године и он се односио на ризике и предности храњења одојчади козјим млеком (Hammam et al., 2021). Приликом истраживања везаних за нутритивни значај козјег млека у примени формула за бебе мора се водити рачуна да оне имају мању концентрацију протеаза и вишу рН вредност желуца, тј. да је варење протеина мање интензивно него код одраслих људи (Hodgkinson et al., 2018). Коришћење козјег млека за развој формула за одојчад носи одређене предности, као што су лакше варење (због формирања мањих агрегата протеина и капљица уља током варења и нижег степена коагулације), затим бољи когнитивни развој, као и развој имунолошког система (Gallier et al., 2020; Ye et al., 2019). У клиничким истраживањима је потврђено да козје млеко може бити основа формула за одојчад, али су констатације о коришћењу козјег млека у ове сврхе за сад дискутоване само у научној литератури и нису комерцијализоване (Prosser, 2021).

Додатна побољшања квалитета козјег млека и производа, укључујући и нутритивни састав, могу се постићи променом исхране коза, увођењем нових *on-line* сензора у производњи, као и формулацијом производа са додатом вредношћу (García et al., 2014). Стално се ради на побољшању функционалних својстава компонената козјег млека, али и широке палете производа од козјег млека (Naagar & Kanawjia, 2019; Pal et al., 2017).

Табела 2.1. Основни хемијски састав козјег млека у поређењу са хуманим и крављим млеком, из Turkmen, 2017* и Park, 2017#

Конституенти	Козје млеко		Хумано млеко		Кравље млеко	
Енергетска вредност (kcal)	69*	70#	70*	68#	61*	69#
Укупна сува материја (g/100g)	13,2*	12,2#	12,4*	12,3#	12,6*	12,3#
Масти (g/100g)	4,5*	3,8#	3,8*	4,0#	3,7*	3,6#
Укупни протеини (g/100g)	3,6*	3,5#	1,0*	1,2#	3,4*	3,3#
Лактоза (g/100g)	4,3*	4,1#	7,0*	6,9#	4,7*	4,6#
Минерали (g/100g)	0,8*	0,8#	0,2*	0,2#	0,7*	0,7#

Масти се у козјем млеку налазе у виду глобула, и то 97-99% у слободном облику и 1-3% у везаном облику (Park, 2017). У литератури се могу наћи различити подаци о величини масних глобула – 2,76 μm ; 3,20 μm ; 3,49 μm , а оно што је заједничко јесте да је просечни пречник глобула мањи од већине осталих испитиваних млека (Park, 2017; Turkmen, 2017). Осим просечне вредности, добар показатељ је и заступљеност глобула мањих од 5 μm , која износи више од 80% код козјег, а нпр. 60% код крављег млека (Turkmen, 2017). Због мањег пречника, глобуле имају већу спољашњу површину на коју могу да делују липазе, па постоје претпоставке да се лакше варе (иако ове тврдње треба додатно потврдити), али то утиче на технолошка својства производа на бази козјег млека (Park, 2017; Prosser, 2021). Биолошки омотач око глобула чине протеини, гликопротеини, холестерол, сфинголипиди, глицерофосфолипиди, ензими и друге компоненте (Chauhan et al., 2021). На површини глобула масти примећено је присуство мањих казеинских мицела величине 20 – 60 nm, које учествују у стабилизацији мембране (слика 2.2.), као и присуство серум протеина (Luo et al., 2014). Конзумирањем масти козјег млека, као и казеина, снижава се ниво холестерола, уз пратећа антиоксидативна својства (Kalyan et al., 2018).



Слика 2.2. Трансмисиони електронски микрограф свежег козјег млека, тамне ситне сфере представљају казеинске мицеле, веће сфере су глобуле масти, стрелице показују ка мембранама глобула масти (Gallier et al., 2020)

Козје млеко је богато масним киселинама кратких и средњих ланаца, као што су капронска, каприлна, капринска (одговорне за карактеристичан мирис козјег млека) и лауринска киселина, а богато је и есенцијалним масним киселинама и коњугованом линолном масном киселином које се повезују са бројним здравственим бенефитима (Park, 2017; Turkmen, 2017).

Главни угљени хидрат у козјем млеку је лактоза, а осим ње има олигосахарида, као и продуката насталих од лактозе, који делују као пребиотици и побољшавају интестиналну апсорпцију минерала (Sonu & Basavaprabhu, 2020; Turkmen, 2017). Козје млеко садржи више олигосахарида у односу на кравље и хумано млеко, па се истиче његова пребиотска функција у организму (Saikia et al., 2022). Посебно су битни код исхране новорођенчади јер стимулишу раст бифидобактерија и тиме бране организам од патогена (Raynal-Ljutovac et al., 2008). Осим пребиотске улоге, из свежег козјег млека се изолују пробиотици, а производи од козјег млека су означени као добри носиоци пробиотика због свог нутритивног профила (Ranadheera et al., 2018, 2019). Постоје хипотезе да особе са интолеранцијом на лактозу могу конзумирати козје млеко. Без обзира што и козје млеко садржи лактозу, млеко се комплетније и лакше вари, остаје мање недигестованог садржаја који би могао да изазива симптоме интолеранције у цревима, па остаје да се провере тврдње да ли добра дигестивност козјег млека „маскира“ интолеранцију на лактозу (Sonu & Basavaprabhu, 2020).

Што се тиче минералног састава, козје млеко је богато калцијумом, фосфором, калијумом, магнезијумом, хлором, а различите студије показују да је биодоступност гвожђа, селена, цинка и бакра била већа код пацова храњених козјим у односу на кравље млеко (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Turkmen, 2017).

Козје млеко садржи више витамина А у односу на кравље млеко, али има нижи садржај витамина Б₁₂ и фолне киселине, па се због овога деца не смеју хранити искључиво козјим млеком, да не би дошло до анемије, јер је фолна киселина потребна за синтезу хемоглобина (Turkmen, 2017). Поред овога, козје млеко има нижи садржај витамина Б₆, Д, Ц и Е (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Turkmen, 2017).

Садржаји непротеинског азота су слични код козјег (0,4%) и хуманог млека (0,5%), а већи су од крављег (0,2%) (Park et al., 2007). Овде се убрајају слободне аминокиселине, полиамини, нуклеотиди, нуклеозиди и нуклеобазе, супстанце од виталног значаја за новорођенчад (Park et al., 2007; 2017; Raynal-Ljutovac et al., 2008). Са развојем нових инструменталних анализа откривају се нови конституенти млека са разноликим корисним биолошким улогама интересантним за истраживаче, као што је нпр. присуство микро-РНК молекула у млеку (Benmoussa & Provost, 2019).

2.3.2. Протеини козјег млека

Протеини млека су подељени у две категорије према растворљивости – једну групу чине казеини (нерастворљиви протеини), док другу групу чине серум протеини или протеини сурутке (Pešić, 2011; Selvaggi et al., 2014). Казеини (CN) су фосфопротеини који се таложе када се млеку рН вредност спусти испод одређене границе (рН 4,2 за козје млеко; рН 4,6 за кравље млеко) на температури од 20°C, док серум протеини остају растворљиви у серуму млека и након ове преципитације (Pešić, 2011). Казеини спадају у киселе протеине, тј. изоелектрична тачка им се налази у киселој средини, па у неутралној рН средини имају негативно наелектрисање (de Kruif, 2003). Деле се на α_1 -, α_2 -, β - и κ -CN, док су главни серум протеини α -лакталбумини (α -LA), β -лактоглобулини (β -LG), као и мање заступљени протеини (серум албумин крви – BSA,

имуноглобулини, лактоферин, протеозопептонске фракције) (Farrell et al., 2006; Pešić, 2011; Selvaggi et al., 2014). Више од 95% протеина у млеку чини шест главних фракција - α_1 -, α_2 -, β -, κ -CN, α -LA и β -LG, док је однос казеина и серум протеина у козјем млеку оквирно 80:20 (Prosser, 2021; Selvaggi et al., 2014). Протеини козјег млека су у позитивној корелацији са одређеним пробиотским културама, што је још један од резултата који упућује на функционалност протеина (Z. Wang et al., 2018). Протеини крављег млека имају широку примену у прехранбеној индустрији, углавном се користе у виду прашкастих материја као што су концентрат протеина млека (оквирно 40-85% садржај протеина) и изолат протеина млека (око 90% протеина), где је сачуван однос казеина и серум протеина 80:20 (Nunes & Tavares, 2019). Међу казеинатима, најчешћи су Na-казеинат и Ca-казеинат (први се више користи због боље растворљивости), док се протеини сурутке такође јављају у форми концентрата и изолата (Nunes & Tavares, 2019).

2.3.2.1. Казеини

Казеини су главна протеинска фракција млека и њихова функција је испорука калцијума и фосфора од мајке ка детету, као и неопходних аминокиселина потребних за раст и развој (Cheema et al., 2015; Selvaggi et al., 2014). У млеку се налазе у облику казеинских мицела (Pešić, 2011). Један од најважнијих разлога зашто се калцијум налази унутар оваквих творевина је спречавање калцификације ткива млечних жлезда (de Kruif, 2003). Све четири главне фракције казеина (α_1 -, α_2 -, β - и κ -CN) се разликују по својој структури, познате су њихове различите генетичке варијанте, а због различитих нивоа фосфосерина и фосфотреонина реагују са калцијумом и калцијум-фосфатом (de Kruif, 2003). Распоред наелектрисаних и хидрофобних аминокиселинских региона се разликује код сваке врсте казеина и омогућава им да се повезују између себе, као и са бројним другим компонентама (de Kruif, 2003). Казеинске мицеле су врло отпорне на загревање, хлађење и сушење, а ниједан од казеина нема већу заступљеност елемената секундарне структуре, што је уз одсуство дефинисане трајне терцијарне структуре навело научнике да казеине назову „реоморфнима“ или „природно несређенима“, што даље значи да могу мењати своју структуру како би се адаптирали условима средине (Dalglish, 2011; de Kruif, 2003).

α_1 -казеини се састоје од 214 аминокиселинских остатака, високо су фосфорилловани и постоје различите варијанте код различитих животињских врста (Selvaggi et al., 2014). Група α_2 казеина је разноврснија и мање је проучена од осталих казеина. Састоји се од главне компоненте са 207 аминокиселинских остатака, као и минорне компоненте, такође је високо фосфориллован, има велики број позитивно наелектрисаних група, садржи два остатка цистина, карактерише га одсуство пролина и такође су пронађене различите варијанте овог протеина (Selvaggi et al., 2014). Различите варијанте гена задужених за продукцију α_1 -казеина, доводе до високих, средњих, ниских концентрација или потпуног одсуства овог казеина у млеку, што последично може довести до различитог понашања током прераде млека у млечне производе (Pešić, 2011; Selvaggi et al., 2014). Слична ситуација је и са полиморфизмом α_2 -казеина у млеку (Selvaggi et al., 2014). Нижи нивои α_1 -казеина у козјем млеку последично доводе до другачије структуре казеинских мицела; мицеле су веће са више хидратисаним порама (Prosser, 2021).

β -казеини су најзаступљенији казеини у козјем млеку. Мање су фосфорилловани у односу на α_1 - и α_2 - казеине и карактерише их висока концентрација глутаминских (Selvaggi et al., 2014). Једини су казеини који имају својство самосталног груписања у мицеларне структуре зависно од температуре и концентрације (Perinelli et al., 2019).

Састоје се од једног ланца са 209 аминокиселинских остатака, амфифилни су и флексибилни јер немају интрамолекуларне везе и секундарну структуру (Dhasmana et al., 2022). Састоји се од хидрофилног негативно наелектрисаног дела код N-терминуса и изразито хидрофобног региона код C-терминуса (Dhasmana et al., 2022).

α s- и β -CN се убрајају у калцијум-сензитивне протеине, јер се таложе у присуству Ca^{2+} јона, док је к-казеин у присуству Ca^{2+} растворљив и при изградњи мицеле служи као заштитни колоид (de Kruif, 2003). Козји к-казеин се састоји од 171 аминокиселинског остатка, јавља се у полимерном облику због присуства дисулфидних веза и мање је фосфорилисан од осталих казеина (Selvaggi et al., 2014). Налази се у облику мешавине полимера који су међусобно повезани интермолекуларним дисулфидним везама (Park, 2017). Такође је једини казеин кога карактерише присуство угљених хидрата (Selvaggi et al., 2014). Остаци серина и треонина су гликозиловани помоћу O-гликозидних веза, а угљенохидратни састав чине галактоза, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилнеураминска киселина (Selvaggi et al., 2014). На површини казеинске мицеле се већински налази к-казеин и служи за њену стабилизацију захваљујући гликозилацији и негативном наелектрису услед присуства аспартата и глутамата на C-терминусу (Selvaggi et al., 2014). Око 50% к-казеина је гликозиловано и његов C-терминус је хидрофилан, што му омогућава да стабилизује казеинску мицелу (Broyard & Gaucheron, 2015). Осетљив је на деловање химозина који га цепа на хидрофобан парак-казеин и хидрофилан казеинмакропептид (CMP) (Pešić, 2011).

Генерално посматрано, α s-казеини су мање заступљени у козјем у односу на кравље млеко (Pešić, 2011). Док је α s₁-казеин најзаступљенији у крављем млеку (~38% укупних казеина), у козјем га има значајно мање (5,6%); козје и кравље млеко имају сличну заступљеност α s₂-казеина (5-19%) и к-казеина (10-24%), док је козје млеко сличније хуманом по садржају β -казеина (козје ~55%; хумано 60-70%), а кравље га садржи мање (Turkmen, 2017). Узимајући у обзир да је дигестивност β -казеина око 70%, а α s₁-казеина око 30%, козје, као и хумано млеко се лакше варе, јер је β -казеин осетљивији на дејство пепсина (Turkmen, 2017).

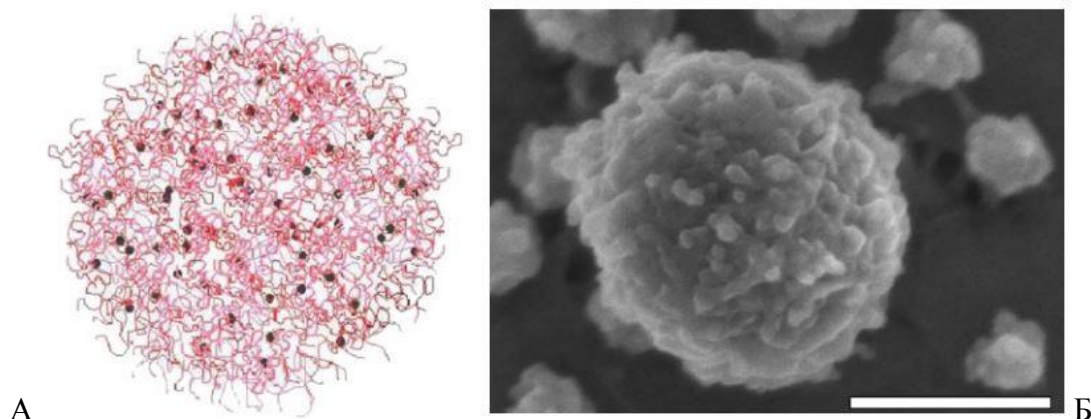
Казеинати крављег млека имају широку примену у прехранбеној индустрији. Додају се ради везивања воде, стабилизовања емулзија, пена, ради побољшања вискозитета, текстуре, због побољшања нутритивне вредности, итд., а палета производа у које се додају је такође велика – дезерти, ферментисани млечни производи, производи од меса, екструдирани производи, итд. (de Kruif, 2003; Маџеј et al., 2007).

2.3.2.2. Структура казеинске мицеле

Казеини заједно са калцијум-фосфатом граде хетерогене колоидне честице назване казеинске мицеле. Иако је структура казеинске мицеле предмет бројних истраживања од XX века, па до данас, и даље је предмет дебата међу научницима (Bauland et al., 2022; de Kruif et al., 2012; Holt et al., 2013). Састоје се од ~ 93% казеина, док преостали део чини колоидни калцијум фосфат (CCP) (de Kruif et al., 2012). Површина мицела није глатка, док је њена унутрашња структура организована (Martin et al., 2006). Иако су усавршене методе електронске микроскопије, и данас је тешко проучавати својства индивидуалних казеинских мицела (Bauland et al., 2022).

Током изучавања, смењивали су се одређени модели који се односе на мицелу крављег млека. Најчешћа подела модела је на субмицеларни модел и модел глобуларног протеинског матрикса (Shukla et al., 2009). Према субмицеларном моделу, мицела је састављена од субмицела које међусобно повезује CCP. Ове тврдње се заснивају на

чињеници да казеини сами између себе реагују и граде мицеле, чак и у одсуству калцијума. Колоидни калцијум фосфат затим као лепак повезује протеинске субмицеле (de Kruif et al., 2012). Субмицеле су састављене од казеина, а κ -казеин се налази на њиховој површини, одакле својим С-терминусом стабилизује систем и личи на трепље (Pešić, 2011; Walstra, 1999). Овакав модел сматра се застарелим (de Kruif et al., 2012; Horne, 2006; McMahon & McManus, 1998; Pešić, 2011), а постојање субструктура се приписује ограничењима начина припремања узорка (Holt et al., 2013). Према моделу Holt et al. (2003) који се ослањао на трансмисионе електронске микрографе (McMahon & McManus, 1998), интеракције унутар казеинске мицеле су постојале само између казеина и ССР, док хидрофобне интеракције нису узете у обзир, што се сматрало највећом маном овог модела (Horne, 2006). Касније је ова верзија побољшана са објашњењем да се ССР налази у виду нанокластера, окружен је фосфопротеинима; α -казеини се везују са два, а β -казеин са једним фосфосеринским доменом за ССР, док је κ -казеин на периферији мицеле (de Kruif et al., 2012; Pešić, 2011). Неки аутори наводе и модел дуалног везивања као засебан модел. Заправо су модели дуалног везивања и нанокластера врло слични, разликују се у типу интеракција и на крају су еволуирали у један (Horne, 2020). Модел дуалног везивања објашњава интеракције као равнотежу између одбојних електростатичких сила и хидрофобних интеракција (McMahon & Oommen, 2013). Казеини се везују и са другим казеинима својим хидрофобним регионима, затим електростатичким интеракцијама, а ту су и јони калцијума који се такође могу везивати за казеине (Pešić, 2011). Генерално гледано, разноврсност казеина утиче на разноврсност слабих интеракција, мноштво интеракција утиче на стабилност мицеле, а површину стабилизује κ -казеин који прави дифузну кору око језгра мицеле (слика 2.3.) (de Kruif et al., 2012; Shukla et al., 2009). ССР који се налази у унутрашњости мицеле је елипсоидног облика и уроњен је у протеински матрикс (Pešić, 2011; Shukla et al., 2009). Аутори наводе и да је означавање казеина као хидрофобних молекула такође спорно, и да су хидрофилнији од већине глобуларних протеина (Holt et al., 2013).



Слика 2.3. А: Шематски приказ модела казеинске мицеле (de Kruif et al., 2012); Б: Електронски микрограф казеинске мицеле, црта=200nm (Dalgleish et al., 2004).

Структура казеинских мицела других врста млека је предмет интересовања далеко мањег броја радова у односу на кравље млеко. Мицеле козјег млека у односу на кравље имају већи дијаметар, више су минерализоване, мање су хидратисане, мање су термостабилне и имају „лабавију“ структуру због већег присуства β -казеина (Park et al., 2007). Садржај растворљивог казеина је већи код козјег у односу на кравље млеко, па се на нижим температурама нарушава мицеларни систем, што утиче на технолошка

својства козјег млека и његову тежу прераду (Park et al., 2007). Величина казеинске мицеле је у негативној корелацији са садржајем α_1 -CN, а у корелацији је и са другим казеинима (Pešić, 2011). Мора се узети у обзир и то да микросредина, тј. рН вредност, присуство соли, сурфактаната, концентрација казеина, температура и јонска јачина утичу на својства казеинских мицела, отежавају њено проучавање и објашњавају велике варијације у научним истраживањима (Liu & Guo, 2008).

2.3.2.3. Серум протеини

За разлику од казеина, серум протеини (*Whey Proteins - WP*) се одликују компактном глобуларном структуром, не садрже фосфор, већ садрже аминокиселине које имају сумпор у свом саставу, углавном метионин и цистеин, које су такође важне за развој новорођенчета (Fathi et al., 2018; Selvaggi et al., 2014). Сматрају се нутритивно повољнијима у односу на казеине због аминокиселинског састава, дигестије и апсорпције, а нашли су и широку примену у индустрији хране где се користе за побољшање многих функционалних својстава, као нпр. емулгујућих и пенивих својстава (Selvaggi et al., 2014). Хидролизати серум протеина могу се сматрати хипогликемијским суплементом (Du et al., 2022b).

α -лакталбумин (α -LA) је калцијум металопротеин који има значајну улогу у синтези лактозе као део ензима лактоза синтазе, затим у секрецији млека, а богат је есенцијалним аминокиселинама као што су лизин и триптофан, као и цистеином (Park, 2017; Selvaggi et al., 2014). Козји α -LA, као и овчји, нема метионин у свом саставу и по томе се разликује од осталих млека (Park, 2017). Термостабилнији је β -LG (Pesic et al., 2012).

β -лактоглобулин (β -LG) је глобуларни протеин који представља главни серум протеин козјег и овчијег млека, док је потпуно одсутан у хуманом млеку (Selvaggi et al., 2014). Осим обезбеђивања аминокиселина, његова физиолошка функција није у потпуности разјашњена, мада постоје тврдње да служи за транспорт одређених супстанци (Selvaggi et al., 2014). Козји и крављи β -LG се разликују по структури (Park, 2017; Prosser, 2021). Након дигестије козјег млека, заостаје само $\sim 23\%$ β -LG, док код крављег млека заостаје чак 83% (Almaas et al., 2006).

У серум протеине се убрајају и мање заступљени протеини као што су серум албумин крви (BSA), имуноглобулини, лактоферин, протеозопептонске фракције и други; иако су заступљени у малим концентрацијама, могу значајно утицати на метаболичке, имунолошке и физиолошке процесе (Pešić, 2011; Selvaggi et al., 2014). Сурутка, која заостаје углавном након производње сирева, искоришћава се за прављење концентрата и изолата серум протеина, који поседују добра техно-функционална и корисна биолошка својства (Pesic et al., 2011a). Мања заступљеност у млеку не значи да је биолошка улога ових једињења мања; нпр. лактоферин је у центру многих студија као антиканцерогени, антиоксидативни и антимикробни агенс (Iglesias-Figueroa et al., 2019).

2.3.3. Термички третман козјег млека

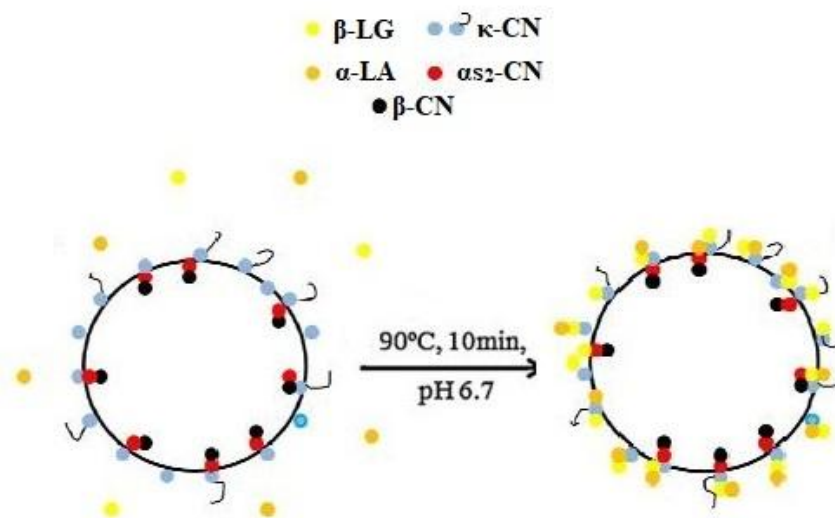
Информације о утицају термичког третмана су дуго биле проучаване у мањем обиму код козјег у односу на кравље млеко. Промене у функционалним својствима протеина млека током прераде су заправо макроскопски ефекти структурних својстава, па је упознавање са променама током термичких третмана од виталног значаја (X. Y. Li et al., 2020). Још 1998. године је примећено да се дијаметар казеинске мицеле козјег млека повећава током термичког третмана (Raynal & Remeuf, 1998). Morgan et al.

(2000) закључују да између растворљивих протеина и казеина термички третираног козјег млека вероватно постоје интеракције које су другачије од оних у крављем млеку. На температурама око 70°C, серум протеини крављег млека се денатуришу (α -LA се одмотавају на 66°C, а β -LG на 75°C), дисулфидне везе и тиолне групе постају доступне за интеракцију са другим протеинима на рН 6,5; на рН 6,7 ово се дешава са само 30% серум протеина (Anema et al., 2004; X. Zhao et al., 2020). Током загревања, долази до агрегације серум протеина, интеракција β -LG, односно серум протеина и κ -казеина помоћу дисулфидних веза, а затим и формирање WP-CN комплекса (McMahon & Oommen, 2013; Raynal-Ljutovac et al., 2007; X. Zhao et al., 2020). Казеини су толерантнији на повећање температуре зато што немају терцијарну структуру, али се током загревања дешавају различите модификације, као нпр. деамидација остатака аспарагина и глутамин, протеолиза, умрежавање аминокиселина и полимеризација, раскидање дисулфидних мостова и размена слободних тиола са остатака цистеина (Broyard & Gaucheron, 2015). Растворљивост минералне фракције казеина је мања, може доћи до интеракције преципитата са казеинским мицелама, промене њихове површине, ковалентног везивања серум протеина са казеинима и њихове агрегације, као и трансформације и интеракције лактозе са осталим компонентама (Broyard & Gaucheron, 2015).

На формирање и дистрибуцију комплекса насталих након загревања млека рН вредност утиче мање на козје него на кравље млеко (Pešić et al., 2014). Са повећањем рН вредности, проценат κ -казеина који учествује у грађењу комплекса се смањује (са приближно 70 на 65%), док су α ₂-CN и β -CN присутни са нижим процентом на рН 6,5 (приближно 10% и 15%, респективно), а затим су присутни у вишим и релативно константним процентима без обзира на повећање рН вредности (Pešić et al., 2014). На денатурацију серум протеина козјег млека такође мање утиче рН вредност у односу на кравље млеко и ови протеини су термолабилнији у односу на кравље аналоге (Pešić et al., 2014). Присуство агрегата, високомолекулских комплекса, примећује се код оба млека, међутим, код козјег млека скоро три пута више κ -казеина улази у састав термоиндукованих комплекса (Pestic et al., 2012). Око 30% укупних серум протеина крављег млека се налази у растворљивим комплексима, тј. није везано за казеинску мицелу, док код козјег млека растворљивих комплекса готово да уопште нема (<5%) и сви комплекси се налазе везани за казеинску мицелу (Pestic et al., 2012).

Код крављег млека, на природној рН вредности WP- κ -CN комплекси се делимично налазе на површини казеинских мицела, а делимично као растворљиви комплекси у серум фази млека (Pešić et al., 2016; Pestic et al., 2012). Након термичког третмана, код крављег млека се на електрофореграмима примећује слаб интензитет трака α -LA, β -LG и полимерних форми κ -казеина, као и одсуство минорних серум протеина, док термички третман не утиче на α - и β -CN (Pestic et al., 2012). Код термички третираног козјег млека примећује се знатно другачији протеински профил – поред слабог интензитета трака серум протеина и полимерних форми κ -казеина, уочава се и пад интензитета трака α ₂- и β -CN, што имплицира да код козјег млека и они улазе у састав комплекса насталих дејством високе температуре; β -CN помоћу хидрофобних интеракција, а α ₂-CN помоћу хидрофобних интеракција и ковалентних веза (Pešić et al., 2014; Pestic et al., 2012). Објашњење можда лежи у различитој структури казеинских мицела ова два млека, тј. вероватно се код козјег млека α ₂- и β -CN делимично налазе на површини, док су код крављег млека у дубини казеинске мицеле, па не могу да ступају у интеракције са денатурираним β -LG (Pestic et al., 2012). Дакле, настали комплекси се не разликују само у дистрибуцији између казеинске мицеле и серум фазе, већ и у саставу и распореду на површини казеинске мицеле, па се могу сматрати WP-

CN комплексима (Pesic et al., 2012). Због интеракције већине казеина са денатурираним серум протеинима, ови комплекси су вероватно униформно распоређени на површини казеинске мицеле, а разноврсност доступних казеина омогућује различите интеракције, па нема комплекса у серум фази (слика 2.4.) (Pesic et al., 2012).



Слика 2.4. Утицај термичког третмана (90°C , 10 min) на казеинску мицелу козјег млека на природној рН вредности млека (Pešić, 2011)

Козје млеко је осетљивије на УHT третман (*Ultra-High Temperature Processing*) од крављег, а фактори од којих ово зависи су рН вредност, хидратација мицеле, генетски полиморфизам $\alpha_1\text{-CN}$, садржај непротеинског азота, присуство соли и јонског калцијума (Morgan et al., 2000). Утврђено је да је са физичког, хемијског и микробиолошког становишта за козје млеко најбољи HTST третман (*High Temperature Short Time*) између $72^{\circ}\text{C}/25\text{s}$ и $75^{\circ}\text{C}/25\text{s}$ (Prasanth & Wimalasiri, 2019). Моделовањем режима загревања млека могу се добити жељена техно-функционална својства (X. Zhao et al., 2020). Такође се мењањем рН вредности као једног од најзначајнијих фактора током загревања могу циљати одређена техно-функционална својства, па су нпр. алкални услови пожељни за добру стабилност емулзија и капацитет везивања уља, док се киселе рН вредности препоручују за боља пенива својства и капацитет везивања воде након загревања млека (X. Y. Li et al., 2020). Један од начина да се побољша термостабилност козјег млека је додатак соли које стабилизују колоидни систем млека (L. Zhao et al., 2020).

Термички третмани остају незаменљиви, иако се развијају нове технологије, као што су ултразвучни третмани, коришћење високог притиска, микроталаса, пулсирајуће светлости, гама зрачење, третман пулсирајућим електричним пољима, екстракција суперкритичним флуидом, јер нове технологије имају своје предности и мане због промена у протеинској структури, биолошких и техно-функционалних својстава, а као највећа мана им се наводе високи трошкови коришћења и недовољно познавање резултата њихове примене (Nunes & Tavares, 2019).

2.3.4. Техно-функционална својства козјег млека

Пенива и емулгујућа својства убрајају се у техно-функционална својства. Ова својства су битна током производње широке палете прехранбених производа који се могу сврстати у дисперзије; емулзије су нпр. мајонез, преливи за салате, кремове, ликери, формуле за одојчад, итд., док је формирање и стабилност пене кључно код великог броја производа, као што су сладоледи, глазуре, шлаг, бомбоне, пенасти колачи, итд. (Milinčić, 2023). Површински активне супстанце као што су млечни протеини стабилизују дисперзије, а према коначном изгледу потрошачи бирају производе, па су ова својства битна и са економског аспекта (Barać et al., 2011; Pešić, 2011).

Пене које су засноване на протеинима представљају двофазни систем који се састоји од сферичних мехурова испуњених ваздухом који су обмотани танким протеинским филмом, а простор између мехурова је најчешће испуњен водом и назива се ламела (Barać et al., 2011; Pešić, 2011). Процеси формирања и дестабилизације пене су комплексни и добро су проучени у литератури (Huppertz, 2010; Martínez-Padilla et al., 2014). Пенива својства млека су зависна од више фактора; зависе од врсте и концентрације протеина, тј. серум протеини имају боља пенива својства јер формирају дебље, кондензоване, високозније, гушће паковане филмове, док казеини брзо формирају пене, али су нестабилније. Осим овога, и спољашњи услови као што су рН вредност, јонска јачина и присуство других компонената утичу на својства пене (Pešić, 2011). Термички третман козјег млека утиче на побољшање пенивих својстава (формирања и стабилности пене) у односу на термички нетретирано због повећања површинске хидрофобности (Pešić, 2011). Утврђивање пенивих својстава свих млечних протеина заједно даје ширу слику, али је компликовано, поготово ако се прати и утицај фактора као што су рН вредност и утицај термичког третмана (X. Y. Li et al., 2020). Овакве анализе су још сложеније ако се додају интеракције протеина млека са сложеним биомолекулима као што су протеини или полисахариди пореклом из гљива. Према доступним подацима, пенива својства мешавина козјег млека са екстрактима гљива до сада нису проучавана.

Улога емулгатора у емулзијама типа уље/вода је да се, након разбијања уљане фазе применом механичке енергије на мале капљице, адсорбују на међуфазну површину, смање површински напон и спрече поновно удруживање мањих капљица у веће (Pešić, 2011). Ефикасност емулгатора зависи од структуре адсорбованих протеинских слојева на површини уљаних капљица, док структура зависи од температуре, рН вредности, концентрација протеина и електролита, типа уљане фазе, присуства других супстанци, итд. (Dalglish, 2006; Pešić, 2011). Прикладност протеина као емулгатора зависи од брзине којом протеини дифундују до међуфазне површине и од стабилности конформације под међуфазним притиском. Идеални емулгатор протеинске структуре би требало да има мању молекулску масу, балансиран однос наелектрисаних, поларних и неполарних аминокиселина, добру растворљивост у води, добру површинску хидрофобност и релативно стабилну структуру (Barać et al., 2015). Одређивање емулгујућих својстава се најчешће врши помоћу параметара као што су индекс стабилности (ESI) и индекс активности емулзије (EAI). Протеини млека могу служити као емулгатори, тј. обезбедити да не долази до дестабилизације емулзија, и за ту сврху су се боље показали казеини у односу на серум протеине, јер немају организовану терцијарну структуру, па су флексибилнији (Pešić, 2011). Најподобнији емулгатор је β -казеин који има хидрофилни и хидрофобни део, као и највећу површинску активност (Pešić, 2011). Најчешћи емулгатор у прехранбеној индустрији је Na-казеинат, док је улога мицеларних казеина делимично скрајнута, иако постоје индикације да су при

неутралним рН вредностима стабилнији у односу на немицеларне комерцијалне производе (Pešić, 2011). У литератури се може наћи да протеини козјег млека имају боље ESI и лошије EAI вредности у односу на кравље и овчије млеко, без обзира на термички третман, као и да термички третман козјег млека утиче на повећање ESI и смањење EAI вредности у поређењу са термички нетретираним млеком, што је директна последица промена на површини казеинске мицеле (Milinčić, 2023; Pešić, 2011).

2.3.5. Функционална својства и примена козјег млека и козјих млечних производа

Око 40% тржишта функционалне хране чине функционални производи на бази крављег млека (Naagar & Kanawjia, 2019), па не чуди да је порасло и интересовање за козје млеко и производе на бази козјег млека. Производња крављег млека бележи далеко мањи раст у односу на млека која нису пореклом кравља (Ranadheera et al., 2018). Предвиђа се да ће се производња козјег млека увећати за 53% до 2030. године, што представља одличну базу за развој функционалних производа, узимајући у обзир његов састав и широк спектар корисних ефеката на здравље (Khan et al., 2019; Naagar & Kanawjia, 2019). Због својих јединствених својстава, протеини козјег млека су нашли примену у многим сферама прехранбене индустрије (ALKaisy et al., 2023):

- због способности да формирају стабилне емулзије, протеини козјег млека се користе као емулгатори у преливима за салате, мајонезу, кремове;
- због својства гелирања користе се у производњи сирева, јогурта, пудинга;
- због способности везивања воде користе се у производима на бази меса, али и веганским и вегетаријанским производима за побољшање текстуре и ретенције воде;
- користе се као извор протеина у дијететским суплементима за спортисте;
- могу се користити као извор протеина у формулама за одојчад;
- могу се користити као функционални састојак биљних млека и сирева;
- могу се користити за производњу биоразградивих јестивих филмова и паковања.

Готово да нема састојка козјег млека за који није доказана нека од благотворних функција на људско здравље. Ензимском хидролизом млека, било током варења у гастроинтестиналном тракту, било током прераде хране, настају фрагменти са разноврсним здравственим бенефитима, као што су АКЕ-инхибиторско дејство (*Angiotensin Converting Enzyme*) за које се сматра да позитивно утичу на лечење хипертензије, затим пептиди са антимицробним, анти тромботским, антиоксидативним, антидијабетским, антиинфламаторним и имуномодулаторским ефектом, корисним дејством код кардиоваскуларних обољења, остеопорозе и превенције канцера (Ahmed et al., 2015; Azhar & Salim, 2017; Dhasmana et al., 2022; Guha et al., 2021; Hammam et al., 2021; Naagar & Kanawjia, 2019; Park et al., 2007; 2017; Prosser, 2021; Sepe & Argüello, 2019; Sonu & Basavaprabhu, 2020). Казеини козјег млека се такође ефикасније варе у односу на казеине крављег млека (Hodgkinson et al., 2018). Осим казеина, ензимском хидролизом серум протеина се такође ослобађају биоактивни пептиди, па би то могло бити једно од искоришћења нуспроизвода из индустрије сирева (Ahmed et al., 2015). Један од најпознатијих биоактивних пептида је казеинмакропептид који се добија ензимском хидролизом к-казеина током првог корака производње сира (de Kruif, 2003). Откривени су нови пептиди из казеинске фракције козјег млека који утичу на ублажавање инсулинске резистенције (Gong et al., 2020). Серум протеини имају бактериостатска, антиоксидативна и цитотоксична својства према одређеним туморским ћелијским линијама (Medeiros et al., 2018), док се

предтретман изолата протеина сурутке високим хидростатичким притиском препоручује за повећање њихових антиоксидативних и антиинфламаторних својстава (Iskandar et al., 2015). Развој нових осетљивијих инструменталних метода, као и примена информатике у биологији доводе до сталног открића нових биоактивних пептида пореклом из козјег млека (Coscueta et al., 2022). Највећи део пептида изолованих из млека након дигестије потиче од β -казеина (Prosser, 2021). Развијају се биоинформатичке методе које од секвенци хидролизованог казеина козјег млека могу идентификовати и предвидети оне који су потенцијално биоактивни (Coscueta et al., 2022). Пептиди побољшавају интестиналну баријеру на више начина, а тиме и гастроинтестинални тракт и здравље у целости (Wan et al., 2019), док пептиди ферментисаног козјег млека утичу на снижење хиперхолестеролемије (Mahdi et al., 2018). У литератури се могу пронаћи студије које покушавају да додатно повећају садржај пептида у млеку и тиме побољшају његову функционалност. То се може постићи додатком протеаза пореклом из плесни (*Aspergillus sp.*) култивисаних ферментацијом у чврстом стању (*Solid-State Fermentation - SSF*) (Zanutto-Elgui et al., 2019) или ферментацијом млека, где се протеолитичком активношћу бактерија млечне киселине повећава садржај биоактивних пептида (Moreno-Montoro et al., 2018).

Упоредна *in vivo* метагеномска анализа показала је да се интестинални микробиом мишева значајније променио након узимања козјег у односу на кравље млеко (Z. Wang et al., 2018). Нађено је да су Кребсов циклус, гликолиза, метаболизми аминокиселина, нуклеотидних киселина и липоинске киселине били активнији након исхране козјим млеку, као и да компоненте козјег млека утичу позитивно на развој одређених корисних микроба (род *Akkermansia*) на које исхрана крављим млеку уопште не утиче (Z. Wang et al., 2018). Осим ових благотворних ефеката, додатна функционалност козјег млека и његових производа се може додатно повећати додатком пробиотских бактерија или пребиотских супстанци, где компоненте козјег млека служе као носачи (Verruck et al., 2019). У односу на овчије, камиље и магареће млеко као алтернативе крављем млеку, козје млеко се показало као најбољи носач пробиотика, узимајући у обзир неповољне услове током проласка кроз гастроинтестинални тракт, адхезију за епител црева и вијабилност током рока трајања производа као што су јогурт, ферментисано млеко, сладолед и сиреви (Ranadheera et al., 2018). Једини проблем који се још мора превазићи у односу на ове алтернативе јесу непривлачна сензорна својства (Ranadheera et al., 2018). Још једна студија је издвојила козје млеко као најсварљивије након *in vitro* дигестија крављег, козјег, овчијег и камиљег млека (Tagliacruzchi et al., 2018).

Порасло је и интересовање за једињењима пореклом из млека која нису довољно проучена. Моделовањем гајења коза и прераде козјег млека (начин исхране, доба године, пастеризација) може се додатно повећати садржај фенолних једињења у козјем млеку и самим тим антиоксидативност (Chávez-Servín et al., 2018). Лактоферин је препознат као нутријент који има широк спектар позитивних дејстава – делује као имуномодулатор, антимикробни, антиоксидативни и антиканцерогени агенс и има улогу у регулацији метаболичких поремећаја, па га аутори препоручују као додаток храни за децу (Iglesias-Figueroa et al., 2019). Ипак треба бити пажљив, пошто је потребна фортификација козјег млека различитим витаминима и масним киселинама, као и смањење нивоа β -лактоглобулина (Chauhan et al., 2021; Prosser, 2021).

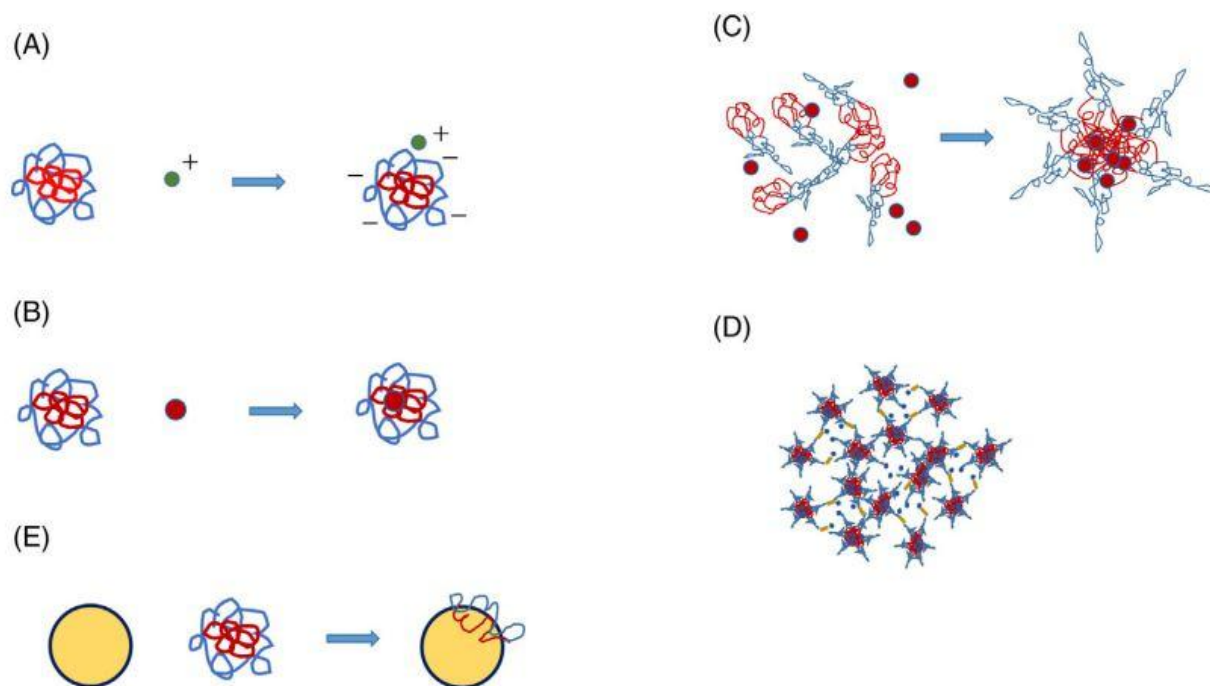
2.3.6. Конституенти крављег млека као носачи супстанци од интереса

Млеко је идеална платформа за испоруку биоактивних компонената како би се добила нова генерација млечних производа са додатном функционалношћу (Haratifar &

Corredig, 2014), а нативне казеинске мицеле се могу посматрати као природне нано-капсуле за пренос биоактивних супстанци (Menéndez-Aguirre et al., 2011). Могу се користити за обогаћивање и фортификацију у индустрији хране и лекова (Ghasemi & Abbasi, 2014). Казеини су се прво користили у фармацеутске сврхе, а онда су нашли примену и у храни (Haratifar & Guri, 2017). Кроз литературу су описани на више начина, на пример као колоидни казеин-калцијум-транспорт комплекси (Farrell et al., 2006), вектори нутријената (Ouanazar et al., 2012), или природне наночестице присутне милионима година (Moeller et al., 2017). Инкорпорирање осетљивих састојака (као што су антиоксиданти, витамини, масне киселине и пробиотици), најчешће хидрофобних, у нано- или микроструктуре им обезбеђује стабилност и биодоступност независно од спољашњих деградационих фактора (Haratifar & Guri, 2017). Улога и примери примене казеина крављег млека у ове сврхе су добро описани (Haratifar & Guri, 2017; Ranadheera et al., 2016). Осим инкапсулације, коришћени су и за стабилизацију емулзија и комплекса, за развој хидрогелова и јестивих филмова и превлака (Ranadheera et al., 2016). Осим својих структурних предности, казеини су релативно јефтини и доступни и имају GRAS статус (*Generally Recognized As Safe*), тј. сматрају се безбеднима за употребу, што је чест проблем код других материјала за наноинкапсулацију, па се овде токсичност односи само на дозу инкапсулисане биоактивне супстанце (Haratifar & Guri, 2017). Ипак, за наночестице пермеабилност биолошких мембрана је далеко већа у односу на веће супстанце, па се строго морају испитати њихови могући недостаци (Haratifar & Guri, 2017; Milinčić et al., 2019).

Казеини су због своје флексибилне структуре термостабилни, па се могу користити тамо где је потребно овакво својство, али се не могу користити у храни где је рН вредност близу њихове изоелектричне тачке јер долази до агрегације (Fathi et al., 2018; Yildirim-Elikoglu, 2019). Осим отпорности на загревање, казеини су отпорни и на смрзавање и сушење, што обезбеђује додатне бенефите за испоруку биоактивних супстанци (Ranadheera et al., 2016). Казеини имају велики афинитет ка јонима и малим молекулима, имају добра површинска и стабилизујућа својства, својства само-окупљања, помажу у емулзификацији, гелирању, везивању воде (слика 2.5.) (Ranadheera et al., 2016). β -казеини су означени као најобећавајући од свих казеина, јер се због своје амфифилне структуре могу користити за везивање и хидрофобних и хидрофилних супстанци (Fathi et al., 2018). Од серум протеина, β -LG има велики потенцијал за инкапсулацију биоактивних компоненти, било у нативном, било као термички третиран, α -LA може формирати наноцеви, а и BSA се може користити у сврхе инкапсулације (Fathi et al., 2018; Tavakoli et al., 2021). Лактоферин је коришћен за инкапсулацију, али у фармацеутске сврхе (Tavakoli et al., 2021). Због своје амфифилне структуре и способности самосталног груписања у мицеларне структуре, β -казеини су искоришћени за инкапсулацију активних компонената у индустрији лекова и хране уместо синтетичких полимера (Perinelli et al., 2019). Због своје хидрофобности, често формирају јаче комплексе у односу на α -CN, па се препоручују као носачи (Chanphai et al., 2018; Hasni et al., 2011).

Највише су испитиване интеракције фенолних једињења са протеинима крављег млека и установљено је да казеини имају афинитет ка високо полимеризованим полифенолима, док серум протеини везују и транспортују мање молекуле (Ye et al., 2013). Често се испитују интеракције епигалокатехин галата (EGCG) са протеинима млека, јер се зна да танини ступају у интеракције са протеинима богатим пролином, као што је казеин, па се користе за побољшање функционалних својстава млека и млечних напитака (Shukla et al., 2009).



Слика 2.5. Примери техника инкапсулације помоћу казеина; (A) везивање јона; (B) хидрофобно везивање; (C) спонтано окупљање (енгл. *self-assembly*); (D) реорганизација (нпр. додатком соли; енгл. *reassembly*); (E) површинска активност (Haratifar & Guri, 2017).

Осим интеракција са казеином, катехини реагују и са серум протеинима (α -LA, β -LG, BSA) (Haratifar & Corredig, 2014). Приликом испитивања интеракција мора се водити рачуна и о томе да ли ће се млеко користити даље за формулисање млечних напитака, јер нпр. интеракције EGCG са κ -казеином онемогућавају химозину да делује и тиме утиче на даља својства млечних производа (Haratifar & Corredig, 2014). Осим интеракција, тродимензионална структура протеина се мења, што такође утиче на њихову функцију (Hasni et al., 2011; Jia et al., 2017). Инкорпорирање фенолних једињења је интересантно због њихових корисних здравствених улога, као и због повећања њихове биодоступности када се конзумирају са храном у односу на суплементе (Yildirim-Elikoglu, 2019). Интеракције фенолних једињења и протеина млека могу бити иреверзибилне, ако се повезују ковалентно, што је ређи случај, и реверзибилне – ако се повезују хидрофобним, водоничним везама или Ван дер Валсовим интеракцијама, чешће помињаним у литератури (Yildirim-Elikoglu, 2019). Од јачине интеракција зависе каснија својства млека и производа на бази млека, као нпр. растворљивост, текстура, дигестибилност, техно-функционална својства, па се не може генерализовати који тип интеракција је пожељнији, већ се мора узети у обзир крајња намера коришћења производа. Приликом испитивања интеракција између протеина млека и супстанци од интереса, морају се узети у обзир (Yildirim-Elikoglu, 2019):

- структурна својства протеина млека као што су конформација и аминокиселински састав;
- молекулска маса и степен хидроксилације, метилације и гликозилације супстанци од интереса;
- фактори средине као што су температура, рН вредност, јонска јачина;
- интеракције (посебно компетитивне) са другим конституентима хране у комплексним матрицама.

Испитиване су различите технике за побољшање ефикасности инкапсулације и везивања супстанци од интереса. Аутори тврде да се применом високог хидростатичког притиска на повишеним температурама унутар мицела могу „заробити“ супстанце од интереса, а да мицеле задржавају своја физичка својства након престанка дејства високог притиска (Menéndez-Aguirre et al., 2011; 2014). Ghasemi & Abbasi (2014) су инкапсулисали различита уља ултразвучним третманом уз повишену рН вредност како би дошли до хидрофобних региона који се налазе у дубини казеинске мицеле. Постоје и мишљења да се оваквим третманима добијају знатно измењене казеинске мицеле, као и да је примена високог хидростатичког притиска, ултразвука и сличних технологија превише скупа да би била оправдана (Moeller et al., 2017). Постоји једноставније решење, а то је отварање структуре мицеле моделовањем рН вредности и температуре, чиме се постиже већа реверзибилност процеса, уз претходну оптимизацију експерименталних услова (Moeller et al., 2017). Могућа је и модификација протеинске структуре променама рН вредности (*pH-shifting*), где се раствор протеина подвргава високо киселим/алкалним третманима који доводе до отварања структуре, а затим се преласком на неутралну рН вредност протеини затварају, чиме се побољшавају растворљивост, површинска хидрофобност, као и могућности инкапсулације (Du et al., 2022a). У табели 2.2. су побројани литературни подаци коришћења протеина крављег млека као носача супстанци од интереса. У публикованој литератури нису пронађени радови са сличном тематиком где су носачи протеини козјег млека. Због својих карактеристичних предности би потенцијално могли да обављају многе од функција побројаних у овом поглављу. Могуће предности су: већи дијаметар казеинске мицеле, порознија унутрашњост мицеле, разноврсност казеина на површини мицеле, ниска алергена својства, ефикасније варење и присуство биоактивних пептида (Park et al., 2007; Popović Minić et al., 2023). Из ових разлога је потребно проучити протеине козјег млека у оваквој улози, чиме би се употпунила празнина у научној литератури.

Табела 2.2. Инкапсулација/комплексација/пренос супстанци од интереса помоћу протеина млека

Активна супстанца	Протени/и млека	Разлог додавања / појашњење	Референца
Ресвератрол	На-казеинат	Испитивање интеракција	Acharya et al. (2013)
Полифеноли чаја (С, ЕС, ЕСГ, ЕГСГ)	β -LG, α_1 -CN, β -CN	Ефикасност инкапсулације; биодоступност; поређење носача	Chanphai et al. (2018)
Фосфо- и сфинголипиди	Казеинске мицеле	Испитивање интеракција и могућности инкапсулације	Cheema et al. (2015)
Куркумин	Казеинске наночестице направљене из пептидних агрегата	Могућност инкапсулације променама рН вредности; испитивање стабилности, дигестија, ...	Du et al. (2022a)
Рузмаринска киселина	Серум протеини (α -LA, β -LG, лактоферин)	Испитивање интеракција и стабилности	Ferraro et al. (2015)
Полифеноли какаоа (С, ЕС)	β -LG	Испитивање интеракција	Gallo et al. (2013)
Уља (сојино уље, риблије уље, уље уљане репице)	Казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације применом ултразвука	Ghasemi & Abbasi (2014)
Кверцетин и куркумин	Реорганизоване казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације; растворљивост,	Ghayour et al. (2019)

	из Na-казеината и казеинске наночестице	стабилност и биоактивност фенолних једињења	
Витамин Д ₃	Казеинске мицеле	Инкапсулација употребом ултра-високог притиска	Haham et al. (2012)
Катехини чаја (EGCG)	Казеинске мицеле	Испитивање интеракција и утицај на технолошка својства	Haratifar & Corredig (2014)
Полифеноли чаја (С, ЕС, ЕСГ, EGCG)	α -CN, β -CN	Испитивање интеракција	Hasni et al. (2011)
Хлорогена киселина, ферулинска киселина, EGCG	β -LG	Испитивање интеракција	Jia et al. (2017)
Витамин Д ₂	Казеинске мицеле	Инкапсулација употребом високог притиска	Menéndez-Aguirre et al. (2011)
Витамин Д ₂	Казеинске мицеле	Инкапсулација употребом високог притиска уз промену температуре	Menéndez-Aguirre et al. (2014)
β -каротен	Казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације и оптимизација процеса	Moeller et al. (2017)
Куркумин	Казеинске мицеле (Na-казеинат)	Испитивање могућности инкапсулације	Pan et al. (2013)
Куркумин	Казеинске мицеле (Na-казеинат)	Испитивање могућности инкапсулације уз модификацију рН вредности	Pan et al. (2014)
Фенолна једињења кафе и чаја (кофеинска киселина, EGCG)	Серум протеини	Испитивање интеракција и алергених својстава	Pessato et al. (2018)
β -каротен	Казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације и протективне улоге казеинских мицела	Sáiz-Abajo et al. (2013)
Витамин Д ₂	Казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације	Semo et al. (2007)
β -каротен	Серум албумин крви – BSA	Испитивање могућности комплексације	Silva et al. (2018)
EGCG	Казеини	Испитивање интеракција	Shukla et al. (2009)
Полифеноли (катехин, танинска киселина) и биљни екстракти (семенке грожђа, хибискус)	Изолат протеина сурутке и коацервати изолата протеина сурутке и пектина	Испитивање интеракција	Thongkaew et al. (2014)
Куркумин	Конјугати казеина и декстрана	Испитивање интеракција; побољшање стабилности казеинских мицела додатком декстрана	Wu & Wang (2017)
Полифеноли црног и зеленог чаја	Пуномасно млеко	Испитивање интеракција	Ye et al. (2013)
ω -3 масне киселине (докозахексаеноинска киселина)	Казеинске мицеле	Испитивање могућности инкапсулације	Zimet et al. (2011)

Скраћенице: С - катехин; ЕС - епикатехин; ЕСГ – епикатехин галат; EGCG – епигалокатехин галат.

2.4. Јестиве гљиве

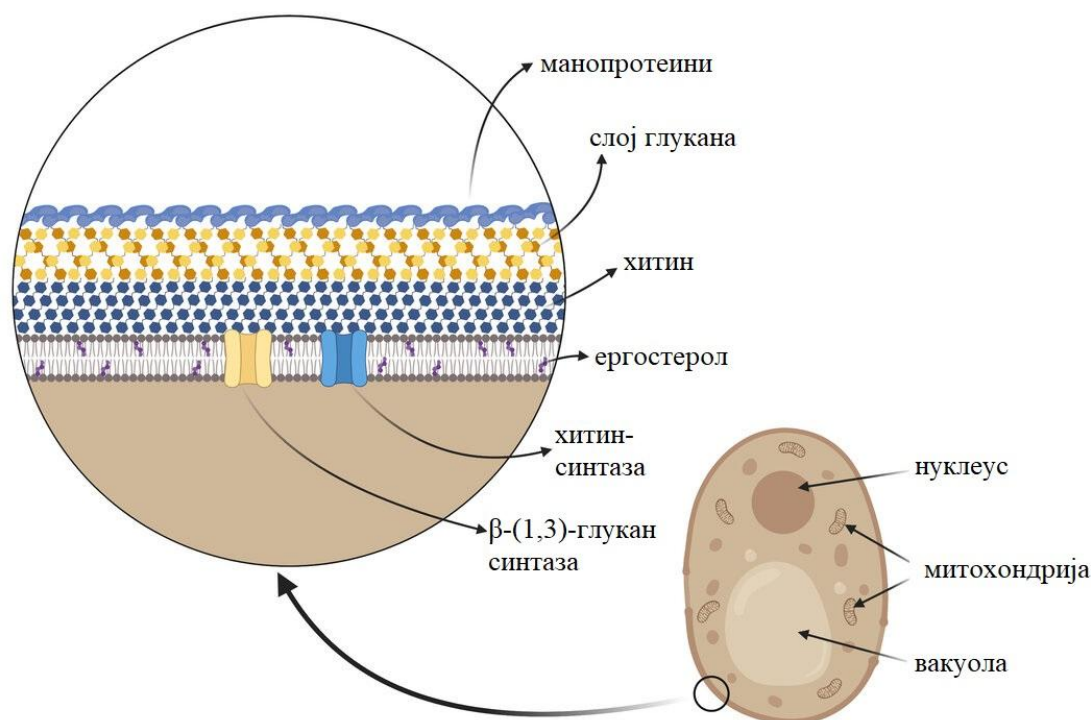
2.4.1. Хемијски састав и нутритивна својства гљива са нагласком на биолошку активност

Археолошки подаци указују на коришћење јестивих гљива пре чак 13000 година на простору данашњег Чилеа. Од давнина се користе у кинеској медицини и сматрају се функционалном храном у Јапану и другим азијским земљама (Chang & Buswell, 1996; Ghorai et al., 2011; Xu et al., 2011). До данас је откривено више од 10000 врста макрогљива од чега је само око 2000 јестиво (de Miranda, 2022). Царство гљива се због својих природних карактеристика сматра идеалном храном због следећих предности: добар садржај протеина и аминокиселински састав који може заменити месо у исхрани; ћелијски зид као извор дијетних влакана; висока концентрација витамина Б групе; низак садржај масти; одсуство холестерола (Ghorai et al., 2011). Осим овога, њихово узгајање није скупо, могу се узгајати на остацима из пољопривредне индустрије, а компост који остаје након њихове производње може се даље искористити као храна за животиње (Ghorai et al., 2011). Данас се гљиве активно истражују у целом свету због многобројних биолошки корисних својстава, као што су антиоксидативно, антитуморно, антимикумно, имуномодулаторско дејство и друга, која доприносе свом биохемијском саставу који укључује полисахариде, протеине, полисахаридно-протеинске комплексе, липиде, једињења мале молекулске масе, итд. (Song et al., 2008; Xu et al., 2011). Користе се сирова плодоносна тела, различити екстракти или изоловане супстанце, а начини на које се материјали пореклом од гљива добијају су сакупљање у природи, гајење у контролисаним условима или култивација мицелија у ферменторима са чврстим или течним супстратима (Soković et al., 2018). Процењује се да је вредност светског тржишта макрогљива у 2021. години износила око 50,4 милијарди САД долара, а да ће до 2028. године порасти на 100,1 милијарду (<https://www.zionmarketresearch.com/report/mushroom-market>).

Већина гљива садржи око 90% воде, а највећи део суве материје чине полисахариди и протеини у варирајућим концентрацијама зависно од многих услова (Močaček-Grošev et al., 2001). Честе разлике у структури или биолошкој активности потичу од различитих екстраката који се испитују, разликама у култивацији које доводе до промене у хемијском саставу и последично у биолошком одговору (Lima et al., 2011). Због своје ћелијске структуре, гљиве припадају еукариотским организмима (слика 2.6.). Ћелијски зид им се састоји од гликопротеина, глуканских влакана, периплазматичних ензима, као и хитина, који служи као механичко ојачање (Lee & Kim, 2005; Močaček-Grošev et al., 2001). Најбројнији конституенти суве материје ћелијског зида су полисахариди, затим следе протеини и у мањим количинама масти, минерали и пигменти (Močaček-Grošev et al., 2001). β -глукани су природно присутни полисахариди различите структуре, молекулске масе и растворљивости; нерастворљиви β -(1,3)(1,6) глукани чешће имају бољу биолошку улогу у односу на растворљиве β -(1,3)(1,4) глукане, а растворљивост у води варира од 42,55 – 73,35% (Biedroń et al., 2012; Lee & Kim, 2005). β -(1,3) и β -(1,6) глукани имају различите структуре и биолошке функције; β -(1,3)-глукани су углавном линеарни, састоје се од око 1500 јединица глукозе и у ћелијском зиду имају улогу „мердевина“, док су β -(1,6)-глукани краћи (око 140 јединица глукозе), формирају разгранате полимере и у ћелијском зиду служе за стабилизацију и везивање манопропротеина, а везују се ковалентно и за β -(1,3)-глукане и хитин (Gonzaga et al., 2013). Људски гастроинтестинални тракт није у могућности да хидролизује β -гликозидне везе, па се β -глукани сматрају пребиотицима (Ashraf Khan et al., 2017). Неке форме β -глукана

подстичу деловање имуног система јер личе на молекуле који представљају опасност по њега, а потичу од гљива које су опасне по здравље. Пошто безбедне јестиве гљиве садрже веће количине β -гљукана, они делују као сигнални молекули који повећавају активност имуног система, општу превенцију, као и борбу против постојећих болести (Biedron et al., 2012). Биоактивне полисахариде, укључујући и β -гљукане, препознају рецептори мембрана леукоцита и макрофага, што доводи до пролиферације и диференцијације имуних ћелија, побољшавања имуног одговора, а последично и до антитуморног и антимикубног дејства (Smiderle et al., 2013). Механизми деловања β -гљукана нису у потпуности разјашњени, као ни разлике у дејству β -(1,3)-, β -(1,4)- и β -(1,6)-гљукана.

Због комплексности структуре, мало полисахарида пореклом из гљива је окарактерисано (Mingui et al., 2019). Познато је да примарна структура, молекулска маса, разгранатост бочних ланаца и кватернарна структура утичу на њихову биоактивност, па нпр. гљукан лентинан у форми троструког хеликса инхибира раст одређених тумора, док их полисахариди у форми једноструктог хеликса не инхибирају (Smiderle et al., 2013). Већа инхибиција раста ћелија канцера се постиже коришћењем силових екстраката гљива уместо појединачних полисахарида (Bertollo et al., 2022).



Слика 2.6. Структура ћелијског зида гљива (<https://www.pathselective.com/micromeded/the-fungal-cell-wall>)

Поред полисахарида, веома важну улогу имају и биоактивни протеини и пептиди пореклом из макрогљива, као што су лектини, ензими као лаказе, рибонуклеазе, затим фунгални имуномодулаторни протеини из породице имуноглобулина, антимикубни протеини (Xu et al., 2011). Аутори наводе да је потребно вршити даља истраживања која би детаљније испитала везу између тродимензионалне структуре биоактивних протеина и њихове функције (Xu et al., 2011; Yang et al., 2009).

2.4.2. *Agaricus blazei*

Класификација:

Подраздео: Basidiomycota

Класа: Agaricomycetes

Ред: Agaricales

Фамилија: Agaricaceae

Род: *Agaricus*



Слика 2.7. Плодоносна тела *Agaricus blazei*

(<https://healing-mushrooms.net/Agaricus-Blazei>)

Agaricus blazei Murril ss. Heinemann је базидиомицета, широко распрострањена јестива гљива, која се често сматра функционалном храном, док се њени екстракти у народној медицини користе као терапија за многа обољења, укључујући и рак (Carvajal et al., 2012). У Бразилу је позната као бразилски шампињон или сунчана печурка, пошто расте на отвореном и потребна јој је сунчева светлост (слика 2.7.), што је неуобичајено за гљиве (de Miranda, 2022). Сапроб је, одговарају јој подлоге богате лигноцелулозним остацима, природна станишта су јој мешовите шуме и поља у брдским и планинским подручјима (Lisiecka et al., 2013). Њено откриће, као и сам назив, су спорни. У Бразилу је 1960-их пронашао јапански истраживач који је послао у Јапан на даља испитивања, где је постала позната под именом *Himematsutake* (Firenzuoli et al., 2008). Назив *Agaricus blazei* Murril дао јој је белгијски ботаничар Хајнеман (*Heinemann*) 1967. године, а позната је и као *Agaricus brasiliensis* (Wasser, 2002) (de Miranda, 2022; Firenzuoli et al., 2008). Понегде се спомиње и као *Agaricus subrufescens* Peck, која је идентификована око 1900. године (Zied et al., 2010; 2021). 2005. године је утврђено да је и европска врста *A. rufoteguli* заправо синоним за *A. blazei* (Kerrigan, 2005). У литератури до данас није јасно решено ово питање, па аутори сами одлучују којим називом ће се служити (de Miranda, 2022).

На тржишту медицинских гљива у Јапану је убедљиво најзаступљенија са 60,6% (Matsushita et al., 2018) и ова земља је уједно и највећи произвођач и потрошач ове гљиве (Lisiecka et al., 2013). Већ више од 30 година се гаји комерцијално, а моделовањем различитих услова приликом узгајања може се скратити време узгајања, повећати принос, садржај одређених конституената као што су β -гљукани, органске и фенолне киселине, као и антиоксидативна активност (Almeida et al., 2022; Dias et al., 2014; Lisiecka et al., 2013; J. T. Wang et al., 2013; Zied et al., 2010; 2014), мада садржај биоактивних материја може знатно варирати од једне до друге године уз контролисање свих осталих услова узгајања (Geösel et al., 2011). Предност се даје гајењу на отвореном у односу на култивацију у затвореном због веће концентрације биоактивних метаболита, мада се ово не може узети као правило за све сојеве (de Oliveira Gorgulho Silva et al., 2022; Yamanaka et al., 2014). Мицелија се може гајити субмерзно

(*Submerged Fermentation*) и ферментацијом у чврстом стању (SSF) на остацима из прехранбене индустрије и може послужити за формулацију функционалне хране јер представља извор антиоксиданаса и есенцијалних масних киселина (Mokochinski et al., 2015). У фокусу оваквих истраживања су егзополисахариди, оптимизација њихове продукције и биолошка улога (Fan et al., 2007; Ker et al., 2005; Lin & Yang, 2006; Liu & Wang, 2007; Peter-Valence et al., 2011).

A. blazei има добру нутритивну вредност јер је богат протеинима, влакнима, минералима, док има низак садржај масти (Largeteau et al., 2011). Има око 11% влаге и 89% суве материје (Tsai et al., 2008). Литературни подаци показују да има висок садржај протеина у односу на остале гљиве (27-48%), затим следе угљени хидрати (18-45,5%), сирова влакна (6-14%) и масти (1-5%) (Györfi et al., 2010; Largeteau et al., 2011; Tsai et al., 2008). Ова гљива садржи и високе концентрације калијума, фосфора, калцијума, магнезијума, бакра и цинка, док се за одређене сојење мора обратити пажња на акумулацију кадмијума (Györfi et al., 2010; Largeteau et al., 2011). Као и друге гљиве, богата је витаминима Б и Д, а избором компоста може се утицати на већи принос витамина Б₁, Б₃, Б₉, Б₁₂ и Ц (Rózsa et al., 2019).

2.4.2.1. Полисахариди *A. blazei*

Полисахариди су у литератури означени као главни носиоци антитуморне активности, па не чуди што је највећи број радова усмерен ка њиховој карактеризацији и испитивању биолошких активности (H. Wang et al., 2013). Варирања у моносахаридном саставу су честа, па су тако главни слободни шећери према Carneiro et al. (2013) манитол и трехалоза, а фруктозе има у траговима; Smiderle et al. (2011) наводе глукозу као доминантни моносахарид (>66%), а затим галактозу, фукозу и манозу; трећа студија наводи највише манитола (21%), као и глицерол, инозитол и трехалозу, што може бити корисно за храну за дијабетичаре јер не утичу на повећање нивоа глукозе у крви (Cho et al., 2008).

Удео полисахарида у *A. blazei* из Холандије је следећи: α -гlukan - 25.7%; β -гlukan - 49.1%; маногалактан - 25.2% (Smiderle et al., 2011). Главни ланац у β -гlukanима ове гљиве је (1,6)- β -гlukan (Dong et al., 2002; Gonzaga et al., 2013), за разлику од већине гљива где је главни низ састављен од (1,3)- β -гlukanа (Giavasis, 2014). Аутори су установили да полупречишћени полисахаридни екстракт има имуномодулаторску активност (Smiderle et al., 2011), док је пречишћен (1,6)- β -D-гlukan изолован из овог екстракта нема (Smiderle et al., 2013). Друга истраживања такође пријављују корисна биолошка својства када се уз (1,6)- β -гlukanску фракцију јављају и друге компоненте, као што је (1,3)- β -гlukan, који се повезује са имуностимулирајућим и антитуморним дејством (Ohno et al., 2001; Yamanaka et al., 2012; Yu et al., 2009). Плодоносна тела имају веће количине (1,6)- β -гlukanа, као и мале количине α -гlukanа и других фракција, а концентрација (1,3)- β -гlukanа се повећава са сазревањем (Camelini et al., 2005). Слично је и са (1,6)- β -D-гlukanско-протеинским комплексом, који губи антитуморну функцију када му се одвоји протеинска фракција, што указује на њено неопходно присуство у циљу биолошке функције (Kawagishi et al., 1989; 1990). Екстракти β -гlukanа се могу подвргнути хидролизи, након чега настали продукти (олигосахариди) имају антидијабетска својства (Y.-W. Kim et al., 2005). Осим β -гlukanа, студије показују и корисна биолошка својства α -гlukanа (Mizuno et al., 1998).

Хетерополисахариди из *A. blazei* имају различита биоактивна својства. Галактоманогlukan из *A. blazei* има имуномодулаторску улогу (Zhang et al., 2018). Хетерополисахариди састављени од глукозе (78,4%), арабинозе (10,5%) и манозе

(8,5%) могу да буду корисни код неких кардиоваскуларних болести (Zhang et al., 2010). Кисели полисахариди из *A. blazei* могу послужити као безбедне хиполипидемијске супстанце, јер студија наводи да присуство ових полисахарида утиче на снижавање нивоа LDL (*low density lipoprotein*) и на повећање нивоа HDL (*high density lipoprotein*), односно мења метаболизам холестерола (Y. Li et al., 2020). Истраживања пријављују и присуство глукоманана, што је резултат другачијег метаболизма течних култура *A. blazei* у односу на плодносна тела (Mizuno et al., 1999). Н.Т. Wang et al. (2018) наглашавају да присуство фукозе у полисахаридима може имати битну улогу у имуномодулацији, мада се појављују контрадикторни резултати везано за биолошка својства фукогалактана у литератури (Komura et al., 2010). Liu et al. (2011) су указали на постојање разгранатих галактана и глукана који су у воденом раствору у облику троструког хеликса, што може бити потенцијално биолошки корисно, јер су структурно комплекснији молекули повезани са бољом имуномодулаторном и антиканцерогеном улогом.

Делимично пречишћени полисахариди са око 17,3 g/100g α -глукана и 22,8 g/100g β -глукана имају имуностимулишући и антиоксидативни ефекат и могу послужити за развој антиоксидативних прехранбених адитива (Kozarski et al., 2011). Такође се као пример релативно јефтиног дијететског суплемента наводи полисахаридни екстракт добијен екстракцијом врућом водом и преципитацијом етанолом, који већински садржи (1,6)- β -D-глукане (Kozarski et al., 2014). Екстракт који се састоји од различитих форми β -глукана пореклом из гљива, а садржи *A. blazei* у највећем проценту (82.4%) делује антитуморно и антиалергенски (Berven et al., 2015; Ellertsen & Hetland, 2009). Осим ових екстраката, пријављена су и фунгицидна, антивирусна и хепатопротективна дејства полисахаридних екстраката (Eguchi et al., 2017; Martins et al., 2017; Uyanoglu et al., 2014), могу се користити у биомедицинске сврхе (Gonzaga et al., 2020; Vincent et al., 2013), као и у пољопривреди за сузбијање биљних болести и патогених гљива (Eira et al., 2005; Garcia et al., 2018). Сви ови резултати показују разноликост полисахаридног састава гљива и упућују на коришћење вишекомпонентних екстраката уместо једнокомпонентних (Smiderle et al., 2013).

Водени екстракти су најчешћи тип екстраката и обимна литература потврђује њихова биолошка својства – антитуморна, антимутагенска, антивирусна, антипаразитна, антимикробна, имуностимулишућа, имуномодулаторска, антиоксидативна, анти-*quorum-sensing* својства, делују хепатопротективно, хипохолестеролски и хипогликемијски (Barbisan et al., 2002; Bernardshaw et al., 2005; Bruggemann et al., 2006; Chan et al., 2007; de Sousa Cardozo et al., 2011; Delmanto et al., 2001; Faccin et al., 2007; Gan et al., 2013; Jumes et al., 2010; Lima et al., 2008; Nakajima et al., 2002; Soković et al., 2014; Talorete et al., 2002; Valadares et al., 2011). Екстракцију полисахарида из плодносних тела врелом водом могуће је оптимизовати (Liu et al., 2009), док други аутори дају предност ензимској екстракцији полисахарида у односу на екстракцију врућом водом, у контексту приноса и антиоксидативне активности (Jia et al., 2013). Екстракција мешавином етанола и воде има бољи инхибиторни ефекат према ћелијама леукемије у односу на чисти етанол или воду као раствараче (Kim et al., 2009). Механизми антиканцерогених дејстава полисахаридних, као и других компонената *A. blazei* могу се детаљније наћи у литератури (Bertollo et al., 2022; Biedroń et al., 2012; da Silva Campelo et al., 2021; Eira et al., 2005; Firenzuoli et al., 2008; Wisitrassameewong et al., 2012).

2.4.2.2. Протеини *A. blazei*

Ова гљива је богата аминокиселинама као што су глутаминска и аспатрамска киселина, као и натријум-глутаматом, који је одговоран за специфичан укус дефинисан као „умами“ (Lisiecka et al., 2013). Друга студија наводи балансиран састав есенцијалних аминокиселина са највише аргинина, затим глицин, глутаминску киселину, пролин, аланин, као и друге (Cho et al., 2008). Из *A. blazei* су изолована три селенопротеина растворљива у води, што је интересантно са нутритивног и функционалног аспекта, посебно ако се узму у обзир честе дефицијенције наспрам разних функција које селен има у људском организму (Hu et al., 2021).

Доста студија издваја комплексе протеина и полисахарида као носиоце разних биолошких активности. Углавном се ради о антитуморном и имуномодулаторском дејству (Bertollo et al., 2022; Ebina & Fujimiya, 1998; Fujimiya et al., 1998; G.-Y. Kim et al., 2005). Протеоглукани и β -гљукани делују као модулатори биолошког одговора, тј. делују на урођени имуни систем и изазивају антиинфективне и антитуморне ефекте (Hetland et al., 2008). Наводи се и да РНК-протеински комплекс делује против ћелија леукемије (Gao et al., 2007). Различите студије које испитују полисахаридне екстракте *A. blazei* наводе да садрже и одређен проценат протеина – од 8 до 22,5% (Dong et al., 2002; Lima et al., 2008), што је слично као код других гљива (Siu et al., 2014). Оно што заостаје након екстракције врелом водом су полисахариди, полисахаридно-протеински комплекси и хитин. У целини имају слабо антитуморно дејство, али се ово дејство појачава пречишћавањем, где се јављају фракције као што су гликопротеини састављени од (1,6)- β -гљукана и протеинске фракције богате Asx (аспарагинска киселина или аспарагин), Glx (глутаминска киселина или глутамин), Ala (аланин), Leu (леуцин) и Pro (пролин) (Mizuno et al., 1990).

A. blazei је и потенцијално добар извор лигноцелулозних ензима као што су лаказа, манган-пероксидаза, холоцелулаза, итд. у зависности од медијума (Largeteau et al., 2011).

2.4.2.3. Липиди *A. blazei*

Масно-киселински састав показује присуство линолне киселине (>72%), затим палмитинске, стеаринске и олеинске киселине, што се сматра повољним за балансирану исхрану због високог процента полинезасићених масних киселина (Carneiro et al., 2013). Карактерише је добар однос незасићених и засићених масних киселина, као и добар однос ω -6 и ω -3 масних киселина (Cho et al., 2008). Mazzutti et al. (2012) као главне антимикуробне супстанце наводи линолну и палмитинску киселину у екстрактима добијеним екстракцијом суперкритичним флуидом и истиче да боље дејство имају на Грам-позитивне у односу на Грам-негативне бактерије, вероватно због структуре њиховог ћелијског зида. Линолна киселина такође учествује у антиинфламаторном одговору инхибирајући продукцију азот-мооксида као сигналног молекула и регулишући експресију цитокина (Saiki et al., 2017).

Још 1988. године су изолована четири стероида из *A. blazei* са цитотоксичим дејством на HeLa ћелије (Kawagishi et al., 1988). Друга студија наводи да липидна фракција из *A. blazei* има антитуморна својства и да је носилац ове функције ергостерол (Takaku et al., 2001). Осим линолне киселине, нађен је и сквален, полинезасићена компонента, која је прекурсор стероида, као и сфинголипиди (гљукоцереброзиди), који могу имати важну улогу у централном нервном систему (Eira et al., 2005). Испитивана је и оптимизација техника екстракција ергостерола из агроиндустријских остатака након гајења *A. blazei* због његове вредне биолошке улоге (Taofiq et al., 2019a).

2.4.2.4. Фенолна једињења *A. blazei*

Аутори наводе релативно висок садржај токоферола, *p*-хидроксибензојеву киселину као доминантну фенолну киселину и *p*-кумаринску и циметну киселину у траговима (Carneiro et al., 2013). Друга студија не детектује ова, већ друга фенолна једињења – галну киселину, сиригинску киселину и пирогалол (Carvajal et al., 2012). Ферментацијом у чврстом стању и субмерзно продукују се биоактивна једињења, као што су ергостерол, фенолне киселине, флавоноиди, антоцијани и антоцијанидини (de Oliveira et al., 2018). Разлике у хемијском саставу гљива су честе и као главни разлози се наводе температура окружења у коме гљива расте, релативна влажност током раста и складиштења, као и тип компоста и коришћеног ђубрива код гајених гљива (Carneiro et al., 2013). Када се пореде фенолна једињења плононосних тела у две фазе зрелости, разлике су минорне, а антиоксидативност се не разликује, тако да се препоручује примена без обзира на зрелост (Soares et al., 2009).

Често се испитују етанолни, метанолни и етилацетатни екстракти и за њих су наведена антиоксидативна, антидијабетска, антиканцерогена, антивирусна својства, као и могућа примена у козметичке сврхе (Carneiro et al., 2013; Carvajal et al., 2012; Faccin et al., 2007; Gan et al., 2013; Huang & Mau, 2006; Lavitschka et al., 2007; Taofiq et al., 2019b; Tsai et al., 2007; Wei et al., 2020). Студија Mourão et al. (2011) наводи да су најбољи услови за екстракцију антиоксидативних компонената екстракција метанолом на 60°C 60 минута. Метанол је погодан растварач јер због мале моларне масе има афинитет и ка поларним и ка неполарним супстанцама и реагује са липидима, ергостеролом и β-глюканима из ћелијске мембране (Mourão et al., 2011). Прорачунате су и потребне дневне дозе метанолног екстракта *A. blazei* и сушене гљиве које се могу користити као инхибитори α-амилазе и α-глукозидазе код дијабетичара (Stojkovic et al., 2019). Треба обратити пажњу и на фенолна једињења која се везују за полисахариде интермолекулским интеракцијама, чиме мењају конформацију полисахарида и самим тим њихову биолошку активност (Smiderle et al., 2011). Такође треба подвући да метанолни екстракти који су богати фенолним једињењима, стероидима, терпенима, стеролима, као и етанолни екстракти богати фенолним једињењима и токоферолима имају полисахариде у свом саставу, па се не може јасно одредити утицај појединачних супстанци (da Silva Campelo et al., 2021).

2.4.2.5. Терпени и терпеноиди *A. blazei*

За разлику од других гљива, терпенска једињења из *A. blazei* нису била у фокусу истраживања, узимајући у обзир доминантну биолошку улогу полисахарида и протеина. Нађено је да ергостани из *A. blazei* имају цитотоксично дејство на ћелије рака јетре (Ueguchi et al., 2011), а откривени су и блазеиспирили, засебна класа спиро-тритерпеноида са корисним биолошким својствима као што је снижавање нивоа холестерола, а пошто се јављају само у оквиру ове врсте, потенцијално могу послужити и као хемотаксономски маркер (Thongklang et al., 2017).

2.4.2.6. Остала једињења *A. blazei*

У плононосним телима се у већим концентрацијама налазе фумарна и млечна киселина, а присутне су и сирћетна, јабучна, пироглутаминска, мравља, лимунска и оксална киселина (Cho et al., 2008). Carvajal et al. (2012) наводи и бензојеву, α-кетоглутарну и *trans*-аконитинску киселину. Могуће синергистичко дејство органских киселина и фенолних једињења на антиоксидативни потенцијал тек треба испитати.

Према публикованим студијама, када се сагледају *in vivo* истраживања медицинских ефеката макрогљива, већина студија користи сирове екстракте, припремљене од целих

плодоносних тела гљива. Када се у исхрану животиња уведе сирова гљива, утиче на снижавање нивоа холестерола и липида, има имуномодулаторска својства, може се користити за превенцију канцера и као коадјуванс (додатан облик терапије) код хемотерапије (de Miranda et al., 2017; Henriques et al., 2016; Ishii et al., 2011). Са друге стране, студија Mukai et al. (2006) наводи неколико случајева где су пацијенти који болују од рака имали поремећај функције јетре, што може бити узроковано екстрактима *A.blazei*, мада се не може јасно утврдити. Аутори наглашавају да се и супстанце коришћене у комплементарној и алтернативној медицини не смеју олако користити без озбиљних клиничких студија (Dias et al., 2004; Mukai et al., 2006). Такође се наводи да је потребно још студија како би се потврдило антимикубно дејство, као и да би се оправдала широка потрошња ове гљиве као суплемента (Firenzuoli et al., 2008; Lima et al., 2016). Спроведена је прва фаза клиничких истраживања на 78 онколошких пацијената у ремисији који су узимали различите дозе *A.blazei* током шест месеци. Код већине пацијената није изазван никакав проблем, код девет пацијената су примећена нежељена дејства попут мучнине и дијареје, а само један пацијент је развио дисфункцију јетре као резултат алергије на неидентификовану супстанцу (Ohno et al., 2011). Коришћење екстракта *A. blazei* код пацијената који су на хемотерапији због гинеколошких канцера повећава активност ћелија убица (група лимфоцита) и ублажава нежељене ефекте хемотерапије као што су промене у апетиту, алопесија, емоционална нестабилност и општа слабост организма (Ahn et al., 2004).

2.4.3. *Laetiporus sulphureus*

Класификација:

Подраздео: Basidiomycotina

Класа: Hymenomycetes

Ред: Aphyllophorales

Фамилија: Polyporaceae

Род: *Laetiporus*



Слика 2.8. Плодоносна тела *Laetiporus sulphureus*

(<https://www.inaturalist.org/taxa/53713-Laetiporus-sulphureus>)

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill је макромицета чије је име спој латинских речи „*laeti*“ и „*por*“, што значи *са светлим порама*, док се *sulphureus* односи на карактеристичну жуто-наранџасту боју плодноносних тела (слика 2.8.). Још 1789. француски ботаничар Булијар (фр. *Bulliard*) је описао ову гљиву као *Boletus sulphureus* (Khatua et al., 2017). Амерички миколог Мурил (*Murrill*) направио је ред *Laetiporus* 1904. године и 1920. у њега пребацио *Polyporus sulphureus* (Radic et al., 2009). Ова гљива насељава све континенте осим Антарктика, може се наћи широм Европе и Северне Америке, а позната је и у Србији као шумска лепеза (због облика) или шумско пиле, јер њен укус подсећа на укус пилећег меса, а према неким и на укус морског

рака или јастога (Khatua et al., 2017; Petrović, 2018; Ziaja et al., 2018). Колонизује стабла листопадног и четинарског дрвећа. Плодоносна тела нису јестива у свежем стању, већ након термичке обраде, због чега је највероватније забележен један случај тровања 1988. године (Petrović, 2018; Ziaja et al., 2018). Разлог може бити и погрешна идентификација, јер се у литератури наводи да су врсте у оквиру рода *Laetiporus* проблематичне за разликовање. Уколико расте на четинарима, лако се може помешати са *Laetiporus conifericola* или *Laetiporus huronensis*, а уколико расте на храсту или *Eucalyptus sp.* може се радити о *Laetiporus gilbertsonii* или *Laetiporus cincinnatus*, па аутори препоручују ослањање на ДНК анализе за одређивање врсте у оквиру рода (Grienke et al., 2014). Забележене су студије које истражују производњу плоднононих тела на вештачким супстратима, оптималне услове за субмерзно гајење мицелија, као и његова биолошка својства (Fidler et al., 2013; Luangharn et al., 2014; Petrovic et al., 2011; Pleszczyńska et al., 2013; Popa et al., 2016).

Нутритивни и хемијски профили гљива могу јако варирати у зависности од садржаја влаге, момента када су убране, зрелости и услова околине, као што су влажност, температура, услови чувања, стадијум раста, локација итд. (Ayaz et al., 2011; Grienke et al., 2014). Нутритивни састав чине угљени хидрати (64,90 g), масти (5,85 g) и протеини (11,90 g на 100 g суве масе плоднононог тела), док је енергетска вредност 360 – 375 kcal (Ayaz et al., 2011; Petrović et al., 2014b). Садржај пепела износи 4 g / 100 g, док је садржај влаге 13,30 g / 100 g (Ayaz et al., 2011). У односу на друге испитиване гљиве, *L. sulphureus* издваја релативно висок садржај протеина, калцијума и хептадеканске киселине, као и нижи садржај воде (Palazzolo et al., 2012). Као и већина гљива, добар је извор протеина и есенцијалних аминокиселина, док су садржај масти и калоријска вредност ниске, што је чини потенцијално здравом храном и саставним делом балансиране исхране (Ayaz et al., 2011; Palazzolo et al., 2012; Petrović et al., 2014b).

2.4.3.1. Полисахариди *L. sulphureus*

Olennikov et al. (2008) су након детаљних анализа пронашли слободне угљенохидратне компоненте (трехалозу, арабитол и манитол), полисахариде растворљиве у води (ПВ) и полисахариде растворљиве у базама (ПБ). Моносахаридни састав ПВ укључује: фукозу, манозу, глукозу и галактозу, као и ксилозу, рамнозу и арабинозу у траговима. Тоталном хидролизом ПБ добија се само глукоза. Осим овога, аутори наводе и присуство хитина. Анализом ових компонената у зависности од фазе раста плоднононих тела, утврђено је да се слободни угљени хидрати, ПБ и хитин јављају на крају раста, док се ПВ највише јављају током сазревања због своје складишне улоге (Olennikov et al., 2008).

Удео ПВ у плодноносним телима је нешто нижи од 4% и као његова најзначајнија компонента наводи се летипоран А, разгранати галактоманоглукан са антиоксидативним својствима (Olennikov et al., 2009b). Друга студија наводи сличан разгранати хетерополисахарид - фукоманогалактан са главним ланцем од (1,6)- α -D-галактопиранозидних јединица делимично супституисан ланцима манозе, фукозе и галактозе (Alquini et al., 2004). Испитивања ПБ довела су до открића линеарног неразгранатог β -1,3-гљукана названог латиглукан I (*latiglucan I*), сличног као полисахариди бактерија или алги, неуобичајеног за гљиве које карактеришу разгранати ланци β -гљукана (Olennikov et al., 2009a). Alquini et al. (2004) такође наводе присуство линеарног β -гљукана са главним ланцем изграђеним од (1,3) веза нерастворљивог у води. Поред ових полисахарида, у фракцији ПБ могу се наћи и мање заступљени полисахариди летиглукан II (*laetiglucan II*; разгранати β -1,3-гљукан) и летиглукан III (*laetiglucan III*; линеарни α -1,3-гљукан) (Olennikov et al., 2010). Наводи се и да ћелијски

зидови ове гљиве садрже и до 88% α -глюкана, док се код осталих гљива креће у опсегу 9-46% (Grienke et al., 2014). Многи полисахариди са различитим биолошким улогама су изоловани не само из плодноносних тела, већ и из мицелија субмерзно гајеног *L. sulphureus* и поседују читав спектар корисних биолошких својстава (Hwang et al., 2008; Hwang & Yun, 2010; Lung & Huang, 2012; Seo et al., 2011). Карбоксиметиловањем полисахарида може се утицати на повећање одређених биолошких својстава (Wiater et al., 2011). Чак се наводи и да полисахариди који заостају на искоришћеним супстратима за узгој *L. sulphureus* могу да се екстрахују и да се због своје биоактивности могу користити у производњи функционалне хране или лекова (Zhao et al., 2017).

Још 1982. је започето са истраживањима биолошке активности и утврђено је да протеинско-полисахаридна фракција поседује антитуморна својства (Kang et al., 1982). Водени и полисахаридни екстракти поседују корисна биолошка својства, као што су антиоксидативна, антимицробна и антипролиферативна (Klaus et al., 2013; Younis et al., 2019).

2.4.3.2. Протеини *L. sulphureus*

У литератури се наводи 14% протеина рачунато на суву материју, од чега процентуално има највише албумина (преко 20%) (Bauer Petrovska, 2001). Код *L. sulphureus* прикупљених са три различите локације у Мађарској пронађено је да проценат протеина варира од 8,4 до 12,9% (Kovács & Vetter, 2015). Биолошка вредност протеина је добра, пошто *in vitro* дигестијама подлеже 86% укупних протеина (Kovács & Vetter, 2015). Карактерише је и добар аминокиселински састав због присуства есенцијалних аминокиселина (Agafonova et al., 2007). Може се користити као извор термостабилних β -1,3-1,4 глуканаза за примену у индустрији (Hong et al., 2009) и као извор термостабилних ксиланаза (Lee et al., 2009). Највише су испитивани лектини, класа протеина који се због своје структуре везују са гликопротеинима, моно- или олигосахаридима и испољавају корисна биолошка својства (Konska et al., 1994; Mancheño et al., 2010; Y. Wang et al., 2018). Лектини нису тосични у одређеним дозама, а инхибирају ангиогенезу и развој канцера, што је потврђено у *in vivo* експериментима (Petrović et al., 2020). Из ове гљиве изолована је и аспартатна протеаза и утврђено је да разлаже α -s₁-казеин слично као други ензими, док са β -казеином даје шири спектар продуката разградње (Kobayashi & Kim, 2003).

2.4.3.3. Липиди *L. sulphureus*

Укупан садржај липида варира приближно од 1,6 до 2,5% суве масе, зависно од начина екстракције или типа екстракционог средства (Sinanoglou et al., 2015). Најбројнији су неутрални липиди (доминантни триглицерид), затим фосфолипиди (доминантан фосфатидилхолин) и гликолипиди; примећене су релативно велике количине стерола, као и висок однос незасићених према засићеним масним киселинама (Sinanoglou et al., 2015). Доминантна је линолна киселина (преко 63%), а следеће по заступљености су олеинска и палмитинска киселина (Petrović et al., 2014b). Липидни екстракти показују умерену антимицробну активност која варира у зависности од супстанце којом је вршена екстракција (Sinanoglou et al., 2015). Ericsson & Ivonne (2009) су дали комплетну стеролну слику са освртом на стероле код осталих представника фамилије *Polyporaceae*, док је ергостерол први пут изолован из *L. sulphureus* у овом роду (Martinez et al., 2015).

2.4.3.4. Фенолна једињења *L. sulphureus*

Доминантна фенолна једињења код већине гљива чине фенолне киселине (Ziaja et al., 2012). Код самониклих *L. sulphureus* из Пољске као доминантна присутна је протокатехуинска киселина (17,7 µg / g суве масе), што је најнижа вредност у односу на друге испитиване гљиве у овој студији (Ziaja et al., 2012). Друга студија наводи веће концентрације галне киселине, а затим и присуство протокатехуинске киселине. Забележене су и циметна и *p*-хидроксibenзоева киселина (Petrović et al., 2014b). Још се наводи и да је нађен меланински комплекс у *L. sulphureus* који се састоји од три полимера фенолне природе (дихидронафталенски тип) у кондензованој форми (Olennikov et al., 2011a). У литератури постоји неслагање око тога које групе једињења су носиоци антиоксидативне улоге код гљива. У ранијим студијама углавном су навођена фенолна једињења, мада све више студија указује на то да би прави носиоци могли бити полисахариди и полисахаридно-протеински комплекси (Karaman et al., 2010; Olennikov et al., 2009b). Ипак, велики број студија поред антиоксидативних, потврђује друга корисна дејства етанолних и метанолних екстраката, као што су антимикуробна, антипролиферативна, антиканцерогена својства, а делују хипогликемијски и као инхибитори ангиогенезе и меланогенезе у *in vivo* експериментима (Acharya et al., 2016; Bulam et al., 2019; Kolundzic et al., 2016; Pavic et al., 2021; Petrović et al., 2020; Popa et al., 2016; Radic et al., 2009; Turkoglu et al., 2007; Younis et al., 2019; Ziaja et al., 2018). Између 57 врста гљива, метанолни екстракт *L. sulphureus* је издвојен због изузетне активности у инхибицији ХИВ-1 реверзне транскриптазе (Mlinarić et al., 2005). Етанолни и водени екстракти показали су одличну инхибиторну активност према леукемији (Lovy et al., 2000). Метанолни екстракт *L. sulphureus* има потенцијалну улогу као конзерванс (Petrović et al., 2013; 2014b). Због синергистичког деловања фенолних, липидних и других компонената, у циљу боље антиоксидативне и антимикуробне заштите, увек је боље користити целу гљиву уместо одвајања поларних и неполарних фракција (Sinanoglou et al., 2015).

2.4.3.5. Терпени и терпеноиди *L. sulphureus*

Због своје биолошке улоге, ова група једињења је често била предмет истраживања. У плодноном телу *L. sulphureus* су пронађени ланостаноидски гликозиди (Yoshikawa et al., 1999), затим је изоловано шест ланостаноида за које се тврди да имају умерено апоптоичко дејство, али да се бољи биолошки ефекти постижу ацетилацијом (Ríos et al., 2012). Нађени су нови сесквитерпеноиди различитих структура и потврђено је присуство ланостаноида (He et al., 2015a; 2015b). Новије студије баве се проналажењем нових тритерпена са корисним биолошким дејствима, као што су антифунгално, антипролиферативно (Hassan et al., 2021) и анти-инфламаторно (Khalilov et al., 2022). Ебурикоична киселина из *L. sulphureus* има анти-инфламаторно и хепатопротективно дејство (Sun et al., 2014; Wang et al., 2017; Ziaja et al., 2018) и њеним изоловањем из ове гљиве 1960-их година је скренута научна пажња на *L. sulphureus* (Khatua et al., 2017).

2.4.3.6. Остала једињења *L. sulphureus*

Као један од разлога високе антиоксидативне активности *L. sulphureus* аутори наводе високе концентрације оксалне киселине, која служи као хватач слободних радикала (*scavenger*), извор протона и има хелирајућа својства (Karaman et al., 2010). Лигноцелулитичке гљиве имају деградациону улогу која укључује ензимске реакције каталисане лигназама, хемицелулазама, целулазама, оксидазама и пероксидазама. Ове реакције су праћене стварањем слободних радикала, па аутори објашњавају да су се због тога појавили потенцијално моћни антиоксидативни одбрамбени системи као одговор (Karaman et al., 2010). Код *L. sulphureus* из Русије нађене су винска, лимунска,

јабучна, малонска и ћилибарна киселина (Olennikov et al., 2008), док су код *L. sulphureus* из Турске пронађене јабучна и лимунска киселина, као и аскорбинска у траговима (Ayaz et al., 2011). У *L. sulphureus* су пронађени и токофероли; најзаступљенија изоформа је α -токоферол (најактивнија форма витамина Е), а следе γ - и δ -токоферол (Petrović et al., 2014b). Детектовани су и ниацин (витамин Б₃), пантотенска киселина (Б₅), холекалциферол (Д₃), биотин (Б₇) и цијанокобаламин (Б₁₂) (Palazzolo et al., 2012). Из *L. sulphureus* изоловани су деривати микофенолне киселине који су показали умерену цитотоксичност (Fan et al., 2014).

Главни носилац боје код самониклих *L. sulphureus* је пигмент назван летиפורична киселина А (енгл. *laetiporic acid A*). Дуго се мислило да је реч о каротеноидном пигменту, али су каснија истраживања утврдила да је реч о полиену неизопреноидног порекла (Weber et al., 2004). Такође се наводи да је овај полиен састављен од десет конјугованих двоструких веза, што није уобичајено за овакве полиене фунгалног порекла (Weber et al., 2004). Каснија истраживања су ово потврдила и пронашла још један пигмент (2-дехидро-3-деоксилетиפורична киселина А), као и два мање заступљена пигмента присутна у течной култури – летиפורична киселина Б и Ц (Davoli et al., 2005). Такође се наводи да би летиפורична киселина А због своје стабилности могла да пронађе улогу као прехранбена боја, а да би метаболити *L. sulphureus* могли да добију GRAS статус због своје дуге историје коришћења у прехрани (Davoli et al., 2005). Могућа је и индустријска култивација у биореакторима у циљу продукције бојених материја (Zschätzsch et al., 2021). Ова гљива се у индустрији такође користи као извор различитих биљних хормона – апсцисинске киселине, гиберелинске киселине, зеатина и цитокинина (Klaus et al., 2013; Radic et al., 2009).

Карактеристичан „мирис на печурке“ потиче од разлагања линолеинске киселине приликом сечења плодноносних тела макрогљива, када се ослобађају 1-октен-3-ол и 1-октен-3-он (Klings et al., 2011). Осим овог мириса, базидиомицете се карактеришу изобиљем испарљивих компонената и сложеним метаболизмом који стоји иза њиховог настанка. Такође, постоје велике разлике у резултатима анализа испарљивих компонената у литератури. Наводи се да разлике потичу од варијетета у оквиру саме врсте, локације на којој ова гљива расте, као и њене старости (Petrović et al., 2013). Студија Klings et al. (2011) је пронашла близу 30 испарљивих једињења, где се као главне наводе хетероцикличне компоненте, између осталих сотолон и други фуранони, док друга студија наводи чак 56 испарљивих једињења, зависно од коришћених медијума за екстракцију (Petrović et al., 2013). Мирисна ароматична једињења чине 11,5% испарљивих компонената (Rapior et al., 2000).

2.4.4. Примена гљива у производњи функционалних прехранбених производа

Лековита својства гљива су позната још од давнина. Сматра се да су протеини пореклом из макрогљива нутритивно квалитетнији у односу на протеине пореклом из биљака, а у исто време садрже мање калорија, засићених масти и холестерола у односу на храну животињског порекла, што их чини идеалном намирницом која задовољава потребе здраве исхране (Raut & Adhikari, 2021). Функционалност се огледа у антиоксидативном, хипохолестеролемијском, хиполипидемијском, антиатерогеном, хипогликемијском, антимикробном, антитуморном, антихепатотоксичном, антихипертензивном, антиинфламаторном, антиалергенском, антимутагеном, имуносупресивном ефекту, као и у дејству против гојазности, старења и неуродегенеративних поремећаја (Assemie & Abaya, 2022; Giavasis, 2014; Gupta et al., 2018; Raut & Adhikari, 2021; Takahashi et al., 2020). Као биоактивне компоненте које су носиоци овог широког спектра функционалних својстава наводе се пептиди и

протеини, фенолне компоненте, полисахариди, глукани као издвојена група због великог значаја, комплекси полисахарида и протеина, гликозиди, масти, минерали, испарљива уља, терпени, тритерпеноиди, токофероли, фолати, органске киселине (Gupta et al., 2018; Khan et al., 2018; Y.-W. Kim et al., 2005; Reis et al., 2017; Üstün et al., 2018).

Биоактивни полисахариди пореклом из гљива имају велики потенцијал за формулацију функционалне хране (Giavasis, 2014). У последњих пар деценија истраживања на ову тему су се интезивирала и потврдила корисна биолошка својства за која се искуствено већ знало у азијским и другим земљама где се гљиве користе као народни лек (Giavasis, 2014). Да би ова својства била искоришћена, у индустријским условима потребно је превазићи препреке као што су стабилан и стандардизован квалитет, састав, чистоћа, хомогеност, испитивање интеракција жељених биоактивних супстанци са осталим конституентима хране, као и ефекат прераде хране на функционалност (Giavasis, 2014). Сложеним физиолошким процесима микроби из цревне микрофлоре утичу на здравље домаћина, а полисахариди пореклом из гљива могу допринети добром балансу тако што утичу на редукцију броја патогена и повећање бројности корисних бактерија својим пребиотским ефектом (Yin et al., 2020). Ови полисахариди имају многобројна корисна својства, а осим већ наведених бенефита, одсуство токсичности их чини идеалним функционалним биополимерима (Giavasis, 2014). Због несталних приноса и великих трошкова пречишћавања, фунгални полисахариди могу бити кориснији у прехранбеној него у фармацеутској индустрији, мада треба водити рачуна да се прерадом хране или интеракцијама са другим компонентама присутним у храни не умањи њихова ефикасност (Giavasis, 2014). Питање које и даље није решено везано за примену фунгалних полисахарида је која је одговарајућа доза која је потребна да би дошло до експресије биоактивности у храни (Giavasis, 2014).

Гљиве као извор протеина постају све интересантније. У светлу демографског раста и растућих потреба за јефтиним изворима протеина, протеини гљива се намећу као одлично решење јер имају бројне нутритивне предности у односу на протеине биљног порекла, као и предности у погледу функционалних својстава и економичности узгајања у односу на протеине анималног порекла (González et al., 2020). Ова економичност се огледа у претварању агроиндустријског отпада и дрвне биомасе у храну, што представља успешну примену циљева одрживе пољопривреде и шумарства у пракси (Gupta et al., 2018). Узимајући у обзир кратак рок трајања свежих макрогљива (оквирно око 3-7 дана у хладним условима), као и сезонску доступност одређених врста, морају се процесуирати како би се очувале. Литература указује на предности и мане поступака за њихову обраду, па се приликом производње функционалне хране мора обратити пажња на ове кораке како би се сачувале биоактивне компоненте као носиоци функционалности (Yadav & Negi, 2021).

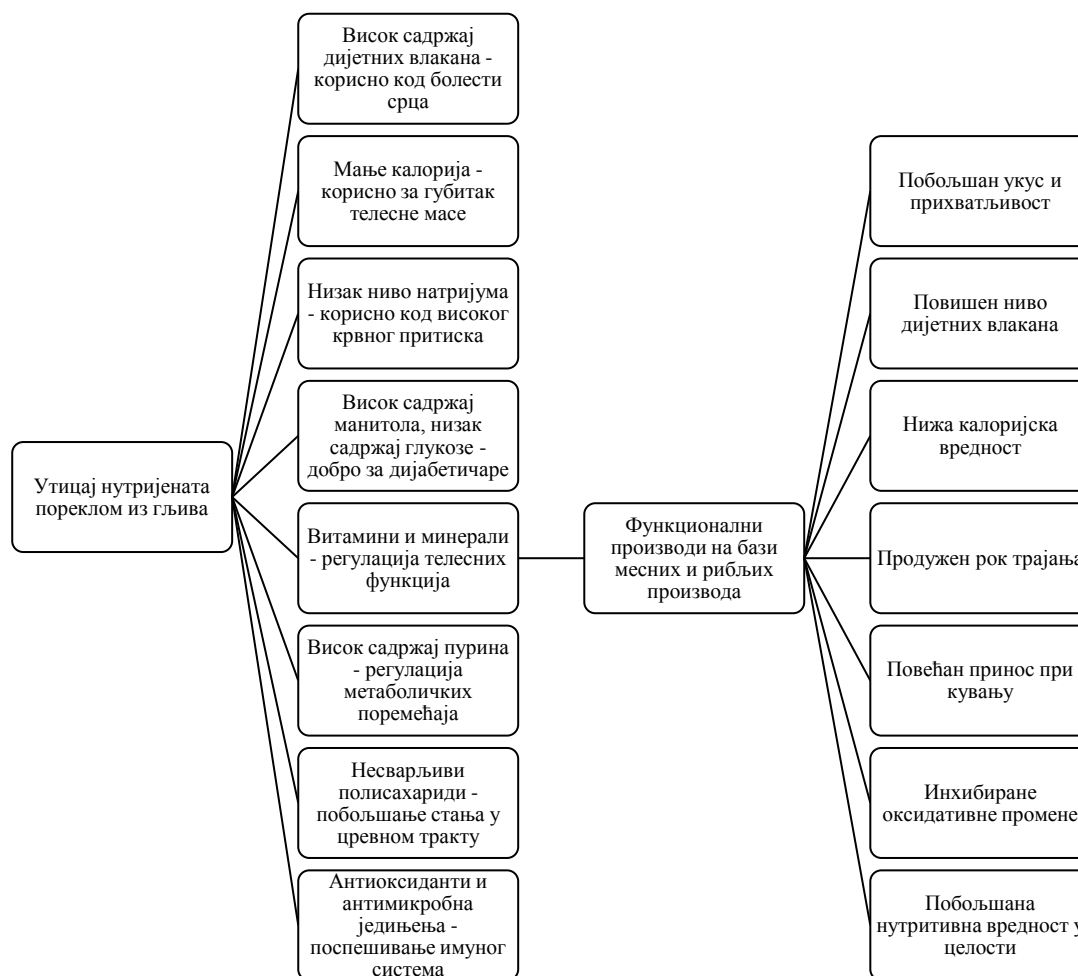
Узимајући у обзир све набројане предности коришћења гљива за производњу функционалне хране, у науци, као и на тржишту се појављује све већи број функционалних производа. Неке од гљива које се користе као извори биоактивних супстанци су: *Agaricus bisporus*, *Agaricus blazei*, *Cordyceps militaris*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus eryngii*, *Inonotus obliquus*, *Hericium erinaceus*, *Antrodia Camphorata*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* (Ma et al., 2018). Одабрани функционални производи на бази гљива побројани су у табели 2.3.

Осим ових производа, аутори посебно наводе листу са преко 25 функционалних производа где се део месних или рибљих производа замењује гљивама (слика 2.9.) како

би се задовољиле потребе флекситаријанаца који заступају нови приступ у исхрани – смањење конзумације меса, за разлику од веганске и вегетеријанске исхране која их у потпуности избацује (Das et al., 2021). Иако све побројано указује на пораст интересовања за гљивама као функционалном храном, потребно је уложити још напора да би понуда у западним земљама била разноврсна као у Азији (Reis et al., 2017).

Табела 2.3. Функционални производи на бази гљива; из Ma et al. (2018), González et al. (2020) и Yadav & Negi (2021)

Функционални производ	Функционалност	Врста гљиве	Референца
Бели хлеб са додатком гљиве и сушених урми	Повећан садржај протеина и гвожђа	<i>Agaricus bisporus</i>	Ahmad & Singh (2016)
Бисквит торта са спрашеним <i>Agaricus bisporus</i>	Побољшан нутритивни састав	<i>Agaricus bisporus</i>	Arora et al. (2017)
Хлеб од маниоке са додатком спрашене гљиве	Побољшан нутритивни састав	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Azeez et al. (2018)
Говеђе плескавице са додатком спрашених гљива	Повећан садржај протеина и влакана уз смањен садржај масти и натријума	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Cerón-Guevara et al. (2020)
Кобасице са додатком спрашене гљиве	Побољшана антиоксидативна својства уз избацивање фосфата	<i>Flammulina velutipes</i>	Choe et al. (2018)
Бисквити са додатком сојиног брашна и спрашене гљиве	Повећан садржај протеина, гвожђа, влакана	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Farzana & Mohajan (2015)
Кукурузно брашно обогаћено спрашеним гљивама	Повећан садржај протеина, минерала и влакана	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Ishara et al. (2018)
Паста са додатком спрашених гљива	Повећан садржај протеина и дијетних влакана	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Boletus edulis</i>	Lu et al. (2018)
Грицкалице од екструдираног гриза са додатком јестивих гљива	Смањен гликемијски индекс и побољшана антиоксидативност	<i>Agaricus bisporus</i> <i>Lentinula edodes</i> <i>Boletus edulis</i>	Lu et al. (2020)
Мафини од пиринчаног брашна са додатком спрашене гљиве и комине шаргарепе	Побољшана антиоксидативна својства	<i>Lentinula edodes</i>	Olawuyi & Lee (2019)
Бели хлеб са додатком спрашених гљива	Повећан садржај протеина, минерала и влакана	<i>Pleurotus ostreatus</i> <i>Calocybe indica</i>	Oyetayo & Oyedeji (2017)
Колачи са додатком спрашене гљиве	Повећан садржај протеина, минерала, влакана и β -глюкана; побољшана антиоксидативност и смањен гликемијски индекс	<i>Calocybe indica</i>	Rathore et al. (2019)
Екструдирани браон пиринач са додатком спрашене гљиве	Снижен гликемијски индекс, побољшана антиоксидативна својства	<i>Auricularia auricula</i>	Vallée et al. (2017)
Екструдирани производи на бази житарица са додатком гљиве	Побољшана својства против замора након <i>in vivo</i> експеримента	<i>Cordyceps militaris</i>	Zhong et al. (2017)



Слика 2.9. Графички приказ утицаја нутријената пореклом из гљива на својства функционалних производа на бази меса и рибе (Das et al., 2021)

2.4.4.1. Примена гљива у производњи функционалних млечних производа

Интеракције конституената гљива и млека/млечних производа нису довољно испитане. Углавном се екстракти гљива или сушене гљиве додају у немлечне производе, као што су супе, месне прерађевине или читав низ пекарских или кондиторских производа (Ahmad & Singh, 2016; Brennan et al., 2013; Cerón-Guevara et al., 2020; Choe et al., 2018; Farzana & Mohajan, 2015; Oyetao & Oyedeji, 2017; Zhong et al., 2017). Ако се храна фортификује гљивама, углавном су избор истраживача били млечни производи, као што су јогурт, сир или кефир, тако да и овде постоји недостатак литературних података (Aljewicz et al., 2020; Cais-Sokolińska et al., 2018; Corrêa et al., 2018; Francisco et al., 2018; Hozova et al., 2004; Pappa et al., 2018; Ribeiro et al., 2015; Stojković et al., 2014; Vanegas-Azuero & Gutiérrez, 2018). На пример, Khider et al. (2017) су показали да сирни намаз са додатком гљиве *Pleurotus ostreatus* има повећан садржај протеина и минерала, као и побољшана антимикуробна својства. Екстракти гљива су погодни и за инкапсулацију, а као омотачи капсула могу се користити протеини пореклом из млека (Rudke et al., 2019; Shao et al., 2019). Радови који су најприближнији тематици ове дисертације тичу се формулисања дехидрисане супе на бази *Agaricus bisporus* и протеина сурутке (Singh et al., 2003), затим напитка обогаченог протеинима на бази полисахарида из *Tremella fuciformis* и изолата протеина сурутке (Hu et al., 2019), као и додатка екстракта *Agaricus blazei* у млеко обогачено ω -3 масним киселинама (Vital et al., 2017). У свим побројаним радовима рађено је на крављем млеку.

Обогаћивање козјег млека немлечним супстанцама до сада је урађено са медицинском биљком *Tinospora cordifolia* (Sharma et al., 2021), екстрактима семенки комине грожђа (Milinčić et al., 2021), поленом (Kostić et al., 2021), екстрактима медицинских биљака (Komes et al., 2017), пробиотицима/пребиотицима (Verruck et al., 2019), али не и гљивама, нити њиховим екстрактима и конституентима у било каквој форми.

У случају одсуства научних података везано за мешавине козјег млека и екстраката гљива, за праћење интеракција могу бити корисни радови где са протеинима млека реагују глукани пореклом из житарица (Sarantis et al., 2021; Zielke et al., 2018), затим глукани из бактерија млечне киселине (Diemer et al., 2012), или чак бактеријски егзополисахариди (Ayala-Hernandez et al., 2008). Ипак, у оваквим ситуацијама потребна је примена експерименталног дизајна, односно скрининга система у потрази за битним факторима који утичу на сложен систем, а затим и оптимизације мешавина козјег млека и екстраката гљива како би се као резултат добио функционални адитив најбољих перформанси.

2.5. Експериментални дизајн и оптимизација

Оптимизација се може дефинисати као побољшање перформанси система, процеса или производа како би се из њих остварила највећа корист (Bezerra et al., 2008). Оптимизација се најефикасније врши употребом експерименталног дизајна (*Design of Experiments – DoE*) који обухвата првобитно планирање експеримента које укључује одабир и контролисање најважнијих параметара, коришћење статистичких програма и извођење експеримената према утврђеном плану (Simić, 2018). Дизајн експеримента се често користи код проучавања индустријских процеса, где се утврђивањем веза које постоје између фактора и одговора оптимизују најбољи експериментални услови (Mazzara et al., 2021). Постоје независне варијабле или фактори, који утичу на зависне варијабле или одговоре система. Одговор система (y) је у функцији различитих фактора (x) са њиховим одговарајућим коефицијентима, уз додатак процењене грешке (ε):

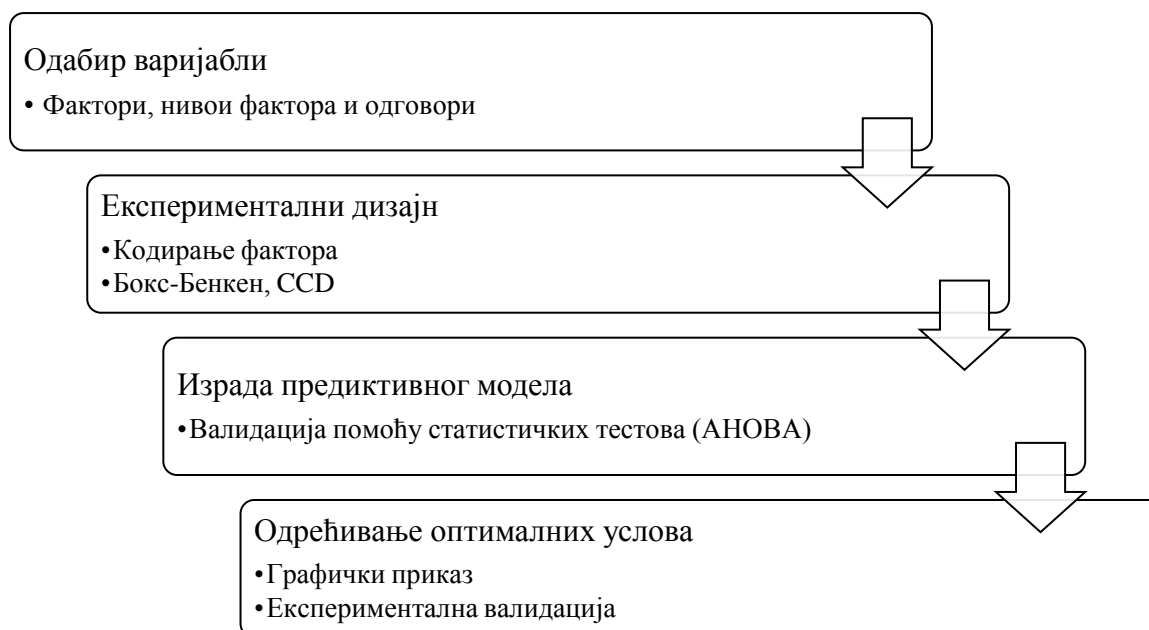
$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) + \varepsilon$$

До 1950-их година, експерименталне технике су се могле подвести под једнофакторске или једноваријабилне, где се један фактор прати, тј. мењају му се вредности, док се вредности других фактора држе константним, тзв. *one-factor-at-a-time* експерименти (Halim et al., 2020; Simić, 2018). Уколико се испитује утицај великог броја фактора, потребан је захтеван експериментални план са аспекта времена и средстава, а и овакав приступ не омогућава сагледавање интеракција између фактора, тј. свеукупни утицај фактора на посматрани одговор (Baş & Boyacı, 2007; Bruno Siewe et al., 2021; Simić, 2018). Реални проблеми који се јављају у индустријским условима захтевају приступ који обухвата више одговора одједном, пошто се од производа очекује више од једне оптималне карактеристике (Romano et al., 2004). Како би се превазишли овакви проблеми, развијене су мултиваријабилне (вишефакторске) статистичке методе, укључујући и методологију одговора (одзива) површина – RSM (*Response Surface Methodology*) (Madoumier et al., 2019). RSM је комбинација математичких и статистичких метода које се користе код моделовања и минимизовања проблема где на жељени одговор утичу разне варијабле, тј. омогућава стварање аналитичких модела који објашњавају како независне варијабле утичу на одговоре (Anuar et al., 2019; Mazzara et al., 2021; Tan et al., 2012). Ово подразумева развој и оптимизацију процеса, проналажење оптималних услова фактора за жељене одговоре, процену релативне значајности неколико повезаних фактора чак и у присуству сложених интеракција, уз

редукцију трошкова и времена извођења експеримента (Bruno Siewe et al., 2021; Speranza et al., 2015). Испитивање интеракција између варијабли може бити изузетно корисно како би се сазнало више о њиховим адитивним, синергистичким или антагонистичким ефектима на одговор система (Tirado Kulieva et al., 2021).

Централни композитни дизајн (CCD) је један од најефективнијих експерименталних дизајна за оптимизацију процеса (Mazzara et al., 2021). Иако има студија које одмах користе CCD, које нпр. одређују утицај параметара на формирање супстанци током пржења хране (Kalkan et al., 2021; Omid et al., 2021), детекцију акриламида (Kamankesh et al., 2021; Nematollahi et al., 2020), капацитет биосорпције (Lazli & Hellal, 2020), оптимизацију инкапсулације (Azhar et al., 2021), итд, углавном се као корак пре оптимизације користе „скрининг“ студије које имају за циљ да идентификују најрелевантније факторе (Halim et al., 2020). Потпуни факторијски дизајн се успешно користи за дизајн процеса са малим бројем фактора, где се може добити информација о ефекту сваког фактора, међутим, није одговарајући код процеса где фигурира велики број фактора (Halim et al., 2020). У оваквим случајевима се као први корак користи фракциони факторијски дизајн (FFD), где се помоћу мање проба, уз ефикасност и економичност добијају информације о ефектима пуно фактора (Halim et al., 2020; Mazzara et al., 2021; Nayik & Nanda, 2016). Дакле, студије оптимизације би требало да почну одређивањем потенцијалних фактора који утичу на систем из литературе и детаљног проучавања система (Çam & İcyer, 2015). Након овога, приступа се факторијском или фракционом факторијском дизајну како би се елиминисали фактори који нису значајни, а следећи корак, након одређивања значајних фактора и нивоа фактора могу бити Бокс-Бенкен, CCD, итд. како би се скупиле информације и оптимизовао одговор система (Çam & İcyer, 2015; Hodek et al., 2017). Ово може бити корисно у микробиологији и биотехнологији код идентификовања важних нутријената и интеракција између два или више нутријената у медијуму уз мањи број експеримената у односу на класичан приступ; затим се на основу резултата ФФД-а користи CCD како би се прецизније одредиле вредности значајних фактора (Jeong et al., 2008). Често се FFD, па CCD користе код оптимизације процеса екстракције и/или састава екстракта (Bruno Siewe et al., 2021; Çam & İcyer, 2015; Ghasemi et al., 2011; Hodek et al., 2017; Mazzara et al., 2021).

Примена RSM може се поделити на четири фазе (слика 2.10.) (Tirado Kulieva et al., 2021). Критичним кораком се сматра статистичка валидација модела. Овде је кључно познавање тематике како би опсег одабраних вредности параметара одговарао оптимизованим, што је предуслов успешне оптимизације (Tirado Kulieva et al., 2021). Да би се пронашао оптимални одговор система који се не може описати помоћу линеарне функције, користи се експериментални дизајн (Бокс-Бенкен, CCD и други) који примењује квадратне једначине (Bezerra et al., 2008). Како би се утврдило да ли одабрани статистички модел тачно приказује везу између варијабли, врши се анализа варијансе (ANOVA), која помоћу коефицијента корелације (R^2) процењује прецизност предиктивног модела (Corzo & Gomez, 2004). Код успешне оптимизације, коефицијент корелације не би требало да износи мање од 80%; што се вредност више приближава броју 1, модел је одговарајући, што је вредност нижа, модел не описује на одговарајући начин везу између варијабли (Nayik & Nanda, 2016). Након прављења дводимензионалних и тродимензионалних графика (површина), боље се опажају везе између улазних и излазних варијабли и одређују се оптимални услови, који не морају бити и максималне вредности (Tirado Kulieva et al., 2021).



Слика 2.10. Шематски приказ корака RSM (Tirado Kulieva et al., 2021)

Постоје и додатне технике којима се процењује прецизност. Квалитет неког производа или процеса који има пуно својстава је често неприхватљив ако само једно својство одступа од пожељних граница, па је због овога 1980. године развијено решење за оптимизацију више одговора, односно начин за проналажење услова који обједињују све критеријуме у један, најбољи компромисни одговор (Vera Candioti et al., 2014). Методологија која обухвата више критеријума и комбинује вредности појединачне пожељности како би се добила укупна пожељност назива се функција пожељности (Corzo & Gomez, 2004). Експериментално добијени и предвиђени одзиви се трансформишу у вредности од 0 (нежељени одзив) до 1 (жељени одзив) и комбинују у један, заједнички одзив (Simić, 2018). Осим једног, финалног оптимизованог решења, може се понудити више њих, а одабир финалног може зависити нпр. од сензорне анализе (Corzo & Gomez, 2004).

Не треба занемарити ни ограничења RSM када су у питању комплексни системи. Ово се може превазићи применом нелинеарних мултиваријационих регресионих алгоритама, као што су нпр. вештачке неуронске мреже (Madoumier et al., 2019; Tirado Kulieva et al., 2021). RSM се појавила као техника која је лако применљива у разним областима, као што су хемијска, фармацеутска, прехранбена индустрија, биолошке и медицинске науке, грађевинарство, итд. У науци о храни даје обећавајуће резултате, али је потребан помак како би се превазишли изазови који се тичу сложености и динамике прехранбених процеса и производа. Неке од области у науци о храни где је RSM успешно коришћена су: ензимске хидролизе, продукција метаболита, микроинкапсулација, формулација и побољшање својстава производа, паковање производа, термички третмани, осмотско сушење, примена хладне плазме, побољшање клијавости, екстракције компоненти од интереса, итд. (Madoumier et al., 2019; Tirado Kulieva et al., 2021).

3. Материјал и методе

3.1. Обезмашћивање узорака млека

Свеже козје млеко набављено је од фарме *Select milk* (Инђија, Србија). Одмах након набављања у део млека је додат натријум азид (NaN_3) у концентрацији 0,2 g/L ради микробиолошке безбедности. У један део млека NaN_3 није додат због експеримената где може утицати на резултате. Обезмашћивање је урађено према Pesic et al. (2011b). Млеко је темперирано на 30 °C у воденом купатилу 30 минута, а затим је центрифугирано при 3000 g и температури од 5 °C 30 минута. Одмах након завршетка центрифугирања, узорци су пребачени у ледено купатило 30 минута, након чега је липидна фракција уклоњена шпатулом. Обезмашћено млеко је одливано у нове посуде и остављено на 4°C до даље употребе.

3.2. Одређивање садржаја укупних протеина, казеина и серум протеина у млеку

Садржаји укупног азота (TN) и непротеинског азота (NPN) су одређени стандардним АОАС методама (АОАС, 1995; Pešić, 2011), док је неказеински азот (NCN) одређен исто као непротеински азот, али након уклањања казеина из млека изоелектричном преципитацијом на рН 4,2 (Pešić, 2011). Након овога, подаци за TN, NPN и NCN су убачени у изразе које су дали Anema & Stanley (1998) како би се добили садржаји укупних протеина (TP), казеина (CN_S) и серум протеина (WP_S) у анализираном млеку (Pešić, 2011):

$$\text{TP} = (\text{TN} - \text{NPN}) \times 6,38$$

$$\text{CN}_S = (\text{TN} - \text{NCN}) \times 6,38$$

$$\text{WP}_S = (\text{NCN} - \text{NPN}) \times 6,38$$

Просечан протеински састав млека које је коришћено је следећи (g/kg): TP 31,9; CN_S 25,3; WP_S 6,6.

3.3. Термички третман и фракционисање узорака млека

Део обезмашћеног млека је пребачен у водено купатило (*Grant, GA100*, Велика Британија), загрејан на 90 °C и након достизања ове температуре остављен да се инкубира 10 минута. Након загревања, млеко је охлађено на собну температуру кратким урањањем у ледено водено купатило (5 °C) на 30 секунди, а затим остављено преко ноћи у термостату на 20 °C (Pesic et al., 2012). Термички третман млека је урађен пре фракционисања како би се изазвало формирање комплекса између казеина и серум протеина.

Казеини термички третираног и нетретираног млека добијени су изоелектричном преципитацијом казеина на рН 4,2 коришћењем 1M раствора HCl. Издвојени талог казеина је одвојен од серум фазе млека центрифугирањем на 4000 g 20 минута. Казеин је затим растворен додатком milliQ воде, а рН му је подешен на 6,7 помоћу 1M раствора NaOH (Pešić, 2011; Pesic et al., 2012).

Спремљена су четири различита узорка – обезмашћено термички нетретирано млеко (**RM**), термички третирано обезмашћено млеко (**TRM**), казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (**CN**), казеини термички третираног обезмашћеног млека (**TCN**). Већи део узорака је лиофилизован и коришћен у експериментима након

реконституције, док су на течним узорцима извршена DLS мерења и припрема за електрофоретске анализе (разблаживање у одговарајућим пуферима).

3.4. Добијање екстраката гљива

У истраживањима је као полазни материјал коришћено спрашено плодносно тело *Agaricus blazei* Murrill и *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Осушени прах *A. blazei* је добијен од проф. Leo J.L.D. van Griensven (Универзитет у Вагенингену, Холандија). Осушени прах *L. sulphureus* добијен је лиофилизацијом, ситњењем и хомогенизацијом свежих плодносних тела сакупљених са локалитета у Србији (Petrović, 2018) која су идентификована и депонована у колекцији гљива Миколошке лабораторије, Одељења за физиологију биљака, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитета у Београду.

3.4.1. Добијање водених екстраката гљива

Водени екстракти су добијени према методи Vamanu & Nita (2013) са мањим изменама: 10 g осушеног праха макромизета је екстраховано са 200 mL milliQ воде у ултразвучном купатилу (*Bandelin sonorex*, Берлин, Немачка) на собној температури током 1,5 h. Након екстракције, екстракт је филтриран (*Whatman No. 4*), а чврсти остатак је екстрахован још два пута на описани начин. Екстракти су спојени, замрзнути, лиофилизовани (*LH Leybold, Lyovac GT2*, Франкендорф, Швајцарска) и чувани на 4 °C до употребе (Petrović, 2018). На овај начин добијени су водени екстракт *A. blazei* (VA) и водени екстракт *L. sulphureus* (VL).

3.4.2. Добијање полисахаридних екстраката гљива

Полисахаридни екстракти су изоловани према измењеној методи Song et al. (2008): 10 g осушеног праха макромизета је потопљено у 300 mL 96% етанола током 2 h на собној температури на магнетној мешалици, а затим је центрифугирано 20 минута на 1200 rpm. Први супернатант је бачен, а талог је растворен у 300 mL milliQ воде и остављен 20 минута на 4 °C. Суспензија је затим постављена у аутоклав на 120 °C 20 минута (*Raura*, Барселона, Шпанија). Суспензија је охлађена на леду, а након тога је центрифугирана на 8000 rpm 20 минута. За даљи поступак је коришћен бистри супернатант, коме су додате две запремине 96% етанола. Смеша је остављена преко ноћи на 4 °C на магнетној мешалици. Након инкубације, полисахариди су сакупљени преципитацијом (Роровић Минић et al., 2023). Другог дана смеша је центрифугирана на 5000 rpm 15 минута, а талог је растворен са 20 mL 0,02M трис (трис(хидроксиметил)аминометан) пуфера, рН 7,4. Преко ноћи је извршена дијализа у истом трис пуферу. Трећег дана смеша је центрифугирана на 8000 rpm 15 минута, а затим су супернатанту додате две запремине етанола за поновну преципитацију и све је стављено на 4 °C 30 минута. После центрифугирања на 8000 rpm 20 минута, талог је лиофилизован и чуван у фрижидеру до даље употребе. На овај начин добијени су полисахаридни екстракт *A. blazei* (PA) и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* (PL).

3.5. Припрема мешавина козјег млека и екстраката гљива

Леофилизовани прах екстраката гљива (VA, VL, PA, PL) је растворен у реконституисаним узорцима млека (RM, TRM, CN, TCN) тако да се постигне концентрација од 1 mg екстракта гљива по 1 mL узорка млека. Узорци RM и TRM су реконституисани као 10%, док су узорци CN и TCN реконституисани као 2%. Такође, екстракти гљива су растворени у milliQ води у концентрацији од 1 mg/mL ради поређења. Сви узорци су вортексовани и мешани 1 h на собној температури на механичкој мешалици (*Thys 2, MLW Labortechnik GmbH*, Зелбах, Немачка). Вредности рН су подешене на 6,75 (природна рН вредност млека) по потреби. Мерења ζ-

потенцијала и величине честица су вршена на свежим мешавинама. Део мешавина је чуван на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, а други део мешавина је лиофилизован и складиштен до даље употребе (Porović Minić et al., 2023).

Преглед назива и скраћеница узорака мешавина:

- обезмашћено термички нетретирано млеко и водени екстракт *A.blazei* **RMVA**
- термички третирано обезмашћено млеко и водени екстракт *A.blazei* **TRMVA**
- казеини обезмашћеног термички нетретираног млека и водени екстракт *A.blazei* **CNVA**
- казеини термички третираног обезмашћеног млека и водени екстракт *A.blazei* **TCNVA**
- обезмашћено термички нетретирано млеко и водени екстракт *L. sulphureus* **RMVL**
- термички третирано обезмашћено млеко и водени екстракт *L. sulphureus* **TRMVL**
- казеини обезмашћеног термички нетретираног млека и водени екстракт *L. sulphureus* **CNVL**
- казеини термички третираног обезмашћеног млека и водени екстракт *L. sulphureus* **TCNVL**
- обезмашћено термички нетретирано млеко и полисахаридни екстракт *A.blazei* **RMPA**
- термички третирано обезмашћено млеко и полисахаридни екстракт *A.blazei* **TRMPA**
- казеини обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридни екстракт *A.blazei* **CNPA**
- казеини термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридни екстракт *A.blazei* **TCNPA**
- обезмашћено термички нетретирано млеко и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* **RMPL**
- термички третирано обезмашћено млеко и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* **TRMPL**
- казеини обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* **CNPL**
- казеини термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридни екстракт *L. sulphureus* **TCNPL**

3.6. Одређивање садржаја протеина

Садржај протеина у узорцима је одређен методом по Брадфорду (Bradford, 1976). Брадфордов реагенс (5 mL) је додат разблаженим узорцима (100 μL), након вортексовања узорци су инкубирани на собној температури 20 минута, а затим је прочитана апсорбација на 595 nm (*UV-1800, Shimadzu USA Manufacturing Inc, UR, САД*). Садржај протеина је изражен у g/100 g узорка на основу калибрационе криве конструисане помоћу албумина говеђег серума – BSA.

3.7. Одређивање садржаја глукана

Садржај β -глукана је одређен спектрофотометријски помоћу Мегазим ензимског кита (*Megazyme, Бреј, округ Виклоу, Ирска*), према упутствима произвођача и према Zrnić-Cirić et al. (2020). Овом методом одређује се садржај α - и укупних глукана. Садржај β -глукана је добијен индиректно из разлике укупних и α -глукана. Глукани су

хидролизоване до глукозе коришћењем мешавине ензима α -1,3- β -глуконазе и α -глукозидазе. Након овога, α -глюкани су посебно одређени коришћењем амилоглукозидазе, амилазе и *GOPOD* реагенса (*glucose-oxidase-peroxidase determination*). Сва мерења су вршена на 510 nm, а резултати су изражени као α -глюканске фракције на 100 g узорка (Zrnić-Cirić et al., 2020).

3.8. Анализа фенолних једињења - ултраефикасна течна хроматографија са месеном спектрометријом (UHPLC-DAD MS/MS)

Раздвајање и квантификација фенолних једињења од интереса су изведени помоћу *Dionex Ultimate 3000* UHPLC система опремљеног са DAD (*diode array detector*) и *TSQ Quantum Access Max triple-quadrupole* масеним спектрометром са троструким квадрупол анализатором (*ThermoFisher Scientific*, Базел, Швајцарска) према методи из Gašić et al. (2015) и условима из Pešić et al. (2019) и Milinčić (2023). Раздвајање је изведено на *Synchronis C18* колони (100×2,1 mm, величина пора 1,7 μ m) на 40 °C. Састав мобилне фазе био је следећи: 0,1% водени раствор мравље киселине (А) и 100% ацетонитрил (MS чистоће) (В), а реагенси су примењени у следећој градијент концентрацији: 5% В, 2,0 min; 5–95% В, 2,0–14,0 min; 95-5% В, 14,0–14,2 min; 5% В до 20 min. Брзина протока мобилне фазе била је 0,3 mL/min. Детекционе таласне дужине биле су 254 nm и 280 nm. Инјектована запремина узорка је била 5 μ L. Масени спектрометар је опремљен електроспреј јонским извором (HESI) и има подешене параметре: температура испаривача 200 °C, напон спреја 5 kV, притисак N₂ 40 AU, притисак јонског гаса 1 AU, притисак помоћног гаса 8 AU, капиларна температура 300 °C. Масени спектрометар је снимао масе у негативном моду, у *m/z* опсегу 100 – 1000. За квалитативну анализу циљаних фенолних једињења коришћени су вишеструки масено спектроскопски модуси скенирања као што су потпуно скенирање (FS) и скенирање продукт јона (PIS). Колизионоиндукована фрагментација је изведена коришћењем аргона као колизионог гаса, док је енергија судара варијала у зависности од једињења. Квантитативна анализа је изведена тако што је за сваки стандард снимљен молекулски јон и два карактеристична MS² фрагмента, који су претходно дефинисани као доминантни у PIS експериментима (Milinčić, 2023). Контрола инструмента је извршена помоћу *Xcalibur* софтвера (верзија 2.2). Фенолна једињења су идентификована поређењем са комерцијално доступним стандардима (Milinčić et al., 2021; Pešić et al., 2019). Као стандардна једињења коришћени су: ескулетин (*aesculetin*), кофеинска киселина (*caffeic acid*), галокатехол (*galocatechin*), сиригинска киселина (*syringic acid*), хлорогена киселина (*chlorogenic acid*), рутин (*rutin*), изокверцетин (*isoquercetin*), астрагалин (*astragalín*), квицитрин (*quercitrin*), апигетрин (*apigetrin*), кверцетин (*quercetin*), нарингенин (*naringenin*) и кемпферол (*kaempferol*). Садржај сваког фенолног једињења је израчунат интеграцијом површине пикова и изражен у mg/L.

Узорци екстраката гљива (VA, PA, VL, PL) су припремљени тако што је одмерено по 50 mg узорка и растворено у 1 mL milliQ воде, док су спрашени узорци гљива спремљени на следећи начин: одмерено је по 400 mg узорка спрашених гљива *A.blazei* и *L. sulphureus*, означени су са А и L, респективно, додато је 4 mL 80% метанола закишељеног са 0,1% HCl, остављени су 1 h на механичкој мешалици, након тога су центрифугирани при 7000 g 5 минута, а супернатант је скупљен и даље анализиран. Сви узорци су профилирани кроз 0,45 μ m филтер пре анализа.

3.9. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица

DLS мерења (*Dynamic Light Scattering* – динамичко расејање светлости) мешавина за прелиминарна истраживања су извршена помоћу уређаја *Horiba NanoPartica SZ-100* (*Horiba*, Јапан). За разблаживање је коришћена milliQ вода. Мешавине са RM и TRM су разблажене 100 пута, док су мешавине са CN и TCN разблажене 20 пута. Мерења су спроведена на 25 °C у полидисперзном моду. За сваки узорак су урађена минимално по три понављања (Porović Minić et al., 2023).

3.10. Електрофоретске анализе

За анализу протеинских профила млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива коришћене су електрофоретске технике: нативна полиакриламидна гел електрофореза (Native PAGE), SDS (*Sodium dodecyl sulfate* - натријум додецил сулфат) полиакриламидна гел електрофореза у редукујућим (SDS-R-PAGE) и нередукујућим условима (SDS-NR-PAGE) према Pesic et al. (2012).

3.10.1. Припрема пуфера за узорке, узорака и стандарда за анализу

Различити пуфери за узорке су припремљени за сваку електрофоретску методу као код Pešić (2011). Састав пуфера је био следећи:

- Native PAGE: 0,03 M трис-HCl (pH 8), 10% глицерин, 0,0025% бромфенолплаво;
- SDS-R-PAGE: 0,055 M трис-HCl (pH 6,8); 2% SDS, 7% глицерин, 5% β -меркаптоетанол, 0,0025% бромфенолплаво;
- SDS-NR-PAGE: 0,055 M трис-HCl (pH 6,8); 2% SDS, 7% глицерин, 0,0025% бромфенолплаво.

Узорци су разблажени одговарајућим пуфером за коришћену методу у различитим односима. Узорци RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима гљива су разблажене одговарајућим пуферима у односу 1:9, док су CN, TCN и њихове мешавине са екстрактима гљива разблажене у односу 1:5. Чисти водени екстракти гљива (узорци VA и VL) у milliQ води су разблажени у односу 1:1. Протеински стандард су чинили чисти протеини крављег млека (α_1 -CN, β -CN, κ -CN, BSA, α -LA, β -LG) купљени од компаније *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Штајнхајм, Немачка). Као стандард молекулских маса коришћен је LMW-SDS Marker Kit Standard (*Amersham Biosciences*, Упсала, Шведска), који се састоји од фосфорилазе Б (94000), албумина говеђег серума (66000), овоалбумина (45000), карбонске анхидразе (30000), трипсин инхибитора (20100) и α -LA (14400) (Pešić, 2011; Pesic et al., 2012).

3.10.2. Нативна полиакриламидна гел електрофореза (Native PAGE)

Native PAGE је изведена према Pešić (2011) и Davis (1964). Направљен је трис-глицински електродни пуфер (0,025 M трис (pH 8,3); 0,19 M глицин), као и гелови за раздвајање (7%; pH 8,9) и концентрисање (5%; pH 6,7). Електрофорезе су базиране на принципу анодног дисконтинуалног система, а изведене су на уређају (*LKB*, Шведска) који се састоји од вертикалне електрофоретске јединице (*LKB 2001-001*), расхладне јединице (*Multitemp II*) и извора напона (*Makro Drive*), док су за прављење гелова коришћене плоче димензија 14,5 x 16,5 x 1,5 mm.

Узорци одговарајућег разблажења су наносени на гел (25 μ L), а након извођења електрофореза гелови су бојени 45 минута раствором за бојење (0,23% *Coomassie[®] brilliant blue* боја R250, 3,9% ТСА (трихлорсирћетна киселина), 6% сирћетна киселина, 17% метанол), затим су одбојени (18% етанол, 8% сирћетна киселина). Током бојења и одбојавања вршено је константно мешање. Након овога, гелови су скенирани и анализирани коришћењем *SigmaGel* програма, верзија 1.1

(*Jandel Scientific*, Сан Рафаел, Калифорнија, САД) (Pešić, 2011; Pesic et al., 2011a, 2011b, 2012).

3.10.3. SDS полиакриламидна гел електрофореза у редукујућим (SDS-R-PAGE) и нередукуюћим условима (SDS-NR-PAGE)

Ове анализе су изведене према Pešić (2011) и Fling & Gregerson (1986). Коришћени су трис-глицински електродни пуфер (0,05 М трис (pH 8,5), 0,19 М глицин, 0,1% SDS, као и гелови за раздвајање (12,5%; pH 8,85) и концентрисање (5%; pH 6,8). Коришћен је исти уређај као за Native PAGE, исти кораци бојења, одбојавања, скенирања и анализе података (Pešić, 2011; Pesic et al., 2011a, 2011b, 2012).

3.11. FTIR спектроскопија

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) спектри су снимљени помоћу спектрометра *Nicolet™ iS™ 10 FTIR Spectrometer (Thermo Fisher Scientific)* опремљеног са *Smart iTR™ Attenuated Total Reflectance (ATR) Sampling Accessory* у опсегу 500–4000 cm^{-1} са 32 скенирања по спектру (Popović Minić et al., 2023).

3.12. Скенирајућа електронска микроскопија (SEM)

Морфологија лиофилизованих мешавина је испитивана на скенирајућем електронском микроскопу *JEOL JSM-6390LV (JEOL, Токио, Јапан)* уз претходно напаравање узорак златом помоћу уређаја *Sputter Coater BAL-TEC SCD 005 (Scotia, Њујорк, САД)* у трајању од 100 секунди при јачини струје од 30 mA. SEM уређај је радио при 15kV и 20 kV са увеличањем од 150X и 600X (Popović Minić et al., 2023).

3.13. Експериментални дизајн

Експериментални дизајн је примењен у наставку дисертације како би се на систематичан начин пронашли оптимални услови припреме адитива, а осим тога и да се уоче интеракције између различитих фактора. У првој фази експеримента је коришћен фракциони факторијски дизајн (FFD) који се најчешће користи у почетним фазама истраживања, када је од пуно фактора потребно одабрати оне који највише утичу на одговор система. На основу закључака из FFD мешавине су оптимизоване помоћу централног композитног дизајна (CCD), дела методологије одговора површина (RSM) (Sredović Ignjatović, 2015), док је процентуални удео конституената дефинисан применом функције пожељности. Правац оптимизације, тј. одлука о коришћењу одговарајућих методологија зависи од резултата скрининга, па је објашњена у дискусији након презентованих резултата FFD.

3.13.1. Припрема мешавина

За експериментални дизајн коришћено је термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM) и водени екстракти гљива (VA, VL), тј. у овој фази дисертације настављено је са узорцима који су одабрани на основу најбољих карактеристика са аспекта међусобних интеракција и могуће примене у индустрији. Леофилизовани прах водених екстраката гљива (VA, VL) је растворен у реконституисаном термички третираном обезмашћеном млеку (TRM) тако да се постигну задате концентрације из табеле 4.4. Сви узорци су вортексовани и мешани током задатог времена на одговарајућој температури на механичкој мешалици. Вредности pH су подешене по потреби. Поново је додат натријум азид у концентрацији 0,2 g/L ради микробиолошке безбедности. Мерења антиоксидативног потенцијала и техно-функционалних својстава су вршена у року од неколико дана.

3.13.2. Фракциони факторијски дизајн (FFD)

Помоћу фракционог факторијског дизајна испитиван је утицај пет фактора (независно променљиве) на три антиоксидативна својства (одговори; зависно променљиве) заснована на различитим механизмима. За сваки фактор изабрана су три нивоа: минимални (-1), централни (0) и максимални (+1) (табела 3.1.). Осим концентрација конституената, као фактори су одабрани температура и рН вредност, јер битно утичу на својства казеинске мицеле и могућност формирања интеракција између конституената, као и време мешања, како би се утврдило колико времена је потребно за успостављање потенцијалних интеракција (Moeller et al., 2017; Pan et al., 2014; Pessato et al., 2018; Ye et al., 2013). Као нивои параметра концентрације термички третираног козјег млека одабрани су 2% раствори, што одговара просечном садржају казеина у млеку и 10% раствори, што одговара просечном садржају суве материје у обезмашћеном козјем млеку. Из литературе и искуствених података, као нивои параметара концентрације водених екстраката гљива одабрани су 0,1%, 0,5% и 0,9%. Наиме, обогаћивање млека различитим супстанцама углавном се врши тако што се млеку додају у ниским процентуалним уделима ($\approx 0,1 - 1,2\%$) (Ghasemi & Abbasi, 2014; Thongkaew et al., 2014). Једина студија која се бави мешањем једињења гљива са једињењима млека додаје 0,4% фунгалних полисахарида у раствор серум протеина (Hu et al., 2019). Код већине студија које се баве интеракцијама једињења млека са другим супстанцама експериментални услови подразумевају рН вредност 6,70 – 6,80, што је природна рН вредност млека (Gallo et al., 2013; Sáiz-Abajo et al., 2013; Semo et al., 2007; Ye et al., 2013; Zimet et al., 2011). Узимајући у обзир да је доња граница коагулације на рН вредности $\approx 5,5$, у експерименталном дизајну одабран је опсег 5,5 – 6,8. На температурама 2 – 6 °C хидрофобне интеракције слабе и утичу на миграцију β -казеина (Moeller et al., 2017), па су у овој дисертацији као нивои температура искоришћени 5 °C као минимум и максимална температура од 25 °C, тј. амбијентална температура, како би се установило имају ли утицаја на испитивана антиоксидативна својства и да ли су битни због интеракције са другим факторима, нпр. рН вредношћу. Како би се установило колико је оптимално времена потребно да би се оствариле интеракције између компонената, изабран је опсег времена мешања од 5 до 65 минута.

Табела 3.1. Шема експерименталних фактора и њихових нивоа код FFD

Испитивани фактори (независне променљиве)	Ниво		
	Минимални (-1)	Централни (0)	Максимални (+1)
A – Концентрација екстраката гљива (w(ME),%)	0,1	0,5	0,9
B – Концентрација термички третираног млека (w(MPP),%)	2	6	10
C – Температура мешања (°C)	5	15	25
D – Време мешања (min)	5	35	65
E – рН мешавина	5,50	6,15	6,80

Фракциони факторијски дизајн је садржао по 27 експеримената за сваку гљиву, тј. по истој шеми је направљено 27 мешавина TRM са VA (означене према броју експеримента и гљиви *A. blazei* са 1A, 2A, 3A, итд.) и 27 мешавина TRM са VL (означене према броју експеримента и гљиви *L. sulphureus* са 1L, 2L, 3L, итд.). Матрица са експерименталним условима добијена је помоћу статистичког софтвера *MINITAB* (*NIST*, Мериленд, САД). Као одговори, тј. зависно променљиве одабране су три различите антиоксидативне методе (поглавље 3.14.).

3.14. Одређивање антиоксидативних својстава

Антиоксидативна својства су анализирана на основу три антиоксидативне методе засноване на различитим механизмима:

3.14.1. Укупан антиоксидативни капацитет (ABTS тест)

Одређивање укупног антиоксидативног капацитета ABTS методом (*ABTS radical scavenging activity assay*), у литератури названо и као способност сакупљања ABTS радикала, урађено је према раније публикованој методи (Arnao et al., 2001). Направљен је основни раствор ABTS^{•+} (7 mM водени раствор ABTS (2,2-азино-бис/3-етил-бензотиазолин-6-сулфонска киселина) са 2,45 mM калијум-персулфата (K₂S₂O₈)) и остављен на собној температури 12-16 h у мраку како би супстанце изреаговале. Радни раствор ABTS^{•+} је припремљен тако што је основни раствор разблажен метанолом тако да се добије апсорбанција између 0,700 и 0,800 на 734 nm. Након овога, 50 µL узорка је помешано са 1 mL радног раствора ABTS^{•+} и након 7 минута очитана је апсорбанција на 734 nm. Способност сакупљања (неутралисања) ABTS^{•+} (%) за стандардну криву и узорке је прерачуната на следећи начин:

$$\text{Способност сакупљања (неутралисања) ABTS}^{\bullet+} (\%) = (\text{Апсорбанција контроле-Апсорбанција стандарда или узорка}) / \text{Апсорбанција контроле} \times 100.$$

Резултати су изражени као еквиваленти тролокса (6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) у mg по mL узорка (mg Trolox/mL) (Pešić et al., 2019).

3.14.2. Способност хелирања јона Fe²⁺ (FCC тест)

Капацитет хелирања јона гвожђа (*Ferrous-ion-chelating capacity assay – FCC*) је одређен према Stanisavljević et al. (2015). 200 µL узорка одговарајућег разблажења помешано је са 740 µL milliQ воде и 20 µL 2 mM FeSO₄. Раствор је остављен 30 минута на собној температури, додато је 200 µL 5 mM ферозина и након 10 минута апсорбанција реакционе смеше је очитавана на 562 nm. Капацитет хелирања јона гвожђа је одређен на основу једначине:

$$\text{Капацитет хелирања } (\%) = [1 - \text{Апсорбанција узорка} / \text{Апсорбанција контроле}] \times 100.$$

Резултати су изражени као mg еквивалената EDTA (етилендиаминтетрасирћетна киселина) по mL узорка (mg EDTA/mL) (Milinčić et al., 2021; Pešić et al., 2019).

3.14.3. Способност редукције јона Fe³⁺ (редукујућа моћ; FRP тест)

Метода заснована на редукцији јона гвожђа, или редукујућа моћ узорка (*Ferric reducing power assay – FRP*) је одрађена према Medouni-Adrar et al. (2015). Укратко, у 250 µL разблаженог узорка додато је 250 µL 0,2M фосфатног пуфера (pH 6,6) и 250 µL 1% раствора калијум ферицијанида. Раствор је инкубиран на 50 °C 20 минута, након тога је додато 250 µL 10% ТСА (*trichloroacetic acid* – трихлоросирћетна киселина) и смеша је центрифугирана 5 минута при 7000 g. После центрифугирања, 500 µL супернатанта помешано је са 500 µL дестиловане воде и 100 µL 0,1% раствора FeCl₃.

Након 10 минута очитана је апсорбанција на 700 nm. Резултати су изражени као μg еквивалената аскорбинске киселине (AA) по mL узорка (μg AA/mL) (Pešić et al., 2019).

3.14.4. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет (садржај укупних фенолних једињења; ТРС)

Ова метода је дуго коришћена за одређивање укупних фенолних једињења, међутим, реагенс поред фенолних једињења реагује са преко педесет супстанци или класа једињења (Gülçin, 2012). Због овога је предложено да се користи за утврђивање укупног антиоксидативног редукујућег капацитета ако се супстанце које ометају утврђивање фенолних једињења не узимају у обзир нити одстрањују (Gülçin, 2012). Дакле, укупни антиоксидативни редукујући капацитет (познат и као ТРС – *Total Phenolic Content*) је одређен коришћењем Фолин-Чиколтеовог реагенса (*Folin-Ciocalteu's reagent*) према Pešić et al. (2019). Укратко, 70 μL узорка је помешано са 300 μL Фолин-Чиколтеовог реагенса и остављено 5 минута на собној температури. Након овога, додато је 230 μL 7,5% Na_2CO_3 , смеша је остављена 90 минута на собној температури у мраку, а затим су апсорбанције читане на 765 nm. Резултати су изражени као g еквивалената галне киселине на 100 g узорка (*g of gallic acid equivalents per 100 g of sample* – g GAE/100 g).

3.15. Одређивање техно-функционалних својстава

3.15.1. Одређивање пенивих својстава

Пенива својства одређена су према методи приказаној у Barac et al. (2010) уз модификацију (Pešić, 2011). Одмерено је 30 mL (V_0) 0,1% раствора узорка и сипано у градуисану колону. При протоку од 6 dm^3/min у раствор је увођен ваздух кроз дегазер постављен на дну колоне у трајању од 1 минута. Одмах након удубавања ваздуха у раствор, очитана је запремина до које се подигла пена у колони (V_1). Затим је поново очитан ниво пене након 3 минута (V_3).

Капацитет пене (FC; *Foaming Capacity*) је израчунат према следећем обрасцу:

$$FC(\%) = \frac{V_1 - V_0}{V_0} \times 100$$

а стабилност пене (FS; *Foam Stability*) је израчуната према обрасцу:

$$FS(\%) = \frac{V_3 - V_0}{V_0} \times 100$$

3.15.2. Одређивање емулгујућих својстава

Емулгујућа својства су одређена применом турбидиметријске методе (Pearce & Kinsella, 1978). Емулзије су припремане тако што је 15 mL сунцокретовог уља помешано са 45 mL 0,1% раствора узорка (pH 6,7) и хомогенизовано (*Ultraturex*) при највећој брзини у трајању од 1 минута. Са дна посуде у којој се налази емулзија одмерено је 100 μL емулзије и додато по 50 μL у две епрувете у којима се налазило 5 mL 0,1% раствора SDS. Након тога, садржај епрувете промешан је на вортексу, па је апсорбанција раствора очитавана на 500 nm (A_0). Након истека 10 минута од момента формирања емулзије поступак је поновљен (A_{10}).

Индекс стабилности емулзије (ESI) израчунат је према обрасцу:

$$ESI(min) = A_0 \times \frac{\Delta t}{\Delta A}$$

при чему је:

Δt , временски интервал између два мерења апсорбанције (10 минута); ΔA , разлика између вредности апсорбанција у моменту формирања емулзије и након 10 минута ($A_0 - A_{10}$).

Индекс активности емулзије (EAI) израчунат је према следећем обрасцу:

$$EAI(m^2/g) = 2T \frac{A_0 \times F}{C \times \phi \times 10000}$$

при чему је:

$T = 2,303$; F – фактор разблажења (100); C – концентрација протеина млека изражена као маса протеина млека по јединици запремине раствора (g/mL); $\phi = 0,25$ (Pešić, 2011).

3.16. Одређивање антимицробне активности

Антимицробна активност је одређена применом микродилуционе методе на по 6 патогених бактерија и микромицета. Коришћене су следеће Грам (+) бактерије: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (изолат из хране) и *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), као и Грам (-) бактерије: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030) и *Salmonella Typhimurium* (ATCC 13311). Тестиране су и следеће микромицете: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 9197), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (изолат из хране), *Trichoderma viride* (IAM 5061). Културе свих микроорганизама су депоноване у лабораторијској колекцији Миколошке лабораторије, Одељења за физиологију биљака, Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду. Минималне инхибиторне (MIC - *minimum inhibitory concentrations*), минималне бактерицидне (MBC - *minimum bactericidal concentrations*) и минималне фунгицидне концентрације (MFC - *minimum fungicidal concentrations*) су добијене према литератури (Espinel-Ingroff, 2001; Hänel & Raether, 1988; Petrović et al., 2013; Petrović, 2018). Ради бољег тумачења резултата, упоредо са узорцима анализирани су и често коришћени конзерванси као контроле – E211 (натријум бензоат) и E224 (калијум метабисулфит).

3.17. Симулирана *in vitro* гастроинтестинална дигестија

Симулирана *in vitro* гастроинтестинална дигестија (ГИД) је изведена према протоколу из Minekus et al. (2014) на узорцима термички третираног козјег млека, водених екстраката гљива и њихових оптимизованих мешавина у трипликатима. Одмерено је по 2 g оптимизованих мешавина, док су остали узорци одмерени у оним количинама које одговарају њиховој процентуалној заступљености у оптимизованим мешавинама. Узорци су реконституисани са 3 g дестиловане воде, а онда подвргнути ГИД према протоколу. Припремљене су и контроле дигестија узорака, тј. недигестовани узорци, како би се утврдио утицај дигестивног коктела на мерене параметре у почетном тренутку дигестије (zero-time). Ови узорци су реконституисани и одмах помешани са свим ензимима и растворима потребним за извођење симулиране ГИД и дигестија је одмах заустављена додатком Refabloc® инхибитора у концентрацији 5 mM (у смеши финално) и 0,1 mL ВВ1 (Bowman–Birk) протеиназног инхибитора концентрације 0,05 g/L. Осим ових узорака, припремљена је и контрола дигестивног коктела како би се одредио само његов утицај на вредности мерених параметара на крају дигестије. За

контролу, 5 g дестиловане воде уместо узорка је подвргнуто комплетном протоколу ГИД. Орална фаза дигестије започета је додавањем 3,5 mL симулираног пљувачног сока (*simulated salivary fluid* - SSF): 0,5 mL раствора пљувачне α -амилазе (1500 U/mL), 25 μ L 0,3 M CaCl_2 и 975 μ L воде; након овога болус је интензивно мућкан и инкубиран 2 минута на 37 °C (pH 7,0). Уследила је гастрична фаза дигестије где је целокупна запремина оралног болуса (око 10 mL) помешана са 7,5 mL симулираног гастричног сока (*simulated gastric fluid* - SGF): 1,6 mL раствора пепсина (25000 U/mL) припремљеног у SGF и 5 μ L 0,3 M CaCl_2 , а pH вредност је подешена на 3,0 коришћењем 1 M HCl. Запремина смеше је додавањем дестиловане воде подешена на 20 mL и инкубирана 2 h на 37 °C уз интензивно мешање при 300 o/min (*Lab-Shaker SMX 1300, Adolf Kühner*, Базел, Швајцарска). Током интестиналне (завршне) фазе дигестије 20 mL добијеног гастричног химуса помешано је са 11 mL симулираног интестиналног сока (*simulated intestinal fluid* - SIF): 5 mL раствора панкреатина (800 U/mL, активност трипсина) припремљеног у SIF, 2,5 mL 160 mM раствора жучних соли и 40 μ L 0,3 M CaCl_2 . pH вредност је подешена на 7,0 коришћењем 1 M NaOH. Како би се постигла финална запремина, смеша је допуњена до 40 mL дестилованом водом и инкубирана 2 h на 37 °C, уз интензивно мешање при 300 o/min.

После завршених дигестија додати су Refabloc® и ВВI инхибитори у претходно наведеним концентрацијама, а затим су сви узорци центрифугирани на 4500 g (*Centrifuge 5804R, Eppendorf*, Хамбург, Немачка) 10 минута на 4 °C, одливени су супернатанти, запремина им је прецизно измерена и одмах су замрзнути у течном азоту и чувани на -80 °C (Kostić et al., 2021; Milinčić, 2023; Milinčić et al., 2022). Састав основних раствора и симулираних дигестивних сокова приказан је у табели 3.2 (Kostić et al., 2021; Milinčić, 2023; Milinčić et al., 2022). Спремљено је 13 узорака – узорци који су подвргнути симулираној *in vitro* ГИД (укупно 6 узорака), узорци којима су додати дигестивни коктели, али нису подвргнути симулацији дигестије (укупно 6 узорака) и контрола која садржи само дигестивни коктел (један узорак). Сви узорци су подвргнути даљим спектрофотометријским анализама (Kostić et al., 2021; Pešić et al., 2019).

Табела 3.2. Састав основних раствора и симулираних дигестивних сокова (Milinčić, 2023)

Компоненте	Концентрације основних раствора		SSF	SGF	SIF
			pH 7,0	pH 3,0	pH 7,0
	g/L	mol/L	Концентрација у SSF mmol/L	Концентрација у SGF mmol/L	Концентрација у SIF mmol/L
KCl	37,3	0,5	15,1	6,9	6,8
KH_2PO_4	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO_3	84	1	13,6	25	85
NaCl	117	2	/	47,2	38,4
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	30,5	0,15	0,15	0,1	0,33
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	48	0,5	0,06	0,5	/
NaOH	/	1	/	/	8,4
HCl	/	6	1,1	15,6	/
* $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	44,1	0,3	0,75*	0,075*	0,3*

Скраћенице: SSF – симулиран пљувачни сок (*simulated salivary fluid*); SGF – симулиран гастрични сок (*simulated gastric fluid*); SIF – симулиран интестинални сок (*simulated intestinal fluid*). Сви симулирани сокови су припремљени 1,25 пута концентрованији. *Концентрације у колонама се односе на финалну дигестивну смешу; $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ је додат одвојено.

3.18. Убацавање оптимизованог адитива у дехидрисане супе – модел

Ради испитивања својстава оптимизованих адитива у склопу прехранбеног производа, као и ради финализације истраживања, оптимизоване мешавине са гљивама *A. blazei* и *L. sulphureus* су убачене у модел – дехидрисане супе (Pravilnik o Kvalitetu Supa, Sosova, Dodataka Jelima i Srodnih Proizvoda, Službeni list SRJ, 41/93 i Službeni list SCG, 56/2003 i 4/2004). Састојци су били следећи: бели лук у праху (Премија, Макси, Србија); црни лук у праху (Премија, Макси, Србија), бибер (Зачин Ц, Нестле, Србија), со (Солана Тузла, БиХ), палмино уље (*AlekPharm*, Србија), скроб (*Dr. Oetker*, Србија). Састав дехидрисаних супа био је следећи:

S1 – 30% скроба, 12,25% белог лука у праху, 12,25% црног лука у праху, 10,5% бибера, 11,9% соли, 17,5% термички третираног обезмашћеног козјег млека, 5,6% палминог уља;

S2 – 30% скроба, 12,25% белог лука у праху, 12,25% црног лука у праху, 10,5% бибера, 11,9% соли, 17,5% оптимизоване мешавине термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*, 5,6% палминог уља;

S3 – 30% скроба, 12,25% белог лука у праху, 12,25% црног лука у праху, 10,5% бибера, 11,9% соли, 17,5% оптимизоване мешавине термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*, 5,6% палминог уља.

Упоредо са овим узорцима, испитивана су и својства комерцијалних дехидрисаних супа (Quik e-free инстант супа од поврћа без масти, Алева, Србија) без и са додатим оптимизованим адитивима:

S4 – дехидрисана супа без додатака;

S5 – дехидрисана супа са 17,5% оптимизоване мешавине термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*;

S6 – дехидрисана супа са 17,5% оптимизоване мешавине термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.

Састав комерцијалне инстант супе, према декларацији, био је следећи: малтодекстрин, кухињска со 18%, сушено поврће до 14% (шаргарепа, црни лук, пашканат, парадајз, празилук, целер), модификовани кукурузни скроб, декстроза, појачивачи ароме: мононатријум-глутаминат 5,5%, динатријум 5'-рибонуклеотиди, хидролизоване беланчевине соје, екстракт квасца, зачини, соја сос, екстракт поврћа, шећер, уље уљане репице, ароме. Енергетска вредност: 90 kJ (21,5 kcal) на 10 g производа; просечна нутритивна вредност: протеини 0,65 g/10 g; угљени хидрати 5,4 g/10 g; масти 0,022 g/10 g.

Састојци у чврстом стању су помешани у датим уделима за супе S1 – S3, док је код комерцијалних супа садржај из кесице анализиран без додатака (узорак S4) или са додатим оптимизованим адитивима у датим уделима (узорци S5 и S6). Узорци су растворени у води у односу 1:20, а затим су подвргнути кувању на 95 °C током 5 минута према Sugumar & Guha (2020). Узорци су охлађени на собну температуру, центрифугирани на 3000 g и бистри супернатан је коришћен у даљим спектрофотометријским анализама.

3.19. Обрада података

Мерења садржаја протеина, фенолних једињења и глукана су изведена у три понављања и резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација. Значајност разлика између средњих вредности садржаја глукана утврђени су помоћу Tukey-евог теста ($p < 0,05$) (StatSoft Co, Тулса, Оклахома, САД).

DLS мерења мешавина са *A. blazei* су изведена у не мање од три понављања и резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација. Значајност разлика између средњих вредности је утврђена помоћу Tukey-евог теста ($p < 0,05$) за узорке козјег млека и помоћу t-теста ($p < 0,05$) за узорке казеина (StatSoft Co., Tulsa, OK, USA). DLS мерења мешавина са *L. sulphureus* су изведена у не мање од три понављања и резултати су представљени као средње вредности или модус \pm стандардна девијација, зависно од узорка. Значајност разлика је утврђена помоћу Tukey-евог теста ($p < 0,05$) (StatSoft Co, Тулса, Оклахома, САД). За одређене узорке су табеларно приказани резултати мерења средњег и најчешћег дијаметра уз PI вредности.

Подаци везани за полипептидни састав су узети као трипликати и представљени као средње вредности \pm стандардна девијација. Значајност разлика између средњих вредности је утврђена помоћу Tukey-евог теста ($p < 0,05$) (StatSoft Co, Тулса, Оклахома, САД).

FTIR спектри свих узорака су обрађени помоћу софтвера *Unscrambler X* (version 10.4; CAMO AS, Трондхејм, Норвешка). Квалитет спектра је потврђен визуелно. Након овога, урађен је „pre-processing“ спектра, што укључује нормализацију јединичним вектором (*mean normalization*), корекцију базне линије (*linear baseline correction*) и друге корекције (*multiplicative scatter correction*). Како би се установило који специфични таласни бројеви у одређеним спектралним регионима највише доприносе класификацији узорака у групе урађена је анализа главних компонената (*PCA – principal component analysis*). PCA је урађена независно за следеће спектралне регионе: амид I, амид II, амид III, *Fingerprint* регион (регион „отиска прста“), као и за спектрални регион $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$. PCA тежи да трансформацијом података редукује скуп варијабли у мањи скуп независних променљивих које се зову главне компоненте (PC – *principal components*). Овом анализом се добија график објеката (скорова; *scores*) и график варијабли (*loadings*). График објеката приказује односе између објеката у односу на главне компоненте, док график варијабли показује које варијабле (таласни бројеви) су допринеле класификацији узорака у различите групе (Popović Minić et al., 2023).

Подаци везани за антиоксидативна, пенива и емулгујућа својства адитива, као и антиоксидативне вредности узорака пре и после дигестија и узорака дехидрисаних супа изведени су у три понављања и резултати су представљени као средње вредности \pm стандардна девијација, а значајност разлика између средњих вредности утврђена је помоћу Tukey-евог теста ($p < 0,05$) (StatSoft Co, Тулса, Оклахома, САД). За утврђивање корелација коришћен је Пирсонов корелациони коефицијент (r) на нивоу значајности $p < 0,05$ и $p < 0,01$ (StatSoft Co, Тулса, Оклахома, САД).

4. Резултати и дискусија

4.1. Биохемијска карактеризација екстраката гљива

4.1.1. Садржај протеина у воденим екстрактима *A. blazei* и *L. sulphureus*

Садржај протеина у узорку VA је износио $34,06 \pm 0,61$ g/100 g, док је код VL био $56,2 \pm 0,91$ g/100 g. У полисахаридним екстрактима гљива (узорци PA, PL) није одређен садржај протеина јер процедура њиховог добијања између осталих корака укључује екстракцију етанолом, центрифугирање, загревање на 120°C и дијализу, тако да долази до таложења и уклањања протеина (Kozarski et al., 2014). Иако се могу наћи различити подаци у литератури, Carneiro et al. (2013) наводе сличан проценат протеина за формулацију *A. blazei* у праху – 31,3 g/100 g. Györfi et al. (2010) наводе да *A. blazei* карактерише и до 48% протеина и 18% полисахарида рачунато на суву материју. Tsai et al. (2008) такође наводе више протеина и мање угљених хидрата код *A. blazei* у односу на друге две испитиване гљиве. Дакле, садржај протеина у VA је у складу са литературним подацима (Firenzuoli et al., 2008; Largeteau et al., 2011; Tsai et al., 2008). Садржај протеина код *L. sulphureus* је већи у односу на већину литературе (Ayaz et al., 2011; Khatua et al., 2017; Klaus et al., 2013; Petrović et al., 2014), међутим, студија Palazzolo et al. (2012) такође наводи висок садржај протеина код *L. sulphureus* сакупљених на Сицилији, али прерачунато на масу свеже гљиве. Иако се углавном наводи као поуздана метода, одређивање протеина по Брадфорду (Bradford, 1976) може дати веће резултате услед интерференција супстанци које садрже азот ако узорци претходно нису исталожени помоћу ТСА (Braaksma & Schaap, 1996). На пример, уреа се у узорцима макрогљива јавља у периоду након убирања плодова као резултат разлагања протеина (Braaksma & Schaap, 1996). Осим укупног садржаја, треба узети у обзир и удео различитих протеинских фракција. *L. sulphureus* има висок садржај албумина и глобулина, који су добро растворљиви и лако се варе, па се наводи да имају добру биолошку вредност, што је за ове резултате значајно са становишта функционалности (Almeida et al., 2022; Kovács & Vetter, 2015). Варирања у структури и биолошкој активности су врло честа, зависно од различитих екстракционих процедура које се користе, разлика у култивацији, развојне фазе током које су убране, услова чувања, итд. (Ayaz et al., 2011; Grienke et al., 2014; Lima et al., 2011).

4.1.2. Садржај глукана у екстрактима *A. blazei* и *L. sulphureus*

У циљу проналажења боље функционалности будућег адитива, код екстраката гљива праћен је садржај глукана који су у литератури означени као биомакромолекули са читавим спектром корисних биолошких дејстава. Предност је дата мерењу садржаја глукана у односу на често коришћену методу мерења укупног садржаја полисахарида, јер са функционалног становишта не значи пуно, будући да често велики проценат укупних полисахарида чине хитин, шећери и друге супстанце (Sari et al., 2017). Осим тога, узимајући у обзир начин узгајања, екстракције и остале факторе који утичу на варирање биохемијског састава, глукани су навођени као најзаступљенији полисахариди код *A. blazei* (Kozarski et al., 2014; Y. Li et al., 2020; Ohno et al., 2001; Peter-Valence et al., 2011; Smiderle et al., 2011; Yamanaka et al., 2012; Zhang et al., 2010) и *L. sulphureus* (Grienke et al., 2014; Hwang et al., 2008; Klaus et al., 2013; Olennikov et al., 2009a, 2009b; Radic et al., 2009; Seo et al., 2011; Wiater et al., 2011), а без обзира на процентуалну заступљеност, сигурно су најзначајнији са функционалног аспекта јер су централна тема већине радова који се баве овом тематиком (видети поглавља 2.2.1, 2.2.2, 2.2.3.1, 2.2.4.1.). Резултати одређивања садржаја глукана су приказани у табели 4.1. Огромне варијације у садржају α - и β -глукана су честа, а потичу од више разлога:

- главни складишни полисахарид код гљива је гликоген (α -(1,4)-глюкан), а његова концентрација у највећој мери зависи од нутритивних услова и услова средине током раста гљива, који много варирају, па се објективно разликује и садржај α -глюкана;
- за разлику од интрацелуларних α -глюкана, β -глюкани се налазе у ћелијском зиду, па је њихово екстраховање теже и принос зависи од типа коришћене екстракције (Kozarski et al., 2011);
- код *A. blazei* узгајаних на пољу је примећен већи садржај β -глюкана у односу на узорке гајене у стакленику (Zied et al., 2014).

Табела 4.1. Садржај глюкана у воденим и полисахаридним екстрактима *A. blazei* и *L. sulphureus*

Узорак	Укупни садржај глюкана (g/100 g)	Садржај α -глюкана (g/100 g)	Садржај β -глюкана (g/100 g)
VA	6,32 \pm 0,42 ^a	1,35 \pm 0,10 ^a	4,97 \pm 0,52 ^a
PA	31,16 \pm 0,27 ^b	9,65 \pm 0,75 ^b	21,51 \pm 0,49 ^b
VL	4,56 \pm 0,13 ^c	2,40 \pm 0,01 ^a	2,16 \pm 0,14 ^c
PL	11,96 \pm 0,23 ^d	7,89 \pm 0,21 ^c	4,07 \pm 0,02 ^a

Вредности су добијене из три независна мерења (n=3) и приказане су као средња вредност \pm стандардна девијација. У оквиру сваке колоне, резултати после којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; PA – полисахаридни екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; PL полисахаридни екстракт *L. sulphureus*.

Због свега набројаног поређења треба узети са резервом. Ипак, садржај укупних глюкана у анализираним узорцима је био нижи од садржаја глюкана код полисахарида екстрахованих врелом водом из *A. brasiliensis* (Kozarski et al., 2011) и *L. sulphureus* (Klaus et al., 2013; Sari et al., 2017). Садржај α - и β -глюкана у полисахаридном екстракту *A. brasiliensis* је био приближно 26% и 49%, респективно (Smiderle et al., 2011). Смернице које се могу наћи у литератури за циљану екстракцију полисахарида код *A. blazei* и повећање приноса тичу се коришћења ензимских екстракција уместо екстракције водом (Jia et al., 2013), затим коришћења виших температура екстракције (100°C у односу на 10°C и 60°C) за изолацију полисахаридно-протеинских комплекса (Gonzaga et al., 2005) и даје се предност лиофилизацији у односу на друге методе сушења у циљу повећања приноса полисахарида и њихове биолошке активности (Wu et al., 2014).

4.1.3. Садржај фенолних једињења у екстрактима *A. blazei* и *L. sulphureus*

Квалитативна UHPLC-DAD MS/MS анализа је показала да су од 13 стандарда нађена само два фенолна једињења – ескулетин, дериват кумарина, као и кофеинска киселина, која спада у хидрокси-циметне киселине (табела 4.2). Оба једињења регистрована су код *A. blazei*, док код *L. sulphureus* није детектовано присуство фенолних једињења. Садржај ескулетина је исти у спрашеној гљиви и воденом екстракту *A. blazei*, док га има мање у полисахаридном екстракту, вероватно зато што добијање полисахаридних екстраката укључује преципитацију етанолом. Слично је и са кофеинском киселином, које има приближно двоструко мање у полисахаридном екстракту у односу на целу гљиву и водени екстракт, с тим да овде постоји значајно већа концентрација у воденом екстракту у односу на целу гљиву, што може указивати да је вода добар медијум за екстракцију у случају *A. blazei*.

Табела 4.2. Садржај фенолних једињења екстраката *A. blazei* анализиран УНПЛС-DAD MS/MS

Узорак	Садржај ескулетина (mg/L)	Садржај кофеинске киселине (mg/L)
A	0,046 ± 0,001 ^a	0,041 ± 0,001 ^a
VA	0,050 ± 0,001 ^a	0,052 ± 0,001 ^b
PA	0,028 ± 0,001 ^b	0,023 ± 0,001 ^c

Вредности су добијене из три независна мерења (n=3) и приказане су као средња вредност ± стандардна девијација. У оквиру сваке колоне, резултати после којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). У оквиру сваке колоне, резултати после којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: A – екстракт целе гљиве *A. blazei*; VA – водени екстракт *A. blazei*; PA – полисахаридни екстракт *A. blazei*.

Деривати кумарина се често јављају код гљива, па је тако код *A. blazei* из Бразила пронађена *p*-кумаринска киселина у две одвојене студије (Almeida et al., 2022; Carneiro et al., 2013). Код *L. sulphureus* су такође пронађена фенолна једињења, за разлику од овде презентованих резултата, и то: протокатехуинска киселина у ниској концентрацији екстрахована комбинацијом растварача (Ziaja et al., 2012), гална и протокатехуинска киселина у метанолном екстракту (Karaman et al., 2010), затим циметна и *p*-хидроксибензоева киселина у метанолном екстракту (Petrović et al., 2014b), и кверцетин, кемпферол, катехин, гална, хлорогена, кофеинска и *p*-кумаринска киселина у етил-ацетатној фракцији (Olennikov et al., 2011b).

Укупни антиоксидативни редукујући капацитет, често дискутован као укупни садржај фенолних једињења (TPC) је такође одређен код екстраката гљива. TPC за VL износио је $0,93 \pm 0,19$ g GAE/100 g, док је код VA скоро дупло већи и износио је $1,78 \pm 0,11$ g GAE/100 g. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет није било могуће детектовати у узорцима полисахаридних екстраката (n.d.). Разлози за дискрепанцију у резултатима квантитативне УНПЛС-DAD MS/MS анализе и укупног садржај фенолних једињења мереног спектрофотометријски (TPC) могу бити бројни. Иако се коришћена стандардна једињења за детекцију фенолних једињења у овој дисертацији поклапају са подацима о присуству фенолних једињења у гљивама из дела публиковане литературе (као што су нпр. сирингинска и кофеинска киселина), део стандардних једињења није био доступан (као нпр. *p*-хидроксибензоева киселина, *p*-кумаринска киселина, ферулинска киселина, протокатехуинска киселина), па је могуће да на овај начин нису могле бити детектоване (Abdelshafy et al., 2022). Такође, у литератури постоји неслагање о томе да ли гљиве имају биосинтетске путеве за флавоноиде (Pukalski & Latowski, 2022). Такође, уколико је циљ студије детаљно одређивање фенолних једињења, она се морају хидролизovati пре одређивања, јер се често у гљивама налазе заједно са протеинима због својстава ових једињења да се повезују ковалентно и нековалентно, зависно од низа фактора (Shahidi & Dissanayaka, 2023). Осим овога, са Фолин-Чиколтеовим реагенсом реагују и друге супстанце (протеини, угљени хидрати, аминокиселине, итд.), па се добијају већи резултати од објективних, те се TPC тест мора узимати са резервом. У светлу оваквих резултата метода TPC је даље коришћена за одређивање укупног антиоксидативног редукујућег капацитета уместо за одређивање укупног садржаја фенолних једињења (Everette et al., 2010; Popović Minić et al., 2023). Генерално посматрано, принос фенолних једињења је нижи код водених екстраката гљива у односу на друге екстракте, што је потврђено и у другим публикацијама. Студија Petrović et al. (2014a) наводи најмању концентрацију фенолних једињења у воденом екстракту *L. sulphureus* у односу на метанолни и етанолни, са закључком да се на ово може значајно утицати применом ултразвука. Klaus et al. (2013) такође наводе да је садржај фенолних једињења код *L. sulphureus* био већи у алкалном

полисахаридном екстракту у односу на водени и делимично пречишћене полисахариде. Већина осталих података за *L. sulphureus* тиче се етанолних и метанолних екстраката (Kolundzic et al., 2016; Kovács & Vetter, 2015; Turkoglu et al., 2007). Из етил-ацетатне фракције *L. sulphureus* добијено је далеко више фенолних једињења (≈ 175 mg/g DW) у односу на екстракцију водом (≈ 7 -12 mg/g DW), али се због коришћења екстраката гљива у сврхе формулације функционалног јестивог адитива који не сме бити токсичан морају пажљиво бирати растварачи (Olennikov et al., 2011b). Mazzutti et al. (2012) наводе мању ТРС вредност и код водених екстраката *A. brasiliensis* у односу на раствараче као што су етанол или етил-ацетат код *Soxlet* екстракције и ову методу (ТРС) убрајају у антиоксидативне методе. Студија Geösel et al. (2011) показала је да садржај фенолних једињења може да варира неколико пута код истих сојева *Agaricus subrufescens*, зависно од године, тј. температуре која утиче на метаболизам фенолних једињења. Smiderle et al. (2011) су нашли нижу концентрацију фенола (ТРС $\approx 0,08$ g/100g) у полупречишћеном полисахаридном екстракту *A. brasiliensis*. Претпоставка је да их има више у целој гљиви, као и да делимично пречишћени полисахариди садрже део фенолних једињења који се тешко одвајају јер су везани интермолекулским интеракцијама (Jakobek, 2015; Smiderle et al., 2011). До сличног закључка дошли су и Kozarski et al. (2014), који наводе мале количине фенолних једињења за које претпостављају да се везују за полисахариде естерификацијом (0,7 – 1%, зависно од типа полисахаридног екстракта *A. brasiliensis*).

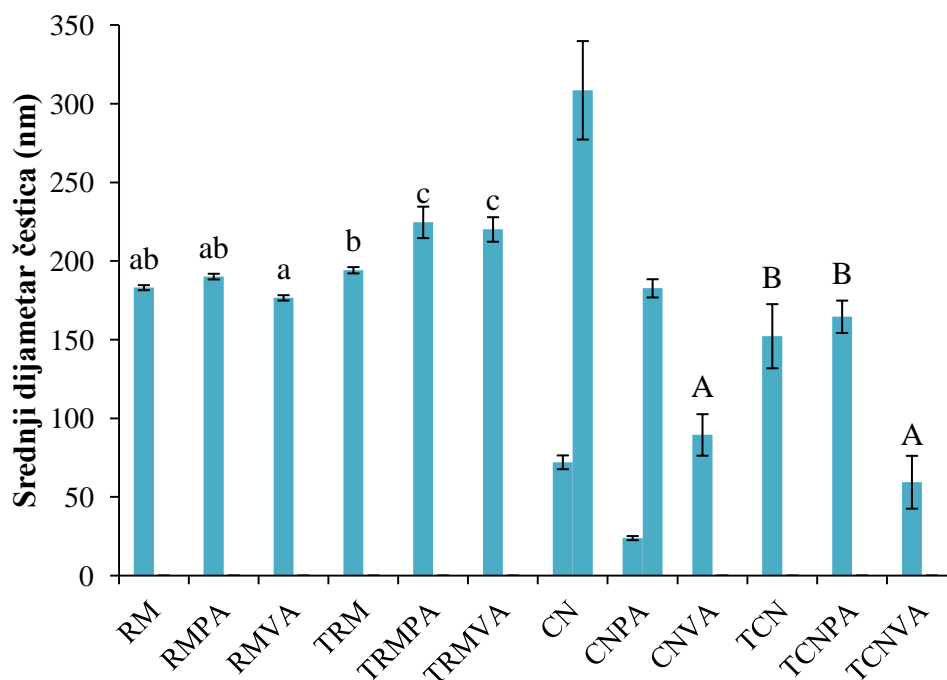
Дакле, већи приноси фенолних једињења захтевају другачије технике екстракције од оних примењених у овој дисертацији. Такође, мора се још једном напоменути да су фенолна једињења секундарни метаболити и да од услова током раста гљиве зависи да ли ће се јављати и у којој концентрацији, па отуда такође потичу варијације (Carneiro et al., 2013). Приликом осмишљавања функционалног адитива са технолошке тачке гледишта мора се наћи компромисно решење између концентрације биоактивних компонената, могуће токсичности одређених растварача, једноставности и економичности поступка ради будуће примене у индустрији. Ови захтеви су задовољени коришћењем екстракције водом код узорака гљива.

4.2. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива

4.2.1. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*

Мерења средњег дијаметра честица су приказана на слици 4.1. и крећу се од 177 ± 2 до 225 ± 10 nm за узорке термички третираног и нетретираног млека и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*. Индекс полидисперзије (PI) се кретао око 0,2, што указује на унимодалне дистрибуције ових узорака. Вредности средњих дијаметара су мање за RM и TRM у поређењу са Новјески et al. (2020). Величина казеинске мицеле се није статистички значајно повећала термичким третманом, што је у складу са литературним подацима (Pesic et al., 2012). За значајно повећање дијаметра вероватно су потребне веће температуре загревања од оних примењених у овој дисертацији (L. Zhao et al., 2020). У литератури се могу пронаћи велика варирања дијаметара казеинских мицела (40 – 300 nm; 60 – 250 nm; 80 – 400 nm), зависно од коришћене методе (DLS, SEM, AFM), мада се често као средњи дијаметар узима вредност од 200 nm (Dalgleish, 2011; Martin et al., 2006). Додатак екстраката гљиве такође није значајно утицао на величину мицеле нетретираног млека, али је утицао на величину мицеле термички третираног млека. Ово се може објаснити стварањем WP/CN комплекса на површини казеинске

мицеле након термичког третмана, који повећавају могућност за формирање интеракција са компонентама екстракта гљива као што су нпр. глукани, што повећава дијаметар и утиче на неправилнији облик мицела (Pesic et al., 2012). Средњи дијаметар узорака TRMPA и TRMVA значајно је већи у односу на RM, RMPA, RMVA и TRM.



Слика 4.1. Средњи дијаметар честица млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*. Различита мала латинична слова означавају статистички значајне разлике према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Различита велика латинична слова означавају статистички значајне разлике према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.

Код термички третираних и нетретираних казеина, као и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* ситуација је сложенија. Мерења су далеко мање репродуктивна, а код два узорка (CN, CNPA) се јавља бимодална дистрибуција. Снижавање рН вредности утиче на огромне промене на казеинским мицелама; к-казеин губи своје „трепље“ које служе за стерну стабилизацију, мицеле се приближавају, губе своје наелектрисање и смањује им се дијаметар (Ouanezar et al., 2012). Такође, приликом одстрањивања воде током сушења, казеинске мицеле се контрахују и овај процес није у потпуности реверзибилан приликом реконституције, након које се мицеле шире током рехидрације, али заузимају мању запремину у односу на свеже млеко (Liu et al., 2012). Због овога се често среће бимодалност величине честица када су у питању системи

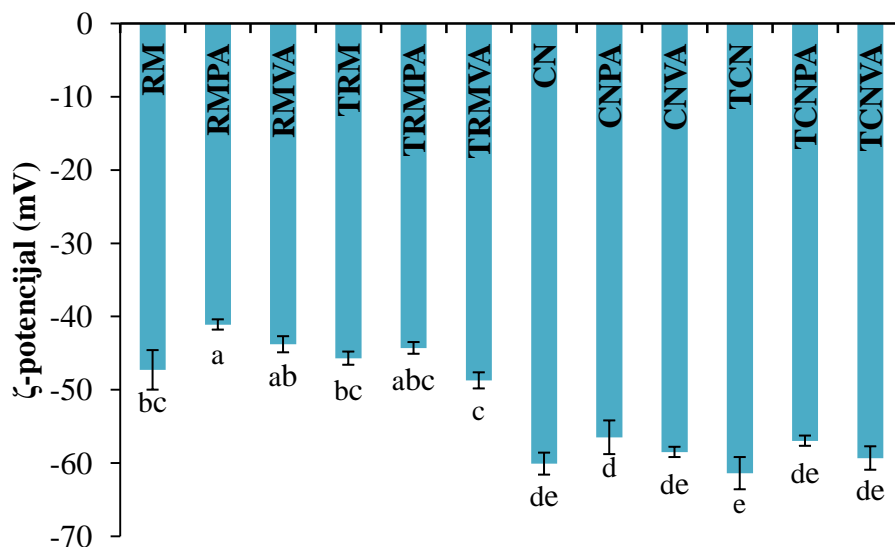
који садрже мицеларни казеин након реконституције у води (Crowley et al., 2015; Wu et al., 2019; 2020) као последица отежаног продирања молекула воде у прашкасте честице и споре рехидрације казеинских мицела (Mimouni et al., 2010). Овакви резултати се не јављају код термички третираних казеина и њихових мешавина, па је претпоставка да поменути WP/CN комплекси и додаток екстракта *A.blazei* стабилизују казеине, па је дистрибуција унимодална. Такође, формирању интеракција између узорака млека и казеина и VA можда доприноси присуство фенолних једињења. Познато је да постоје троструке интеракције између полисахарида, протеина и фенолних једињења које су мање проучене у односу на двојне интеракције (Schefer et al., 2021). Фенолне киселине, као што је ферулинска киселина могу допринети унакрсном повезивању протеина и полисахарида (Schefer et al., 2021). Претпоставка је да кофеинска киселина, која је структурно врло слична са ферулинском киселином (једна хидроксилна уместо метокси групе), може допринети формирању комплекса између глукана из *A.blazei* и казеина.

Мерења величине честица раствора воденог и полисахаридног екстракта *A.blazei* показују полимодалну дистрибуцију. Код узорка PA, пикови су груписани око три вредности (≈ 60 nm; ≈ 470 nm; $\approx 6,5$ μ m), слично као и код VA (≈ 140 nm; ≈ 430 nm; $\approx 3,3$ μ m). Ово је у складу са студијом Gonzaga et al. (2013) која је показала да се раствор полисахарида из *A.brasiliensis* састоји од мешавине микро- и наночестица које варирају 351 nm - 2,1 μ m, као и за полисахаридни екстракт *Cordia tuxa* који има сличну дистрибуцију у три области (Hojjati & Beirami-Serizkani, 2020).

На слици 4.2. могу се видети резултати мерења ζ -потенцијала узорака млека и казеина и њихових мешавина са екстрактима *A.blazei*. Вредности ζ -потенцијала термички третираног и нетретираног млека и њихових мешавина са екстрактима *A.blazei* кретале су се између $-48,7 \pm 1,1$ и $-41,1 \pm 0,7$ mV. Мерења ζ -потенцијала термички третираних и нетретираних казеина, као и њихових мешавина са екстрактима *A.blazei* указала су на већу електронегативност и кретала су се у опсегу од $-61,4 \pm 2,2$ до $-56,5 \pm 2,3$ mV. Мерења су поновљива, на шта указује коефицијент варијације (CV) 1,1 – 5,7%. Негативне вредности потичу од негативно наелектрисаних група на површини казеинске мицеле, као што су фосфатне групе, фосфосерински кластери, остаци глутамата, итд., односно све оно што утиче на електростатичко одбијање појединачних казеинских мицела и обезбеђује њихову стабилност (Horne, 2020). У литератури се стабилним честицама сматрају оне чији је ζ -потенцијал негативнији од -30 mV, па се са овог становишта узорци млека и казеина (без обзира на термички третман), али и мешавине могу сматрати стабилним системима (Tolano-Villaverde et al., 2016). Стабилнима се могу сматрати и раствор воденог ($\approx -41,7$ mV) и полисахаридног екстракта *A.blazei* ($\approx -46,6$ mV). Апсолутне вредности ζ -потенцијала казеина и њихових мешавина су биле значајно веће, тј. негативније и указују на бољу стабилност у поређењу с осталим узорцима. Ово може бити последица различитих минералних састава мешавина на бази млека и мешавина на бази казеина.

У млеку се казеинске мицеле налазе окружене јонима калцијума који „маскирају“ негативно наелектрисане групе на површини казеинске мицеле, па су апсолутне вредности ζ -потенцијала ниже (Anema & Klostermeyer, 1996), што није случај са казеинима, јер поступак њиховог добијања укључује изоелектричну преципитацију, губитак калцијума и последично веће апсолутне вредности ζ -потенцијала (Post et al., 2012). Додатак полисахаридног екстракта у термички нетретирано млеко утицао је на значајну промену ζ -потенцијала (за 13,1%), што указује да интеракције које се одигравају на површини казеинске мицеле такође „маскирају“ негативно

наелектрисање. Овакве интеракције вероватно се дешавају и код других мешавина, међајући им вредности ζ -потенцијала, али у мањем обиму, па разлике нису статистички значајне (Popović Minić et al., 2023).

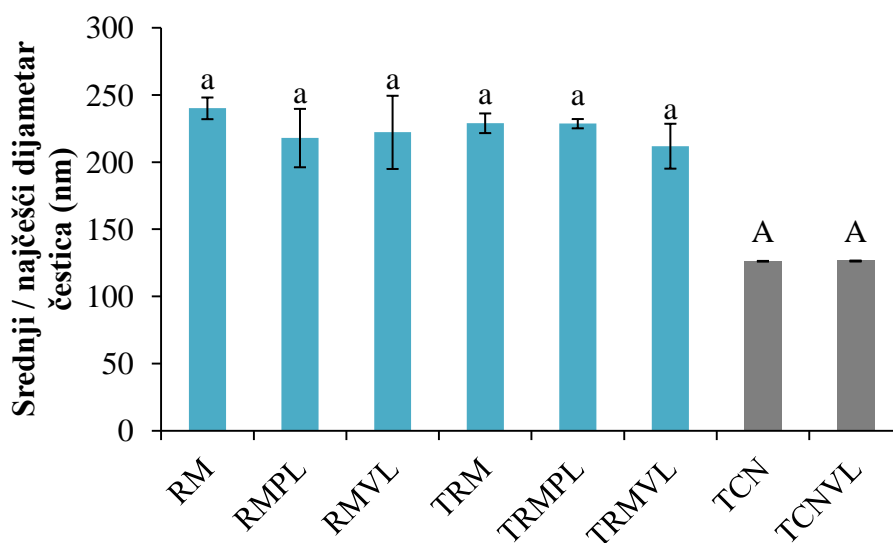


Слика 4.2. ζ -потенцијал узорака млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*. Различита мала латинична слова означавају статистички значајне разлике према Tukey тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.

4.2.2. DLS мерења ζ -потенцијала и величине честица козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*

Резултати мерења средњег дијаметра честица приказани су на слици 4.3. За RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *L. sulphureus* резултати су у опсегу од 212 ± 17 до 240 ± 8 nm. Вредности индекса полидисперзије су се кретале 0,2 – 0,3, што указује на унимодалне дистрибуције узорака. Величина честица RM и TRM је мања у односу на Новјески et al. (2020), а термички третман није утицао на значајно повећање дијаметра казеинске мицеле, као код Pesic et al. (2012). Додатак екстракта гљива није значајно утицао на величину мицела RM и TRM. Претпоставка је да су интеракције конституената PL и VL и термички индукованих WP/CN комплекса, као и група са површине нетретиране казеинске мицеле далеко 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, па се промене у величини честица не региструју. Може се регистровати већи CV код неких мешавина (RMPL,

RMVL, TRMVL) у односу на аналогне мешавине са *A. blazei* (RMPA, RMVA, TRMVA), што може указивати на неправилнији облик мицеле услед слабих интеракција или присуство већег броја честица, што омета мерење дијаметра.



Слика 4.3. Средњи (*mean*) и најчешћи (*mode*) дијаметар честица млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*. Најчешћи дијаметар честица (модус) приказан је код узорака TCN и TCNVL сивом бојом; средњи дијаметар честица приказан је код осталих узорака плавом бојом. Различита мала латинична слова означавају статистички значајне разлике према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Различита велика латинична слова означавају статистички значајне разлике према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNVL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.

Биохемијска карактеризација екстракта гљиве (поглавље 4.1.) показала је да PL има $\approx 2,6$ пута мање укупних глукана у односу на PA, док VL има $\approx 1,4$ пута мање укупних глукана у односу на VA. Ово је у складу са литературом која указује на присуство хетероглукана и хетерополисахарида код *L. sulphureus* (Alquini et al., 2004; Olennikov et al., 2008, 2009a, 2009b, 2010). Поред овога, VL има $\approx 1,6$ пута више укупних протеина у односу на VA. Дакле, мањи садржај глукана значи да је и вероватноћа јављања интеракција мања, а могуће је и да други полисахариди немају исти афинитет ка казеинима као глукани. Zhang et al. (2011) су у гљиви *Pleurotus geesteranus* пронашли 15% протеина, тј. 10% протеина у слободној форми и преосталих 5% везано за полисахариде. Аутори наводе да је анализом различитих фракција пронађено да се везани протеини углавном повезују са галактозом и манозом, док се у полисахаридним фракцијама које се састоје од глукозе као градивног елемента не налазе везани протеини. Могуће је и да је део полисахарида из *L. sulphureus* у мешавинама у форми комплекса са пептидима или протеинима из гљиве, тј. да ови полисахариди имају већи афинитет ка протеинима гљиве него ка казеинима, што је различито од глукана из *A. blazei* који ступају у интеракције са казеинима млека, тј. само су делимично део

протеинско-полисахаридног комплекса гљиве, а већим делом су растворени у медијуму, па лако могу формирати нпр. водоничне везе са казеинима.

Како би се утврдило постојање и тип интеракција једињења екстракта *L. sulphureus* и млека потребна су додатна истраживања. Постојећа литература везана за ову тематику није обимна, већ само може пружити информације о правцу даљих истраживања. Једино се са сигурношћу може рећи да се у случају мешавина на бази *L. sulphureus* ради о још хетерогенијем систему у односу на мешавине на бази екстракта *A. blazei*, па сва тумачења потенцијалних интеракција носе велику несигурност.

Табела 4.3. Средњи (*mean*) и најчешћи (*mode*)* дијаметар полидисперзних честица казеина и мешавина са екстрактима *L. sulphureus*

Назив узорка	Средњи дијаметар (<i>mean</i> ; nm)	Најчешћи дијаметар (<i>mode</i> ; nm)	PI вредност
CN	62,1	61,5	3,811
	276,7	205,4	0,762
	76,9	77,1	6,277
	125,9	126,0	2,480
CNVL	103,1	101,9	2,361
	25,3	25,5	6,899
	98,5	98,7	2,334
	144,5	143,6	1,374
CNPL	141,2	141,8	1,822
	86,1	86,7	4,418
	113,6	112,7	3,137
	98,3	98,6	2,921
TCNPL	183,4	181,3	0,369
	78,6	78,0	1,420
	126,7	126,1	0,329
	154,9	126,0	0,327

Скраћенице: CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*, PI – индекс полидисперзије (*Polydispersity Index*).

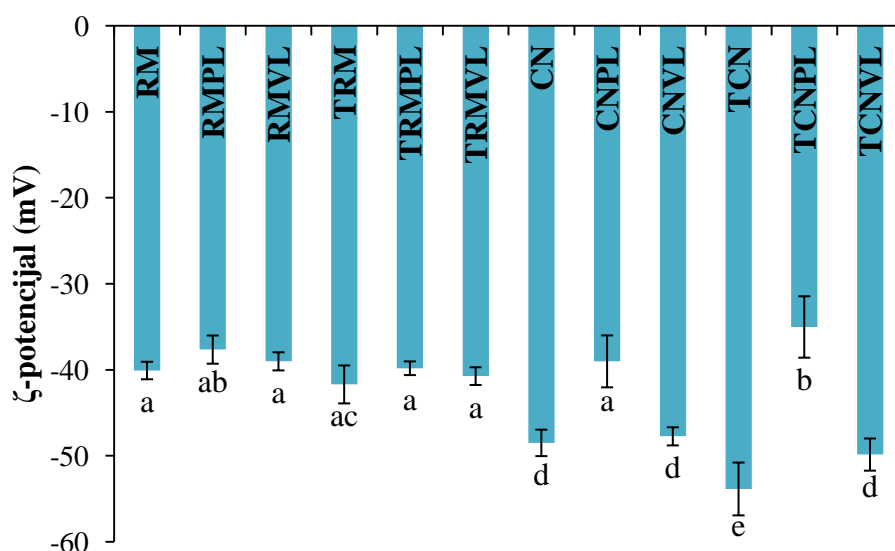
Код узорка термички третираних и нетретираних казеина и њихових мешавина, резултати мерења нису довољно репродуктивни за одређене узорке. Само су код узорка TCN и TCNVL резултати мерења стабилни, па су приказани заједно са мешавинама на бази RM и TRM (слика 4.3.). Приказани су модуси, тј. најчешћи дијаметри честица јер резултати јасно указују на постојање честица TCN и TCNVL са дијаметром ≈ 126 nm. Додатак воденог екстракта *L. sulphureus* није утицао на промену величине честица (TCN \rightarrow TCNVL), али је термички третман утицао на стабилизацију казеинске мицеле у оба случаја. Иако је такође направљена на бази TCN, мешавина TCNPL није имала репродуктивне резултате мерења, као ни CN нити мешавине на бази CN. Резултати мерења ових узорка приказани су у одвојеној табели (табела 4.3.) како би се показало да према средњем дијаметру или према модусу дијаметра није могуће приказати смислене резултате. Аритметичка средина са коефицијентом варијације од нпр. преко 70% за узорак CN није адекватан показатељ. Ово је видљиво и на основу PI

вредности која се креће чак до $\approx 6,9$, док је нпр. за RM, TRM и њихове мешавине износила око 0,2 – 0,3. Такође се у литератури може наћи да нема или има мало казеина са дијаметром испод 80 nm, па сви резултати мерења који су испод ове вредности такође нису релевантни или указују на постојање других супстанци, као што су пептидно-полисахаридни комплекси или агрегати протеина пореклом из *L. sulphureus* (Dalglish, 2011).

Величина честица раствора PL и VL није била мерљива овом методом, вероватно због хетерогеног биохемијског састава. Због неправилних облика честица у екстрактима гљива, подаци о величини честица су углавном недоступни, осим ако се ради о наночестицама дизајнираним тако да имају унапред одређен дијаметар, па поређења нису адекватна. Примера ради, величина нано- β -гlukanских честица директно изолованих из *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus* кретала се у опсегу 50 – 100 nm (Shaheen et al., 2022). Могу се наћи студије где се полисахариди из различитих извора као што су нпр. соја и грашак често користе за стабилизацију протеина млека у киселим условима (Cheng et al., 2018; Nakamura et al., 2012). Иако стабилизују протеине млека, овакви полисахариди се одликују великом полидисперзношћу, која може потицати и од делимичне агрегације полисахаридних ланаца (Cheng et al., 2018).

На слици 4.4. приказани су резултати мерења ζ -потенцијала узорака млека и казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*. Вредности ζ -потенцијала термички третираног и нетретираног млека и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* биле су у опсегу од $-41,7 \pm 2,2$ до $-37,7 \pm 1,6$ mV. Мерења ζ -потенцијала термички третираних и нетретираних казеина, као и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* и овде су указала на већу електронегативност и кретала су се од $-53,9 \pm 3,1$ до $-35,0 \pm 3,6$ mV. Мерења су поновљива, а CV је био већи у односу на мешавине са екстрактима *A. blazei* и кретао се од 2,0 до 10,2%. Такође, апсолутне вредности мерења ζ -потенцијала мешавина биле су ниже у односу на аналогне мешавине са екстрактима *A. blazei*, што може указивати на мању стабилност ових мешавина, јер се веће апсолутне вредности тумаче као оквирни показатељ стабилности система (Tolano-Villaverde et al., 2016). Као што је већ поменуто, мања стабилност мешавина са екстрактима *L. sulphureus* може бити последица веће хетерогености биохемијског састава мешавина у односу на мешавине са екстрактима *A. blazei*. Негативно наелектрисане групе које потичу од казеинске мицеле и стабилизују је одговорне су за негативне вредности ζ -потенцијала (Horne, 2020). Апсолутне вредности ζ -потенцијала казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* и овде су биле веће у односу на RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *L. sulphureus*. Ово се такође може објаснити потенцијалним „маскирањем“ негативно наелектрисаних група казеина јонима калцијума у узорцима RM, TRM и њиховим мешавинама, тј. одсуством у случају казеинских мешавина, где се виде негативнији ζ -потенцијали (Anema & Klostermeyer, 1996; Post et al., 2012). Далеко мању стабилност испољили су раствори воденог ($\approx -3,6$ mV) и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* ($\approx -22,9$ mV), вероватно због разлика у биохемијском саставу у односу на екстракте *A. blazei*. Осим разлика у саставу, мање негативно наелектрисање у односу на екстракте *A. blazei* такође може бити узрок слабијих електростатичких интеракција. β -гlukanске наночестице из гљива *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus* такође су показале мању стабилност и ζ -потенцијал сличнији екстрактима *L. sulphureus* ($-20,8$ mV и $-16,5$ mV, респективно) (Shaheen et al., 2022). Вредности ζ -потенцијала биле су сличне и са вредностима β -гlukanских наночестица из јечма, овса и квасаца (од -27 до $-6,3$ mV), док су β -гlukanске наночестице из *Pythium aphanidermatum* показале већу негативност ($-35,2$ mV) (Anusuya & Sathiyabama, 2014; Ashraf et al., 2021). Познато је да ањонски

полисахариди као што је нпр. карагенан ступају у интеракције са κ -казеином, па је претпоставка да и екстракти *L. sulphureus* могу реаговати са њим (Martin et al., 2006). Без обзира на апсолутне вредности водених раствора екстраката, додаток полисахаридног екстракта је значајно утицао на промену ζ -потенцијала почетних узорака CN и TCN (за 19,6% и 35,1%, респективно), као и додаток воденог екстракта на узорак TCN (за 7,4%). Ово је још једна разлика у односу на мешавине казеина са екстрактима *A. blazeyi*, па је претпоставка пад апсолутних вредности ζ -потенцијала потиче од мноштва супстанци присутних у растворима мешавина (већа разноликост полисахарида, виша концентрација протеина), које утиче на пад стабилности система, а не на интеракције између казеинске мицеле и конституената екстраката *L. sulphureus*. Промене ζ -потенцијала код RM и TRM након додатка екстраката нису биле статистички значајне. Уколико је додаток екстраката утицао на пад стабилности мешавина на бази казеина, ово може указивати на интеракције конституената термички третираног и нетретираног млека са полисахаридима и/или протеинима пореклом из *L. sulphureus*, што донекле стабилизује систем, па промене у наелектрисању нису значајне.

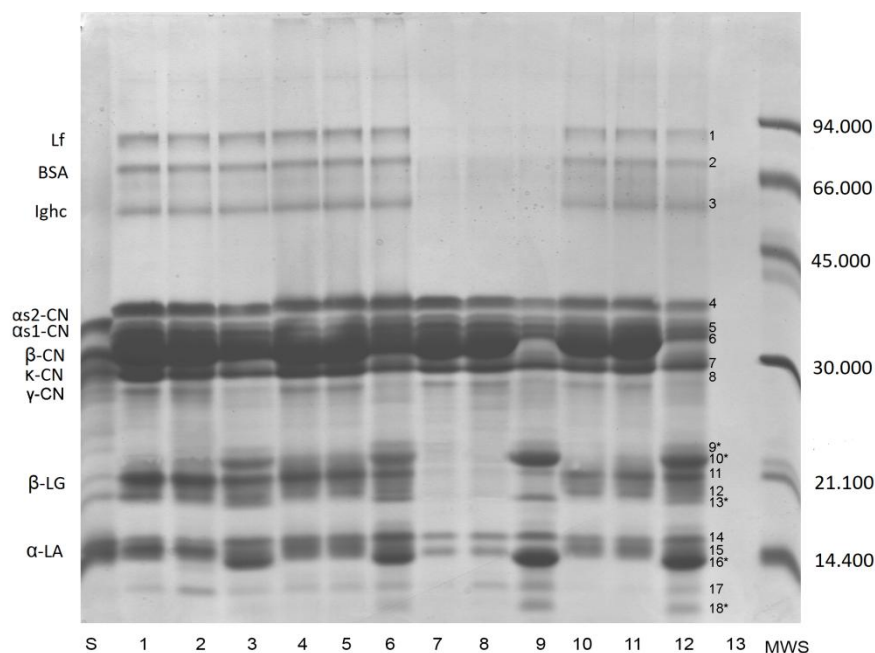


Слика 4.4. ζ -потенцијал узорака млека, казеина млека и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*. Различита мала латинична слова означавају статистички значајне разлике према Tukey тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TCNVL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.

4.3. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива

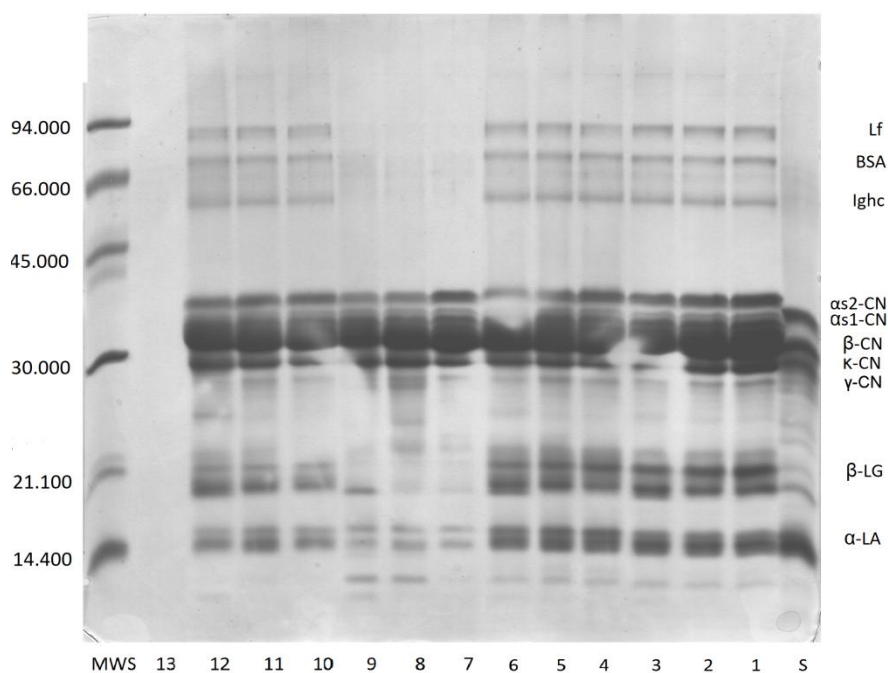
4.3.1. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу SDS-R-PAGE

На сликама 4.5 и 4.6 су приказани електрофореграми узорака млека и казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива добијени раздвајањем полипептида узорака у редукујућим условима. Идентификација протеина је урађена помоћу стандарда протеина крављег млека, као и поређењем са литературним подацима за козје млеко (Milinčić et al., 2021; Pesic et al., 2012). Протеински профили узорака на SDS-PAGE геловима у редукујућим условима показују типичан састав протеина козјег млека - присуство казеина и серум протеина, без обзира на присуство екстраката гљива (узорци 1-12 на обе слике), док се утицај термичког третмана, тј. промене у полипептидном саставу не могу видети овом електрофоретском техником. Може се само уочити разлика између узорака CN и TCN (узорци 7 и 10 на обе слике, респективно), јер су први добијени фракционисањем термички нетретираног, а други термички третираног млека, тј. термички третман је урађен пре фракционисања. Разлике су следеће: профил узорака CN има смањен интензитет трака α -LA, као и одсуство β -LG, Lf, BSA и IgHc, за разлику од профила TCN, јер ту поменути протеини учествују у формирању WP/CN комплекса на површини казеинске мицеле, где и остају након фракционисања (Pesic et al., 2012).



Слика 4.5. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* анализирани SDS-R-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (RMPA); 3 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (RMVA); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TRMPA); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (TRMVA); 7 – казеини обезмашћеног

термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (CNPA); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei* (CNVA); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TCNPA); 12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei* (TCNVA); 13 – водени екстракт *A. blazei* (VA). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); стандард молекулских маса (MWS; изражен у Da); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); γ -казеин (γ -CN); β -лактоглобулин (β -LG); α -лакталбумин (α -LA); серум албумин крви (BSA); имуноглобулини (Ighc); лактоферин (Lf). Бројеви на електрофоретском профили представљају идентификоване траке; звезда (*) поред броја означава неспецифичне полипептидне траке (производе ензимске хидролизе).



Слика 4.6. Електрофоретски профили узорка млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* анализирани SDS-R-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (RMPL); 3 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (RMVL); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TRMPL); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TRMVL); 7 – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (CNPL); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (CNVL); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TCNPL); 12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TCNVL); 13 – водени екстракт *L. sulphureus* (VL). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); стандард молекулских маса (MWS; изражен у Da); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); γ -казеин (γ -CN); β -лактоглобулин (β -LG); α -лакталбумин (α -LA); серум албумин крви (BSA); имуноглобулини (Ighc); лактоферин (Lf).

Електрофоретски профили мешавина са полисахаридним екстрактом *A.blazei* (РА) (узорци 2, 5, 8, 11; слика 4.5) не разликују се од почетних профила узорака млека са којима су мешани (узорци 1, 4, 7, 10; слика 4.5). Код свих мешавина са екстрактима *L. sulphureus* може се приметити исто – без обзира на тип екстракта (PL или VL), профили мешавина (узорци 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12; слика 4.6) не разликују се од почетних профила млека и казеина са којима су мешани (узорци 1, 4, 7, 10; слика 4.6).

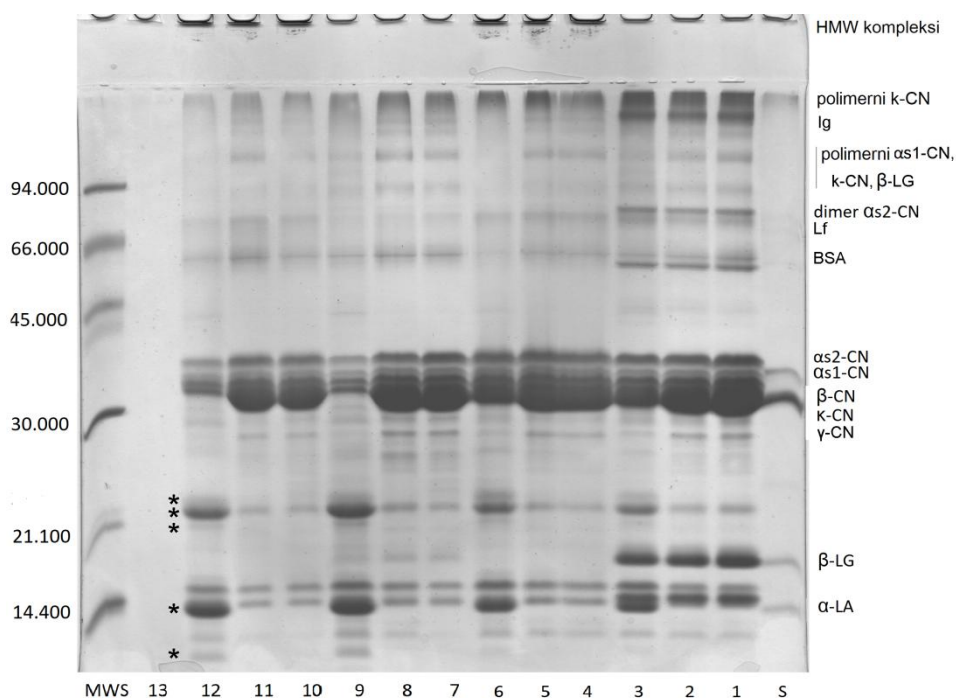
Код мешавина са воденим екстрактом *A.blazei* (VA) (узорци 3, 6, 9, 12; слика 4.5) постоје разлике у протеинском саставу у односу на све остале узорке. Може се уочити доста трака са молекулском масом мањом од 30 kDa, а детектоване су и нове полипептидне траке са молекулским масама од 21,0; 20,3; 18,5; 16,4 и 15,2 kDa (означене на слици 4.5 са 9*, 10*, 13*, 16*, 18*) које се не јављају код других узорака. Поред овога, код мешавина са VA примећује се смањени интензитет трака β -CN и α ₂-CN, одсуство γ -CN, као и непромењени састав осталих протеина, као што су α ₁-CN, κ -CN, α -LA и β -LG, у односу на почетне узорке млека и казеина. Такође, примећују се и дифузне траке врло слабог интензитета код узорка VA (број 13 на слици 4.5) молекулских маса од 45 до 66 kDa које могу потицати од протеаза пореклом из *A.blazei*, што се слаже са литературом (Nakamura et al., 2011; Omrane Benmrad et al., 2019). Претпоставка је да су ове протеазе активне након процеса екстракције који је благ (ултразвучна екстракција на собној температури) и да лиофилизован узорак VA креће са протеолитичким разлагањем доминантних казеина у козјем млеку (β -CN и α ₂-CN) након припреме мешавина. Овим протеолитичким дејством ослобађају се полипептиди, па новонастали састав мешавина који укључује и биоактивне полипептиде природно присутне у козјем млеку и полипептиде настале додатком воденог екстракта *A.blazei* може бити потенцијално вишеструко користан са функционалног становишта. Такође се на овај начин превазилазе потешкоће које тренутно постоје везано за изолацију протеина гљива и ефекте процесних параметара на њихову биолошку активност, јер су поменуте протеазе присутне и након припреме мешавина, а није их потребно изоловати, већ се користе заједно са другим компонентама воденог раствора, што доприноси синергистичком функционалном ефекту оваквих мешавина (Siu et al., 2014; Xu et al., 2011).

Детаљан полипептидни састав (у %) и просечни састав казеина (у %) је приказан у прилогу дисертације (прилог 1 и 2, респективно). Интензитет трака β -CN и α ₂-CN код мешавина са VA (RMVA, TRMVA, CNVA, TCNVA) се смањило у односу на почетне узорке млека и казеина (RM, TRM, CN, TCN) за 18,06%; 13,71%; 68,68% и 59,06% за β -CN и 26,38%; 10,23%; 31,44% и 21,27% за α ₂-CN, респективно. Може се закључити и да су узорци CN и TCN због већег садржаја β -CN и α ₂-CN били бољи супстрат за протеазе пореклом из *A.blazei* у односу на RM и TRM (Popović Minić et al., 2023).

Присуство активних ензима није могуће код мешавина са полисахаридним екстрактима гљива (РА и PL), јер процедура њиховог добијања између осталог укључује термички третман на температури од 120°C. Ензими су у овом кораку денатулисани, а након даље процедуре уклоњени из екстракта. Водени екстракт *L. sulphureus* (VL) нема протеолитичко дејство као VA. Иако су процедуре добијања водених екстраката идентичне, тј. услови су благи, код ове гљиве у литератури није забележено присуство протеаза. Због другачијег метаболизма, *L. sulphureus* се наводи као извор полисахаридних ензима као што су глуканазе и ксиланазе, којима узорци млека не представљају супстрат (Hong et al., 2009; Lee et al., 2009).

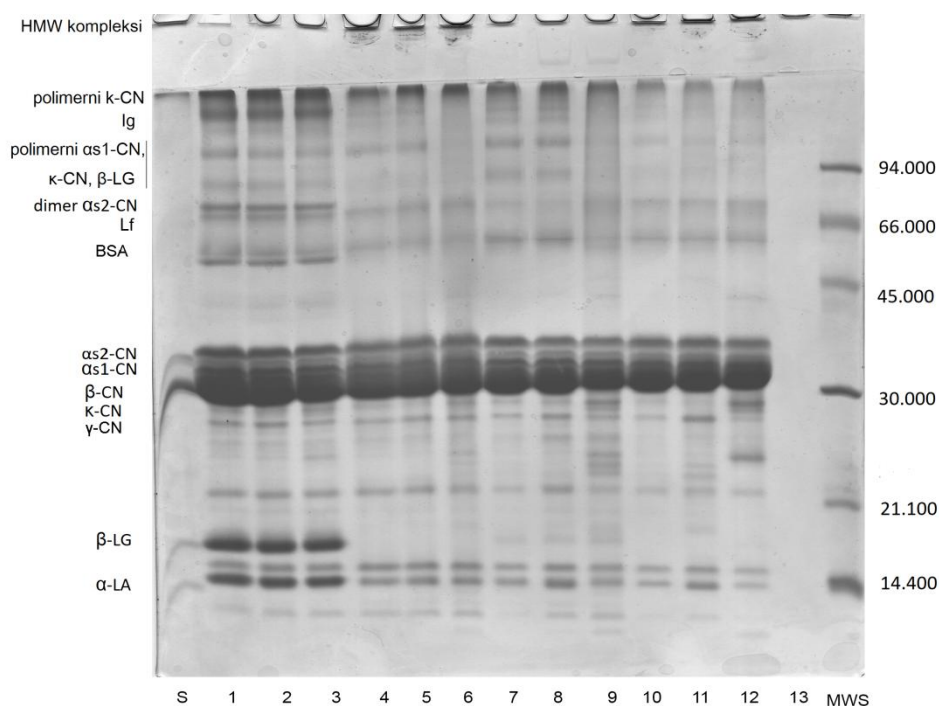
4.3.2. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу SDS-NR-PAGE

На сликама 4.7. и 4.8. су приказани SDS-NR-PAGE електрофореграми узорака млека и казеина њихових мешавина са екстрактима гљива добијени раздвајањем полипептида у нередукуюћим условима. Идентификација протеина је урађена исто као код SDS-R-PAGE. Код SDS-NR-PAGE електрофорезе нема редукционог средства, па се могу уочити димерни и полимерни облици α -CN, κ -CN и β -LG, односно они протеини који имају слободне Cys остатке и могу градити дисулфидне везе (Pešić, 2011). Такође, κ -CN, β -CN, α_2 -CN, α -LA и β -LG током загревања граде високомолекулске комплексе, HMW комплексе (*High Molecular Weight*) који у нередукуюћим условима не могу да уђу у гел (Pesić et al., 2012). Због свега наведеног, на сликама 4.7. и 4.8. се јасно може уочити разлика између термички третираних и нетретираних узорака по присуству HMW комплекса на улазу у горњи гел (узорци 4, 5, 6, 10, 11, 12; обе слике), као и по смањеном интензитету наведених протеина који граде HMW комплексе. Протеински профили мешавина полисахаридних екстраката обе гљиве, као и воденог екстракта *L. sulphureus* идентични су као и почетни узорци млека и казеина. Ово значи да конституенти наведених екстраката (PA, PL, VL) нису формирали ковалентне везе са протеинима млека (што не искључује слабије врсте интеракција), што се слаже са електрофореграмима SDS-R-PAGE. Осим овога, на SDS-NR-PAGE електрофореграмима је потврђено присуство специфичних полипептида потенцијално насталих протеолитичким дејством протеаза воденог екстракта *A. blazei* (узорци 3, 6, 9, 12; слика 4.7; полипептиди означени звездицама), као и смањење трака β -CN, α_2 -CN и одсуство γ -CN, од којих су настали нови полипептиди (Porović Minić et al., 2023).



Слика 4.7. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* анализирани SDS-NR-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (RMPA); 3 – мешавина обезмашћеног термички

нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (RMVA); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TRMPA); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (TRMVA); 7 – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (CNPA); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei* (CNVA); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TCNPA); 12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei* (TCNVA); 13 – водени екстракт *A. blazei* (VA). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); стандард молекулских маса (MWS; изражен у Da); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); γ -казеин (γ -CN); β -лактоглобулин (β -LG); α -лакталбумин (α -LA); серум албумин крви (BSA); имуноглобулини (Ig); лактоферин (Lf); високомолекулски комплекси (HMW). Звездицама (*) су означене неспецифичне полипептидне траке (производи ензимске хидролизе).

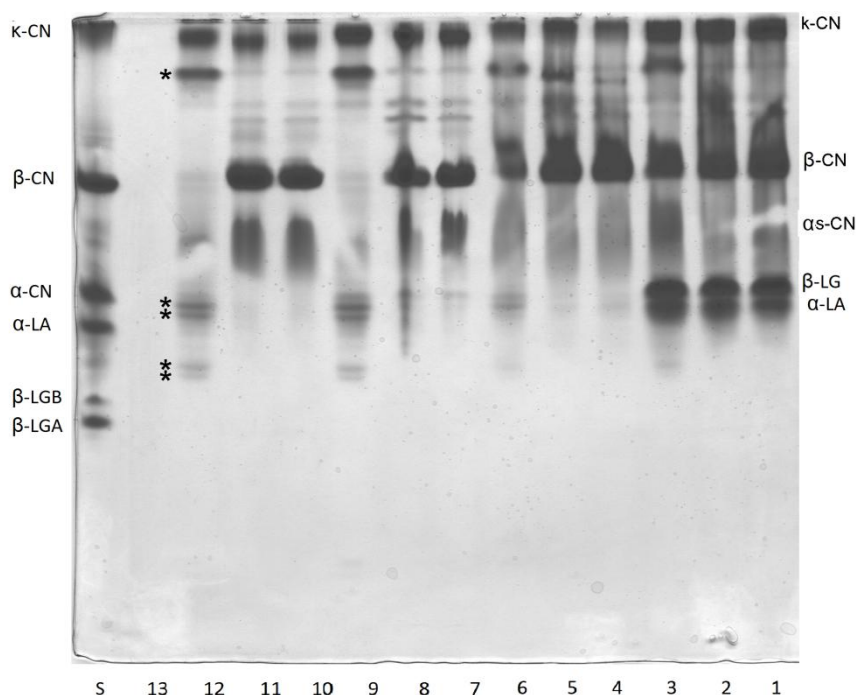


Слика 4.8. Електрофоретски профили узорка млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* анализирани SDS-NR-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (RMPL); 3 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (RMVL); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TRMPL); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TRMVL); 7 – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (CNPL); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (CNVL); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TCNPL);

12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TCNVL); 13 – водени екстракт *L. sulphureus* (VL). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); стандард молекулских маса (MWS; изражен у Da); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); γ -казеин (γ -CN); β -лактоглобулин (β -LG); α -лакталбумин (α -LA); серум албумин крви (BSA); имуноглобулини (Ig); лактоферин (Lf); високомолекулски комплекси (HMW).

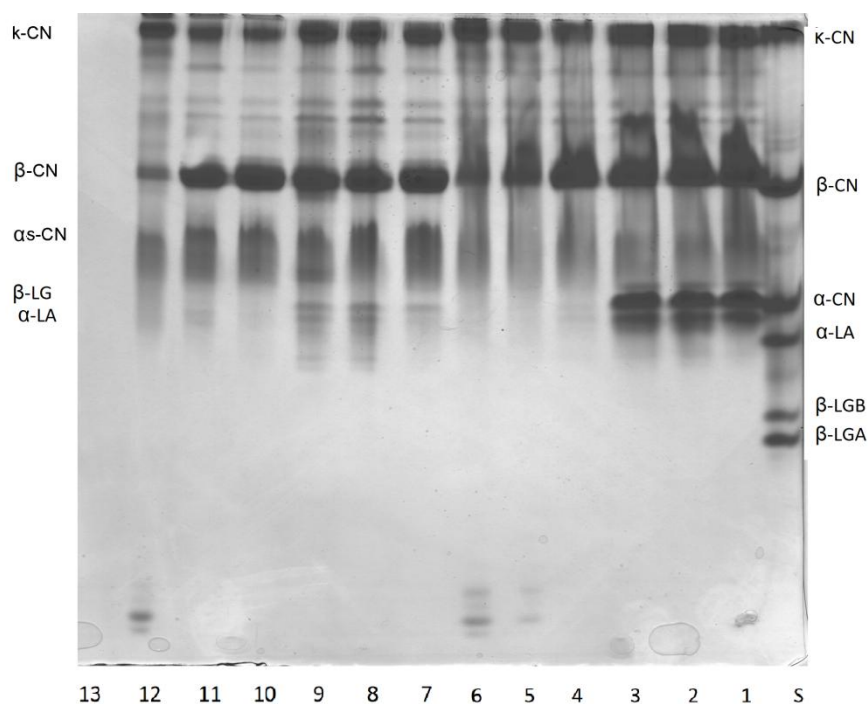
4.3.3. Електрофоретска анализа козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива помоћу Native-PAGE

На сликама 4.9. и 4.10. су приказани електрофореграми узорака млека и казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива добијени раздвајањем полипептида у недисоцијативним и нередукуюћим условима. Идентификација протеина је урађена исто као код SDS-R-PAGE и SDS-NR-PAGE електрофореза.



Слика 4.9. Електрофоретски профили узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* анализирани Native-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (RMPA); 3 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (RMVA); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TRMPA); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (TRMVA); 7 – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (CNPA); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei* (CNVA); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TCNPA); 12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei* (TCNVA); 13 – водени екстракт *A. blazei* (VA). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); β -лактоглобулини/ варијанта А и В (β -LG/ β -LGA; β -LGB); α -лакталбумин (α -LA). Звездицама (*) су означене неспецифичне полипептидне траке (производи ензимске хидролизе). Ознаке са десне стране приказују

покретљивост главних казеина и серум протеина стандарда крављег млека, док ознаке са леве стране приказују покретљивост главних казеина и серум протеина козјег млека.



Слика 4.10. Електрофоретски профили узорка млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* анализирани Native-PAGE. Ознаке: 1 – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); 2 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (RMPL); 3 – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (RMVL); 4 – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); 5 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TRMPL); 6 – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TRMVL); 7 – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); 8 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (CNPL); 9 – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (CNVL); 10 – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); 11 – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus* (TCNPL); 12- мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus* (TCNVL); 13 – водени екстракт *L. sulphureus* (VL). Скраћенице: стандард протеина крављег млека (S); α_1 -казеин (α_1 -CN); α_2 -казеин (α_2 -CN); β -казеин (β -CN); κ -казеин (κ -CN); β -лактоглобулини/ варијанта А и В (β -LG/ β -LGA; β -LGB); α -лакталбумин (α -LA). Ознаке са десне стране приказују покретљивост главних казеина и серум протеина стандарда крављег млека, док ознаке са леве стране приказују покретљивост главних казеина и серум протеина козјег млека.

Код Native-PAGE електрофореграма се види утицај термичког третмана, и то због значајног смањења интензитета трака α -LA и β -LG због њихове денатурације и учешћа у формирању WP/CN комплекса (узорци 4-6 на обе слике) (Pesic et al., 2012).

Траке протеинских профила мешавина полисахаридних екстраката обе гљиве, као и воденог екстракта *L. sulphureus* су дифузне и мање јасне, што може бити последица слабих интеракција конституената екстраката и казеина које су видљиве једино у

нативним условима. У литератури се могу наћи подаци да између глукана и протеина постоје електростатичке интеракције које доводе до формирања агрегата, али да ове интеракције зависе од структуре глукана и протеина, рН вредности средине, јонске јачине, термичког третмана, итд. (Diemer et al., 2012; Sarantis et al., 2021; Zielke et al., 2018, 2019). На пример, показало се да слабо разгранати глукани са доста α -(1,6) веза и високом молекулском масом у млеку реагују са κ -CN, али не и са β -LG (Diemer et al., 2012). Такође се за формирање стабилнијих агрегата препоручује термички третман, јер више температуре утичу на интензивније интеракције и стабилизацију електростатичким интеракцијама и водоничним везама (Sarantis et al., 2021).

Смањење трака β -CN и α S₂-CN, као и присуство специфичних полипептида насталих протеолитичким дејством воденог екстракта *A. blazei* (означени звездицама) су видљиви и на Native-PAGE електрофореграмима (узорци 3, 6, 9, 12; слика 4.9).

Само на електрофореграму узорака са *L. sulphureus* су видљиве траке нискомолекулских полипептида на узорцима 5, 6 и 12 (слика 4.10), којих нема код узорака са *A. blazei*. Траке слабијег интензитета се јављају код узорка TRMPL (узорак 5 на електрофореграму, слика 4.10), док су код узорака TRMVL и TCNVL (узорци 6 и 12 на електрофореграму, слика 4.10) јачег интензитета. Највероватније се ради о пептидима пореклом из *L. sulphureus* или ензимским продуктима хидролизе која се одвија у мешавинама на бази термички третираног млека и казеина, али су за њихову идентификацију потребне додатне анализе.

4.4. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива

FTIR анализе су спроведене како би се потврдило присуство појединачних компонената у узорцима, као и да би се добиле додатне информације везане за потенцијалне интеракције конституената мешавина. У оквиру целог спектра ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$) може се уочити доста пикова (слике 4.11. и 4.15.). За испитиване мешавине, најзначајнији спектрални региони били су: $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ (регион I – амидни регион I), $1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ (регион II - амидни регион II), $1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ (регион III - амидни регион III) и $1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$ (регион IV – регион отиска прста, угљено-хидратни регион).

РСА (анализа главних компонената) је прво примењена на област $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$, како би се уочиле потенцијалне разлике између свих узорака. Због детаљнијег испитивања структурних промена протеина млека након термичког третмана, као и због испитивања могућих интеракција, РСА је примењена засебно на сваки од четири региона (Роровић Минић et al., 2023). Осим РСА анализа свих узорака млека и казеина и њихових мешавина са екстрактима гљива (слике 4.12. и 4.16.), засебно је урађена РСА анализа FTIR спектра казеина и мешавина екстраката гљива са узорцима казеина (слике 4.13. и 4.17.), као и спектра млека и мешавина екстраката гљива са узорцима млека (слике 4.14. и 4.18.) за поменуте регионе.

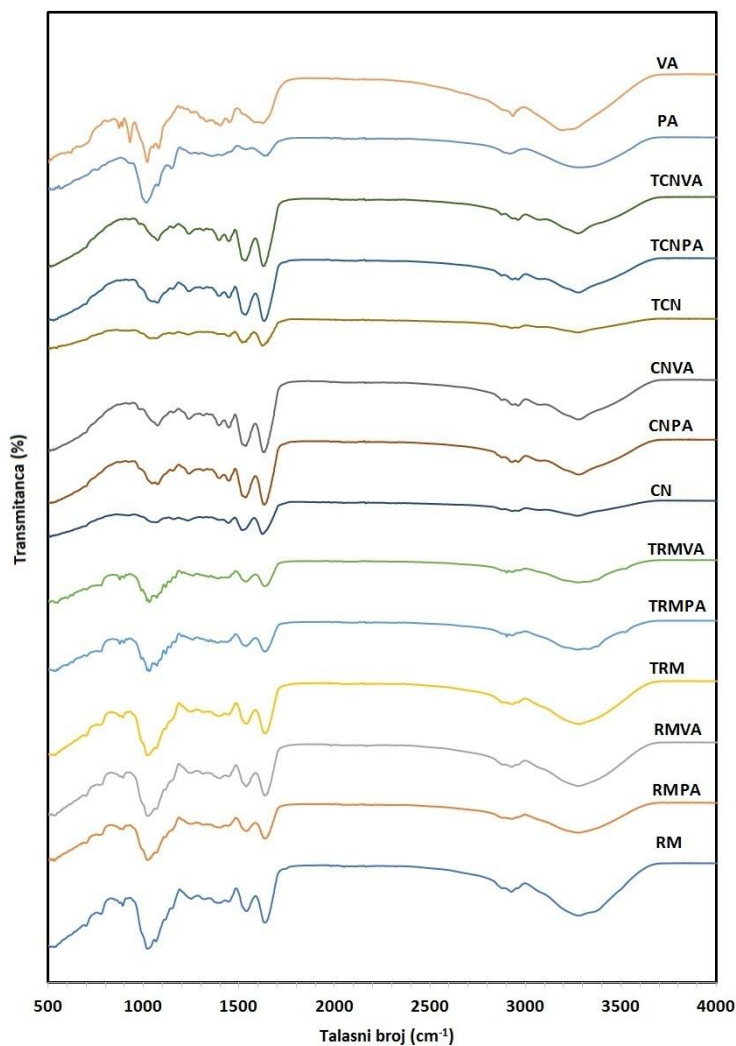
4.4.1. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A.blazei*

Спектри мешавина са *A.blazei* у региону $1700 - 700 \text{ cm}^{-1}$ (слика 4.12.a,b) су подвргнути РСА анализи. Резултати су показали да PC1 (*Principal Component 1*; главна компонента 1) објашњава 96% укупне варијансе, а PC2 (*Principal Component 2*; главна компонента 2) 2%. Овде се јасно може видети раздвајање млека и мешавина на бази млека (RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *A.blazei*) у односу на узорке казеина и њихових мешавина (CN, TCN и њихове мешавине са екстрактима *A.blazei*) дуж правца PC1. Ово раздвајање заснива се на бази различитих протеинских профила узорака на бази млека и на бази казеина, што је у складу са електрофоретским анализама (поглавље 4.3.).

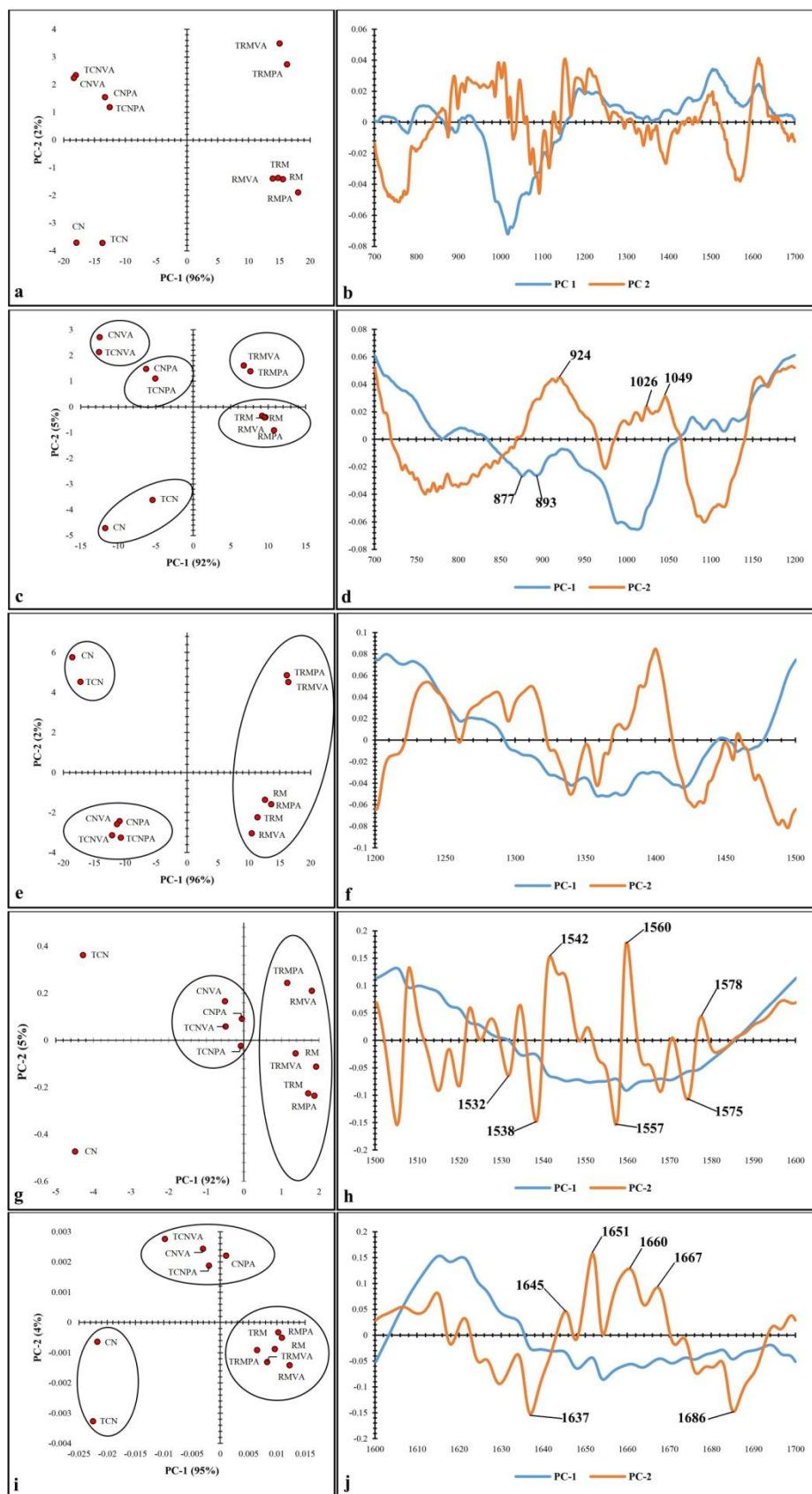
У региону I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$) који обухвата протеине у амидном региону I, односно истежуће вибрације C=O групе, PC1 и PC2 објашњавају 95% и 4% укупне варијансе, респективно (слика 4.12.i). На основу PC1 и PC2 може се извршити подела узорака на три групе: А (CN и TCN), В (мешавине CN и TCN са екстрактима *A.blazei*) и С (RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *A.blazei*).

Регион II ($1600 - 1500 \text{ cm}^{-1}$; амидни регион II) обухвата деформационе N–H вибрације у равни и C–N истежуће вибрације. У овом региону PC1 и PC2 објашњавају 92% и 5% укупне варијансе, респективно (слика 4.12.g). Подела узорака у овом региону на бази обе главне компоненте је слична као код региона I. Може се извршити иста класификација код група В и С, а не може се говорити о групи А, јер су узорци CN и TCN раздвојени на основу таласних трака на $1535-1542$; $1557-1560$; $1575-1578 \text{ cm}^{-1}$ (слика 4.12.h). Ово указује на промене секундарне структуре протеина попут β -окрета, α -хеликса/петље и β -равни, које се јављају као последица промене структуре мицеле услед термичког третмана. (Grewal et al., 2017b).

Регион III ($1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$; амидни регион III) је такође повезан са секундарном структуром протеина, али се у овом региону често јављају измене везане за вибрационе режиме других супституисаних функционалних група (Grewal et al., 2017a; 2017b). Овде је на основу PC1 и PC2 (који објашњавају 96% и 2% укупне варијансе, респективно) (слика 4.12.е) извршена класификација у три групе, исто као код амидног региона I.



Слика 4.11. FTIR спектри узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*. Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*; VA – водени екстракт *A. blazei*; PA – полисахаридни екстракт *A. blazei*.



Слика 4.12. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* за спектралне регионе: (a, b) 700-1700 cm^{-1} ; (c, d) регион отиска прста, 700-1200 cm^{-1} ; (e, f) амид III, 1200-1500 cm^{-1} ; (g, h) амид II, 1500-1600 cm^{-1} ; (i, j) амид I, 1600-1700 cm^{-1} . Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје

млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.

У региону IV ($1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$; регион отиска прста, угљено-хидратни регион) је на основу PC1 и PC2 (који објашњавају 92% и 5% укупне варијансе, респективно) (слика 4.12.c) извршена класификација у пет група. Групе су обележене са: А (CN, TCN), В (TCNVA, CNVA), С (TCNPA, CNPA), D (TRMPA, TRMVA) и Е (TRM, RM, RMPA, RMVA). Мешавине на бази казеина (групе В и С) су раздвојене од осталих група на бази трака за таласне бројеве: 877; 893; 924; 1026; 1049 cm^{-1} (слика 4.12.d). У овом региону одвајању узорака доприноси присуство лактозе код узорака млека и мешавина на бази млека, тј. одсуство лактозе у казеинима и узорцима казеина. Пикови око неких од поменутих таласних бројева (893 и 924 cm^{-1}) наводе се у литератури као последица присуства α - и β -аномера глукана пореклом из гљива (Gonzaga et al., 2013; Моћабек-Грошев et al., 2001), што у овом случају одговара раздвајању мешавина са екстрактима *A. blazei* од њихових почетних узорака казеина. Мешавине на бази TRM одвојене су од мешавина на бази RM, као и од узорака млека, TRM и RM. Дакле, мешавине на бази казеина могуће је одвојити од казеина у овој области, као и према типу додатог екстракта, чему доприносе различити састави екстракта. Код мешавина на бази млека, јасно се одвајају TRMPA и TRMVA од осталих узорака. На ово указује и значајно повећање средњег дијаметра ових честица у односу на остале (слика 4.2.). Могуће је да термички третирано обезмашћено козје млеко представља најбољи протеински производ од анализираних за мешање са екстрактима *A. blazei* јер конститuentи екстракта имају највећи афинитет ка интеракцијама са TRM.

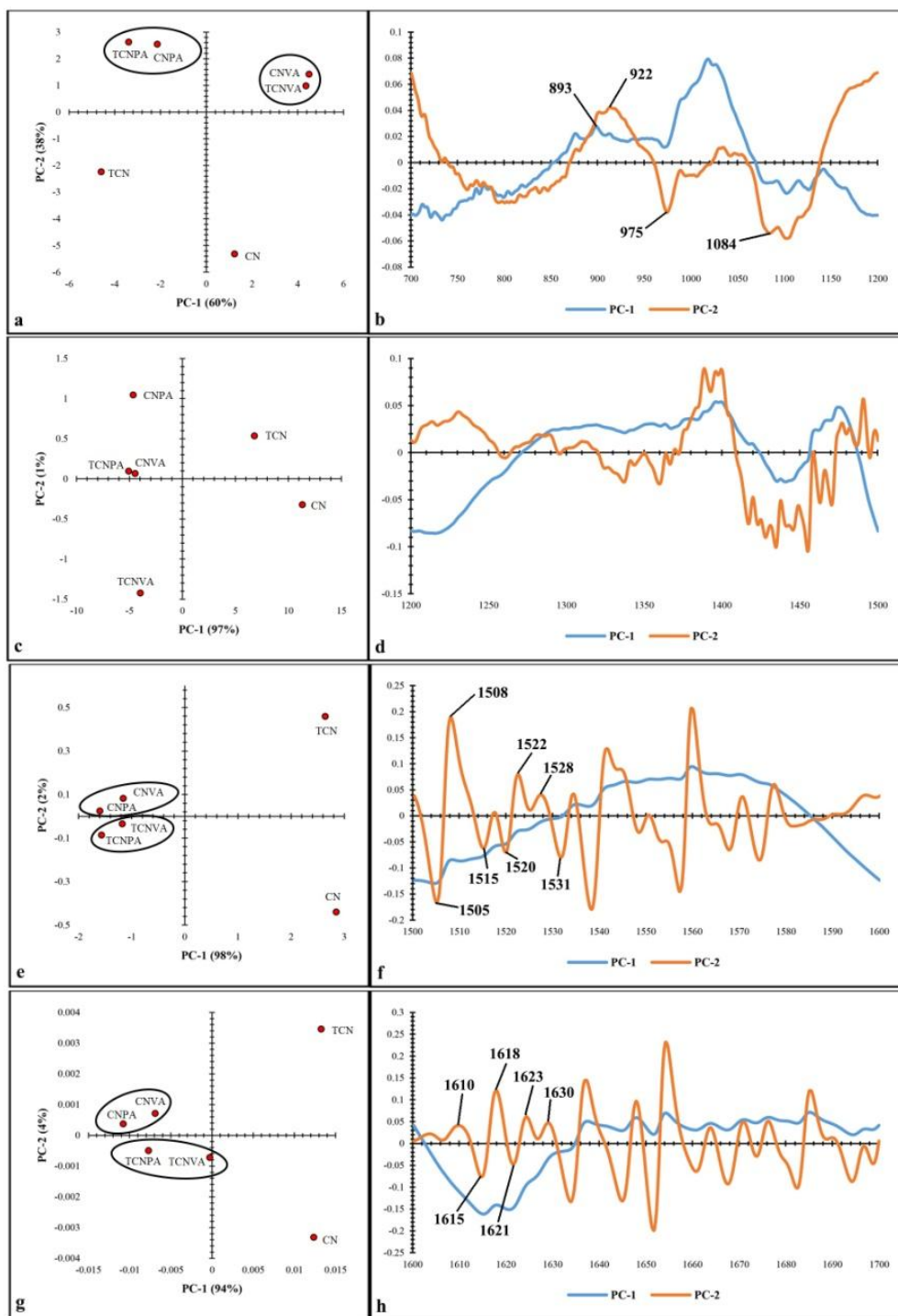
За исте регионе су урађене додатне PCA анализе FTIR спектра казеина и мешавина екстракта *A. blazei* са узорцима казеина (слика 4.13.), као и спектра млека и мешавина екстракта *A. blazei* са узорцима млека (слика 4.14.) ради бољег раздвајања и разумевања резултата.

На слици 4.13. се може уочити да су узорци CN и TCN јасно раздвојени од својих мешавина (CNPA, CNVA, TCNPA, TCNVA) дуж линије PC1 за сва три амидна региона. Ово може бити последица промене секундарне структуре казеина због интеракција са конститuentима екстракта гљива. У амидним регионима I и II узорци се могу груписати према полазним казеинским узорцима у групу А (CNPA, CNVA) и групу В (TCNPA, TCNVA) (слика 4.13.e,g). Узорци из групе А раздвојени су од осталих на бази опсега таласних бројева $1610-1630 \text{ cm}^{-1}$ у амидном региону I (слика 4.13.h) и $1508-1528 \text{ cm}^{-1}$ у амидном региону II (слика 4.13.f), док су узорци из групе В раздвојени од осталих на бази опсега таласних бројева $1615-1621 \text{ cm}^{-1}$ у амидном региону I (слика 4.13.h) и $1505-1520 \text{ cm}^{-1}$ у амидном региону II (слика 4.13.f). Трака на 1618 cm^{-1} може указивати на формирање нових интермолекулских водоничних веза, а постоје код мешавина казеина са оба типа екстракта гљива, што потврђује тврдње о потенцијалним интеракцијама (Grewal et al., 2017a).

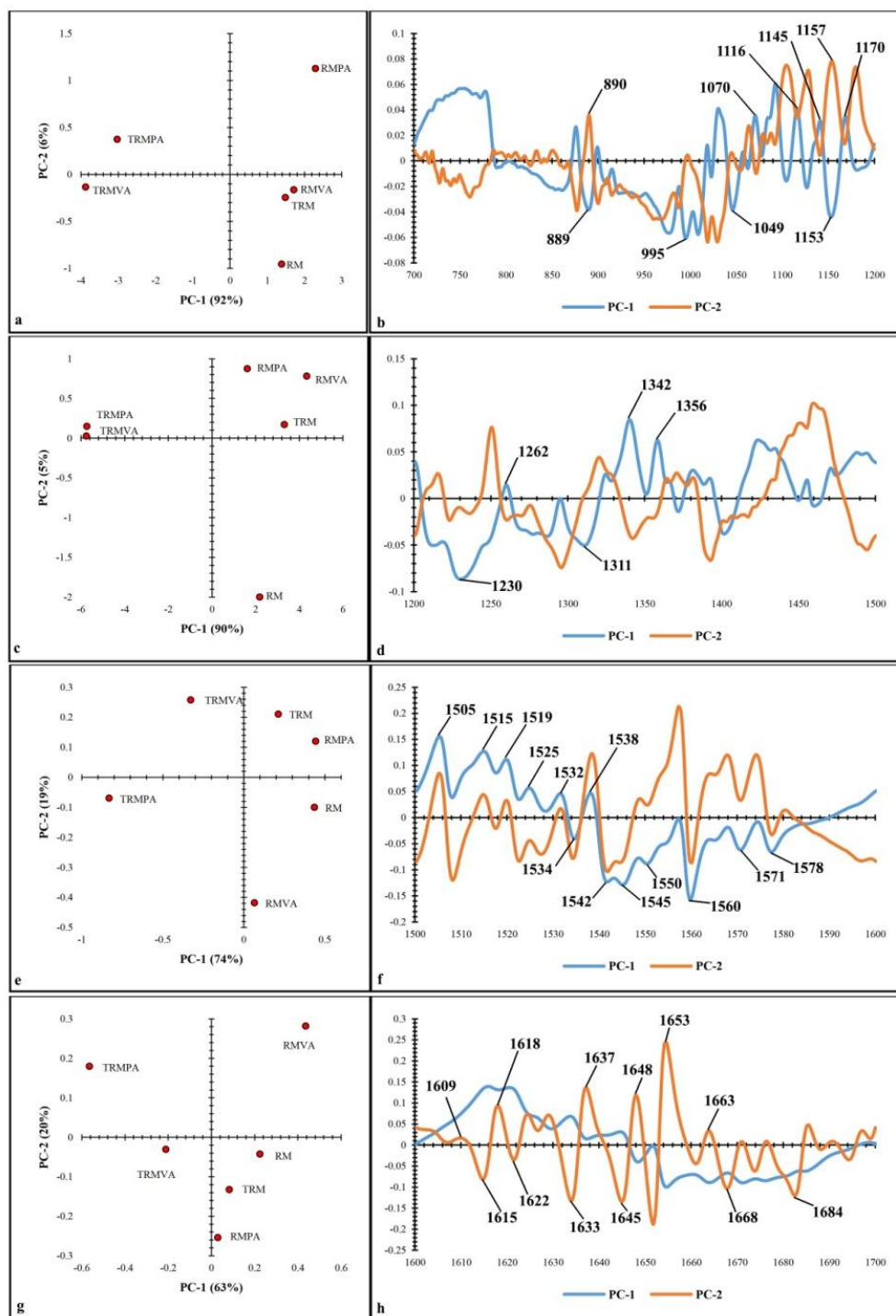
Варијације око таласних опсега 1610-1624 и 1505-1532 cm^{-1} везују се за промене структура β -плоча, око 1609 cm^{-1} показују промене бочних ланаца протеина, а око 1515 cm^{-1} указују на вибрације остатака тирозина и њихово међусобно повезивање (Grewal et al., 2017a; 2017b; Markoska et al., 2019a, 2019b).

И у региону IV, региону отиска прста, узорци казеина (CN и TCN) су раздвојени од мешавина, које се могу груписати у две групе, али у овом региону према типу додатог екстракта, где једну групу чине CNPA и TCNPA, а другу CNVA и TCNVA (слика 4.13.a). Дакле, у три амидна региона раздвајања мешавина су била према типу казеина на бази кога су направљене, односно промене у протеинској структури након термичког третмана (CN \rightarrow TCN) су биле кључне. У угљено-хидратном региону се види разлика, односно овде се мешавине раздвајају на бази додатог екстракта, јер је њихов биохемијски састав различит. И овде се јасно види присуство оба аномера глукана на основу трака на 893 и 922 cm^{-1} (слика 4.13.b), што се слаже са литературним подацима (Gonzaga et al., 2013; Mohaček-Grošev et al., 2001). Пошто је к-казеин *O*-гликозилован галактозом, *N*-ацетилгалактозамином и *N*-ацетилнеураминском киселином, могуће је формирање водоничних веза (1084 cm^{-1}) између к-казеина и глукана (Andrade et al., 2019; González-Morelo et al., 2020; Holland & Boland, 2014).

Додатне анализе мешавина екстраката *A. blazei* са узорцима млека (RM, TRM) (слика 4.14.) показују да су у сва четири региона узорци TRMPA и TRMVA раздвојени дуж линије PC1 од остала 4 узорка. Ипак, треба узети у обзир и то да су ова два узорка раздвојени један од другог у свим регионима осим региона амид III по линији PC2. Генерално се може приметити раздвајање узорака на основу хетерогености њихових биохемијских састава и термичког третмана, што се види по присуству узорака у сва четири квадранта. Такође, узимајући у обзир 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. Због овога се RM и TRM не могу јасно раздвојити од својих мешавина. На основу трака у амидним регионима I и II за таласне бројеве означене на сликама 4.14.h и 4.14.f, респективно, може се видети утицај термичког третмана, као и додатка екстраката *A. blazei* на конформацију протеина. Ово је у складу са литературним подацима, где се варијације око таласних бројева приписују различитим променама у секундарној структури протеина – 1668 и 1663 cm^{-1} (β -окрет); 1653 cm^{-1} (α -хеликс/петља); 1645-1648 cm^{-1} (случајни структурни намотаји), 1633 cm^{-1} (интрамолекуларне β -равни), 1624-1610 cm^{-1} (интермолекуларне β -равни), 1609 cm^{-1} (бочни ланци) (Grewal et al., 2017a; 2017b; Markoska et al., 2019a, 2019b). Трака на 1618 cm^{-1} и овде указује на постојање потенцијалне водоничне везе (Grewal et al., 2017a). Студија Markoska et al. (2019a) показала је да се у неконцентрираном млеку (9% w/w) промене у структури β -плоча код β -лактоглобулина дешавају на нижим температурама (85°C) у односу на концентровано млеко (95°C и вишим). Већ поменута трака на 1663 cm^{-1} указује на формирање β -окрета, што се дешава током денатурације и агрегације β -лактоглобулина (Markoska et al., 2019a). Ово потврђује добијене резултате, јер се термички третман млека у овој студији налази у средини поменутих третмана (90°C), а ради се о 10% млеку (RM, TRM).



Слика 4.13. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорка казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, $700-1200\text{ cm}^{-1}$; (c, d) амид III, $1200-1500\text{ cm}^{-1}$; (e, f) амид II, $1500-1600\text{ cm}^{-1}$; (g, h) амид I, $1600-1700\text{ cm}^{-1}$. Скраћенице: CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.



Слика 4.14. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорака млека и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei* за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, $700-1200\text{ cm}^{-1}$; (c, d) амид III, $1200-1500\text{ cm}^{-1}$; (e, f) амид II, $1500-1600\text{ cm}^{-1}$; (g, h) амид I, $1600-1700\text{ cm}^{-1}$. Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*.

Траке у регионима $1560\text{-}1578\text{ cm}^{-1}$; $1542\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$; $1505\text{-}1532\text{ cm}^{-1}$ указују на промену структуре β -плоча, α -хеликса/петљи, β -равни; трака на 1571 cm^{-1} показује вибрације остатак аспарагина и глутамин, а трака на 1515 cm^{-1} вибрације тирозина (Grewal et al., 2017a; 2017b). Ово се поклапа и са тракама у амидном региону III у опсегу $1230\text{-}1356\text{ cm}^{-1}$, што такође указује на промену структура α -хеликса и β -плоча насталих агрегацијом протеина (Grewal et al., 2017a). У овом региону PC1 објашњава 90% варијансе (слика 4.14.c) и јасно одваја узорке TRMPA и TRMVA од осталих, могуће због хидрофобних интеракција или водоничних веза које се јављају код поменутих мешавина (Guerrero et al., 2014).

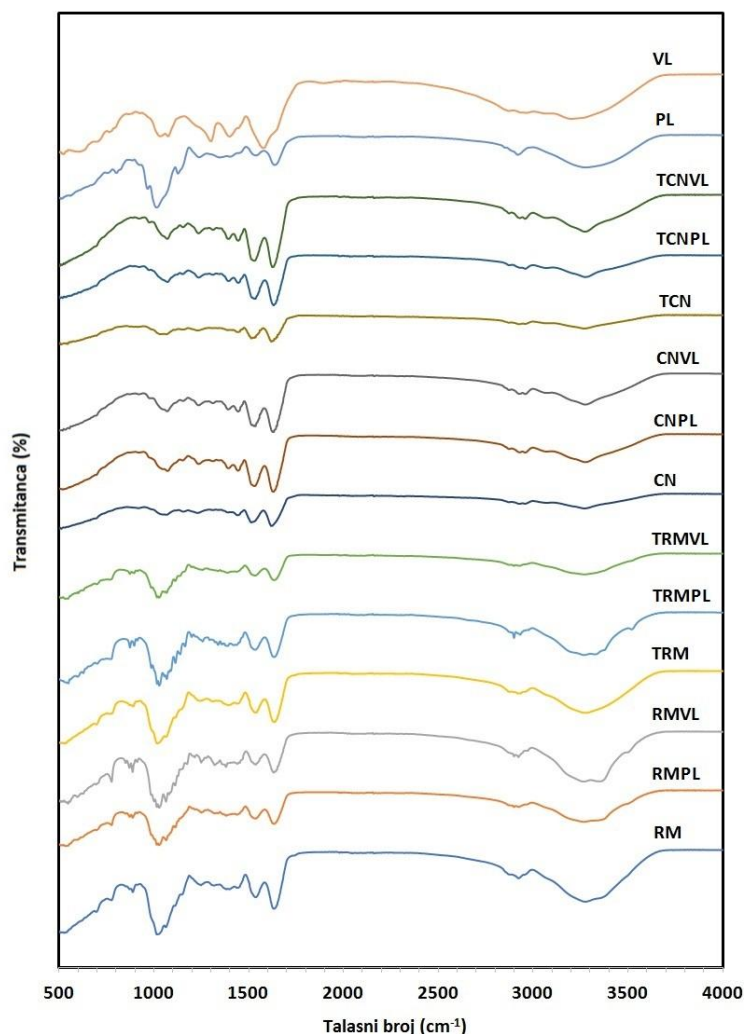
Исто раздвајање узорака TRMPA и TRMVA од осталих примећује се и у региону IV, где PC1 објашњава чак 92% варијансе (слика 4.14.a). Претпоставка је да су разлог специфичне интеракције између WP/CN комплекса и глукана. Интеракције мењају вибрације одређених група, па на овај начин доприносе класификацији, тј. оваквој подели узорака. Присуство фосфатних група казеина се види по тракама на таласним бројевима 995 ; 1070 ; 1116 cm^{-1} са благим померањима у односу на литературу која испитује кравље, а не козје млеко, као и због потенцијалних водоничних веза између фосфатних група казеина и OH група глукана (Grewal et al., 2017a; Markoska et al., 2019a). Генерално посматрано, регион $1250\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ је везан за различите C–O вибрације угљених хидрата, укључујући и глукане пореклом из екстраката гљива, где се траке у опсегу $1175\text{-}1140$ и $1000\text{-}920\text{ cm}^{-1}$ јављају због истежућих вибрација C–O–C ланца угљених хидрата или због потенцијалних гликозидних веза између глукана и O-гликозилованог κ -казеина (Gonzaga et al., 2013; Grewal et al., 2017a; 2017b; Kozarski et al., 2011; Mohaček-Grošev et al., 2001; Nikonenko et al., 2000).

4.4.2. FTIR карактеризација козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*

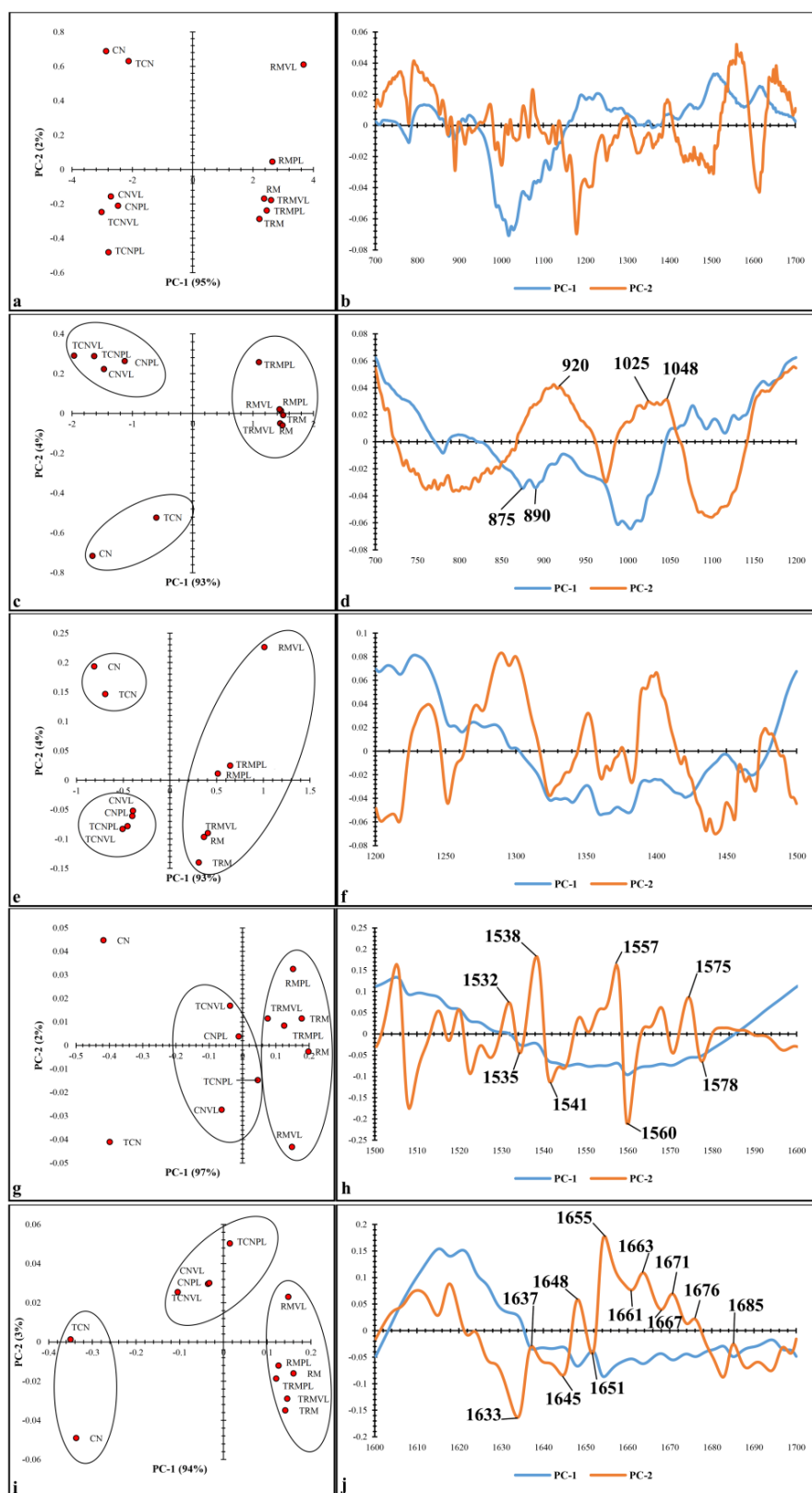
Спектри мешавина са *L. sulphureus* у региону $1700\text{ – }700\text{ cm}^{-1}$ (слика 4.16.a,b) такође су подвргнути PCA анализи. PC1 објашњава 95% укупне варијансе, док PC2 објашњава 2%. И овде се дуж правца PC1 види раздвајање млека и мешавина на бази млека (RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *L. sulphureus*) у односу на узорке казеина и њихових мешавина (CN, TCN и њихове мешавине са екстрактима *L. sulphureus*), што је последица различитих протеинских профила млека и казеина. Као што је већ наведено, код мешавина на бази казеина (реконституисани као 2%) је већи однос полисахарида пореклом из гљива према протеинима у односу на мешавине на бази млека (реконституисане као 10%), па ово може имати већи утицај на раздвајање CN и TCN од њихових мешавина, док се RM и TRM не могу раздвојити од својих мешавина.

У амидном региону I ($1700\text{ – }1600\text{ cm}^{-1}$) PC1 и PC2 објашњавају 94% и 3% укупне варијансе, респективно (слика 4.16.i). И овде се може извршити подела на три групе: А (CN и TCN), В (мешавине CN и TCN са екстрактима *L. sulphureus*) и С (RM, TRM и њихове мешавине са екстрактима *L. sulphureus*), слично мешавинама млека и казеина са екстрактима *A. blazei*.

У амидном региону II ($1600\text{ – }1500\text{ cm}^{-1}$) PC1 и PC2 објашњавају 97% и 2% укупне варијансе, респективно (слика 4.16.g). Овде се може уочити слична ситуација као код амидног региона I, тј. могу се видети групе В и С, али су узорци CN и TCN раздвојени и не могу се сврстати у засебну групу. Као код мешавина са *A. blazei*, ово се вероватно дешава због промена у секундарној структури протеина након термичког третмана, што потврђују траке на 1535 , 1538 , 1541 , 1557 , 1560 , 1575 , 1578 cm^{-1} (Grewal et al., 2017b).



Слика 4.15. FTIR спектри узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus*. Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TCNVL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; PL – полисахаридни екстракт *L. sulphureus*.



Слика 4.16. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорака млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* за спектралне регионе: (a, b) 700-1700 cm^{-1} ; (c, d) регион отиска прста, 700-1200 cm^{-1} ; (e, f) амид III, 1200-1500 cm^{-1} ; (g, h) амид II, 1500-1600 cm^{-1} ; (i, j) амид I, 1600-1700 cm^{-1} . Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*.

нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TCNVL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.

У амидном региону III ($1500 - 1200 \text{ cm}^{-1}$) на основу PC1 и PC2 (који објашњавају 93% и 4% укупне варијансе, респективно; слика 4.16.е) могуће је извршити класификацију на исте групе као код амидног региона I, што се поклапа са амидним регионима I и III код мешавина са *A. blazei*. У амидним регионима I, II и III могу се видети траке око $1637, 1645, 1570, 1541, 1417 \text{ cm}^{-1}$, што се са благим померањима у литератури наводи као присуство резидуалних протеина у екстрактима гљива (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2011). Вибрације протеина гљива не могу се раздвојити од вибрација протеина млека, али је сигурно да њихово присуство у воденим екстрактима гљива, као и присуство различитих полисахарида у полисахаридним екстрактима гљива доприноси раздвајању мешавина од полазних узорка.

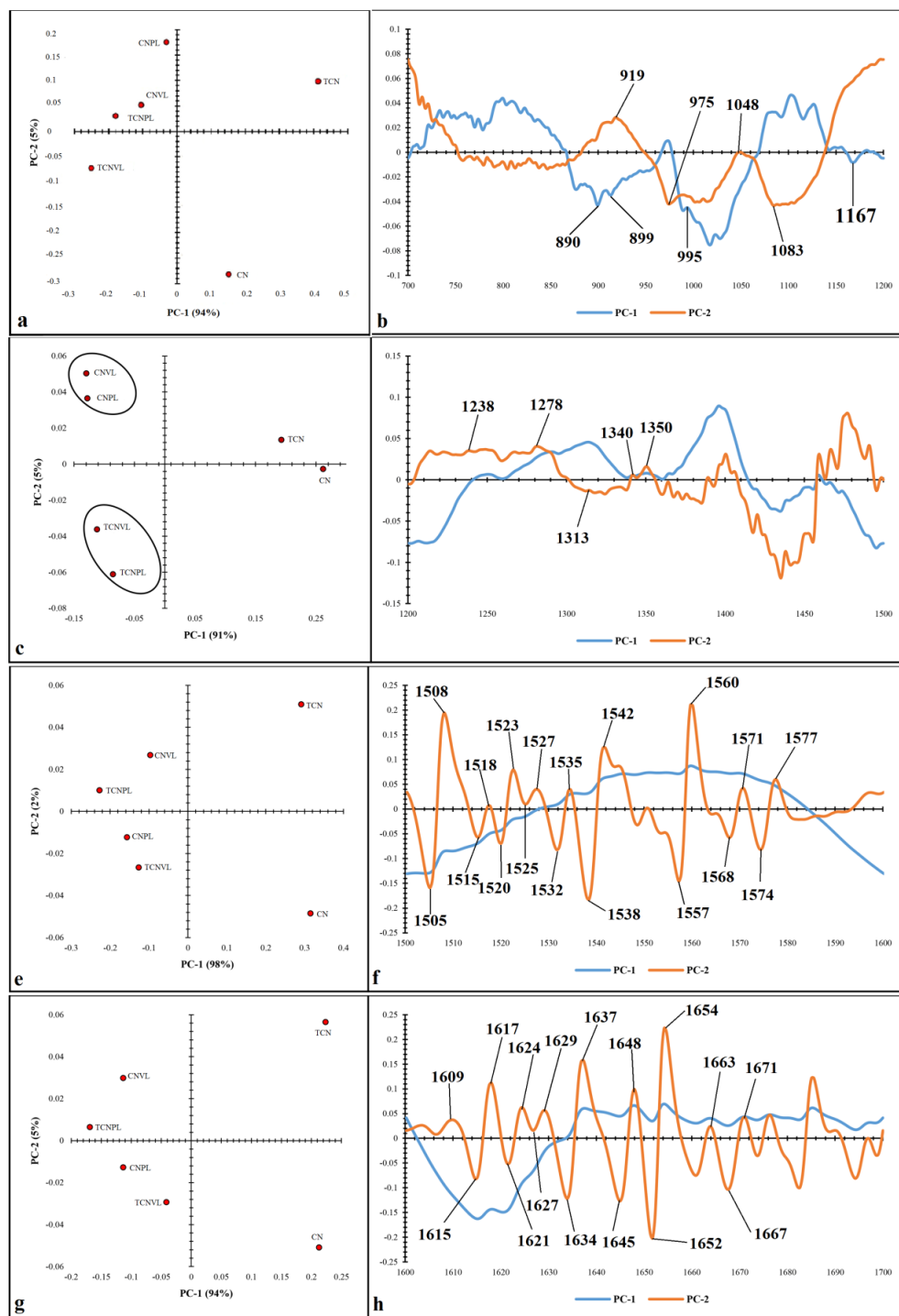
У региону IV ($1200 - 700 \text{ cm}^{-1}$; регион отиска прста, угљено-хидратни регион) PC1 и PC2 објашњавају 93% и 4% укупне варијансе, респективно (слика 4.16.с). Овде се налази на одређене разлике у односу на аналогне мешавине са *A. blazei*. Узорци се могу поделити на три групе, исте као код амидних региона I и III. За разлику од *A. blazei*, где су узорци класификовани у пет група, овде нпр. није могуће одвојити мешавине на бази TRM од полазног узорка (TRM). Такође се не могу раздвојити мешавине казеина са воденим екстрактом *L. sulphureus* (TCNVL, CNVL) од мешавина казеина са полисахаридним екстрактом *L. sulphureus* (TCNPL, CNPL), већ заједно чине групу B, вероватно због хетерогености састава екстракта. Овде се такође врши одвајање према одсуству или присуству лактозе код казеина и мешавина на бази казеина и млека и мешавина на бази млека. На одвајање CN и TCN од њихових мешавина утицаја имају и полисахариди гљива. За разлику од *A. blazei*, у овом региону појављују се јасно изражене траке око 988 cm^{-1} , што се у литератури наводи као јак сигнал за целулозу и глукане, као и траке око 1003 cm^{-1} и 1016 cm^{-1} , што може указивати на присуство других полисахарида (Liu et al., 2021). Liu et al. (2021) наводе да је интензитет трака око 1016 cm^{-1} јак у присуству ксилозе и веома јак у присуству манозе, а интензиван сигнал између $1010 - 1040 \text{ cm}^{-1}$ може указивати на присуство ксилоглукозе. Овде се такође може видети трака на 1056 cm^{-1} , чији се интензитет у литератури наводи као веома јак у присуству галактозе (Liu et al., 2021). Ово је у складу са литературом, где су у *L. sulphureus* пронађени маноза и галактоза уз глукане (Hwang et al., 2008), галактоманоглукани растворљиви у води (Olennikov et al., 2009b), као и разгранати фукоманогалактан (Alquini et al., 2004). Траке око карактеристичних таласних бројева за α - и β -гликозидне везе су такође присутни, али дају само квалитативну информацију, док њихов интензитет не одговара заступљености ових веза у полисахаридима (Klaus et al., 2013).

За исте регионе су урађене додатне PCA анализе FTIR спектра казеина и мешавина екстракта *L. sulphureus* са узорцима казеина (слика 4.17.), као и спектра млека и мешавина екстракта *L. sulphureus* са узорцима млека (слика 4.18.) ради бољег раздвајања и тумачења резултата.

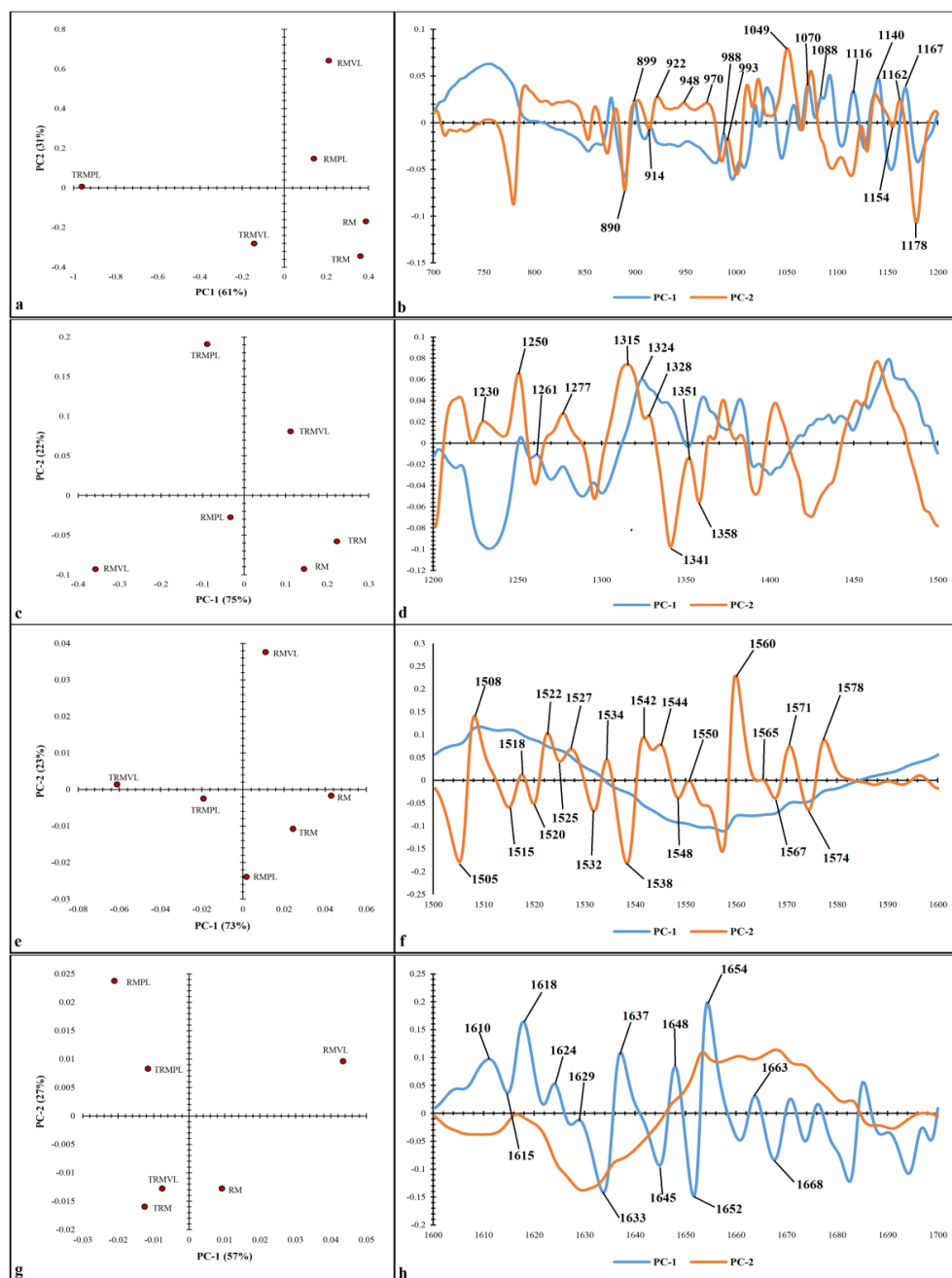
На слици 4.17. може се видети да су у сва четири региона узорци CN и TCN јасно раздвојени од својих мешавина дуж линије PC1, посебно за амидне регионе I, II и III, где PC1 објашњава 94%, 98% и 91% укупне варијансе, респективно. У амидном региону I овом раздвајању су највише допринеле траке на: 1609, 1615, 1617, 1621, 1624, 1627, 1629, 1634, 1637, 1645, 1648, 1652, 1654, 1663, 1667, 1671 cm^{-1} , док су за амидни регион II раздвајању допринеле траке на: 1505, 1508, 1515, 1518, 1520, 1523, 1525, 1527, 1532, 1535, 1538, 1542, 1557, 1560, 1568, 1571, 1574, 1577 cm^{-1} (слика 4.17.h,f). Као код аналогних региона за мешавине са *A. blazei*, варијације око 1610-1624; 1645-1648 cm^{-1} ; 1653, 1663 и 1668 cm^{-1} , као и 1560-1578 cm^{-1} ; 1542-1550 cm^{-1} ; 1505-1532 cm^{-1} ; 1515, 1517 cm^{-1} показују да је дошло до промене различитих облика секундарне структуре протеина, као и на постојање водоничних веза (1618 cm^{-1}), што може указивати на постојање интеракција, али се овде због сложености биохемијског састава не може рећи са сигурношћу између којих конституената (Grewal et al., 2017a; 2017b; Markoska et al., 2019a, 2019b). Не може се говорити о груписању CN и TCN у исту групу, осим код региона амид III. Овде је могуће груписати мешавине на бази CN (група А, узорци CNGL, CNVL) и мешавине на бази TCN (група В, узорци TCNGL, TCNVL) (слика 4.17.c). Као и код амидних региона I и II, и овде траке у региону 1230-1356 cm^{-1} указују на промену секундарне структуре протеина (слика 4.17.d) и промену структура α -хеликса и β -плоча насталих агрегацијом протеина (Grewal et al., 2017a). Слично као и на слици 4.16, већи удео полисахарида гљива у односу на протеине код мешавина на бази казеина у поређењу са мешавинама на бази млека и овде утиче на боље раздвајање CN и TCN од њихових мешавина.

И у региону IV видљиво је раздвајање узорака казеина (CN, TCN) од мешавина (слика 4.17.a), вероватно због присуства различитих полисахарида пореклом из екстраката гљива. Траке на 890 и 919 cm^{-1} са благим померањима и овде указују на присуство α - и β -глюкана (слика 4.17.b) (Gonzaga et al., 2013; Моћаћек-Грошев et al., 2001), али се овде у односу на исти регион код мешавина на бази *A. blazei* (слика 4.13.b) може видети присуство већег броја различитих трака, што указује на разнолик полисахаридни састав. Могу се уочити траке око таласних бројева које су у литератури присутне код моносахарида различитих од глукозе, као нпр. 1016 cm^{-1} (јак интензитет за ксилозу, врло јак интензитет за манозу); 1122 cm^{-1} (1123 cm^{-1} наведено као јак интензитет траке код присуства ксилозе); 1112 cm^{-1} (1110 cm^{-1} јак интензитет за манозу) (Liu et al., 2021). Траке у регионима 1175-1140 и 1000-920 cm^{-1} могу указивати на вибрације ланаца угљених хидрата или потенцијалне полисахарид-казеин интеракције, што се не може са сигурношћу одредити због хетерогеног састава екстраката (Gonzaga et al., 2013; Grewal et al., 2017a; 2017b; Kozarski et al., 2011; Моћаћек-Грошев et al., 2001; Nikonenko et al., 2000).

На слици 4.18. се налазе додатне анализе спектра млека и мешавина екстраката *L. sulphureus* са узорцима млека (RM, TRM). Овде раздвајања дуж линије PC1 нису тако јасно изражена као на сликама 4.16. и 4.17, јер PC1 објашњава мањи проценат укупне варијансе у односу на друге случајеве (57%; 73%; 75%; 61% за регионе I, II, III и IV, респективно). Овде се може приметити да се сви узорци раздвајају једни од других, има их у свим квадрантима у сваком региону, па одсуство груписања указује на хетерогеност узорака.



Слика 4.17. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорка казеина и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, $700-1200\text{ cm}^{-1}$; (c, d) амид III, $1200-1500\text{ cm}^{-1}$; (e, f) амид II, $1500-1600\text{ cm}^{-1}$; (g, h) амид I, $1600-1700\text{ cm}^{-1}$. Скраћенице: CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; CNVL – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPL – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TCNVL - мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.



Слика 4.18. Графици објеката и варијабли изведени из FTIR спектра узорка млека и њихових мешавина са екстрактима *L. sulphureus* за спектралне регионе: (a, b) регион отиска прста, 700-1200 cm^{-1} ; (c, d) амид III, 1200-1500 cm^{-1} ; (e, f) амид II, 1500-1600 cm^{-1} ; (g, h) амид I, 1600-1700 cm^{-1} . Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; RMVL – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*; TRMVL – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*.

Раздвајању доприносе биохемијски састави екстракта *L. sulphureus*, односно присуство протеина у великој концентрацији код VL, разнолики полисахаридни састав, као и термички третман млека. Само се код амидног региона II може приметити

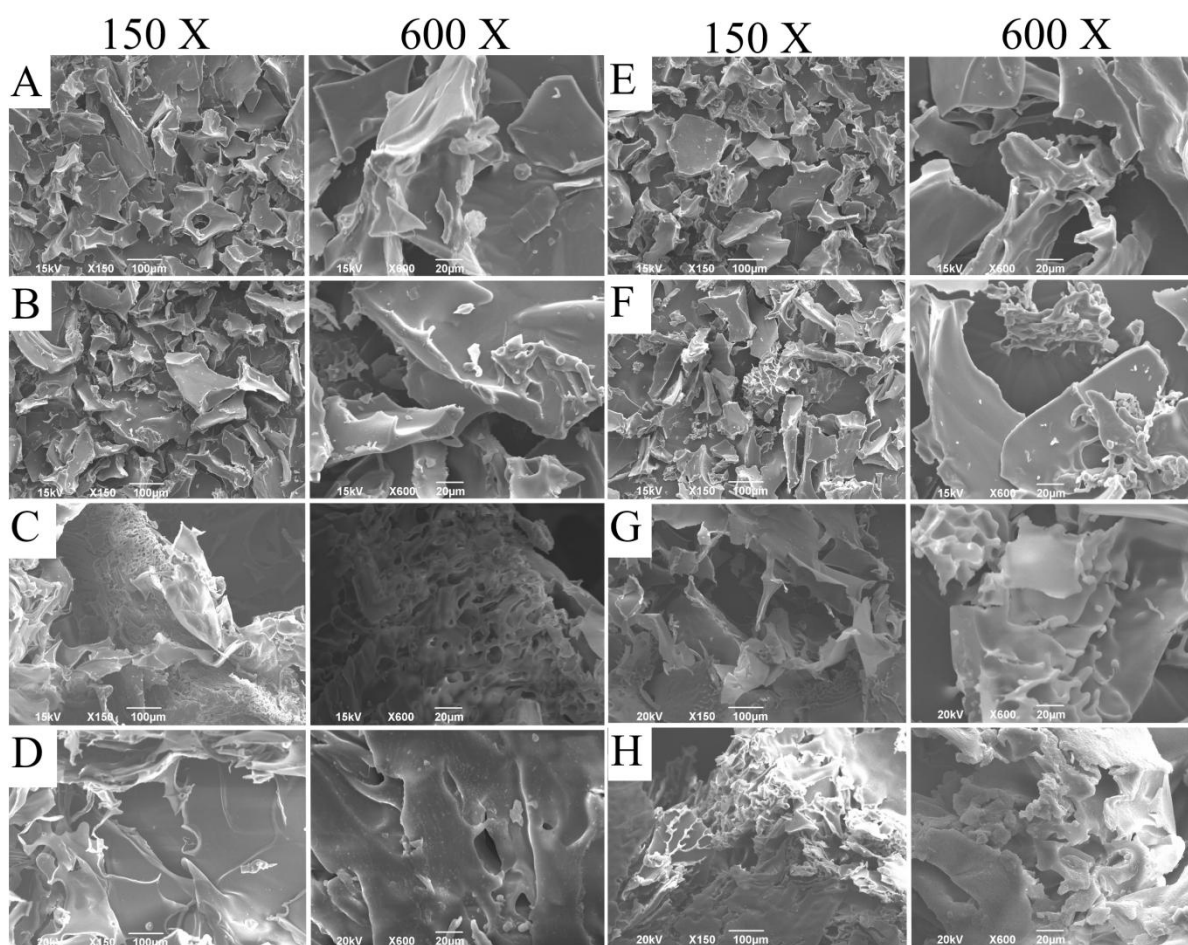
одвајање мешавина на бази термички третираног млека – TRMPL и TRMVL од осталих узорака на основу трака код следећих таласних бројева: 1505, 1508, 1515, 1518, 1520, 1522, 1525, 1527, 1532, 1534, 1538, 1542, 1544, 1548, 1550, 1560, 1565, 1567, 1571, 1574, 1578 cm^{-1} (слика 4.18.f). Могуће је да постоје интеракције између конституената мешавина због трака у регионима 1560-1578 cm^{-1} ; 1542-1550 cm^{-1} ; 1505-1532 cm^{-1} ; 1515, 1518 cm^{-1} , али се због хетерогености састава узорака не може рећи којих нити говорити о њиховом интензитету (Grewal et al., 2017a; 2017b; Markoska et al., 2019a, 2019b). Велике разлике између узорака могу се видети код амидних региона I и II, где су TRMPL и TRMVL, као и RMPL и RMVL увек раздвојени дуж различитих PC линија.

У региону IV се види да су узорци TRMPL и TRMVL раздвојени од осталих дуж линије PC1 (слика 4.18.a), мада се не може говорити о њиховом груписању јер су један од другог раздвојени дуж линије PC2. И овде се може приметити већи број трака у односу на мешавине на бази *A.blazei*, вероватно због присуства полисахарида различитих од глукана (слика 4.14.b). Траке око таласних бројева 890, 899, 914, 922, 988, 1015, 1049, 1070, 1140, 1154, 1162, 1167, 1178 cm^{-1} (слика 4.18.b) указују на присуство оба аномера глукана, потенцијално манозу и/или ксилозу, лактозу, фосфатне групе казеина, вибрације ланаца угљених хидрата, потенцијалне гликозидне и/или водоничне везе између полисахарида и казеина, итд. (Gonzaga et al., 2013; Grewal et al., 2017a; 2017b; Kozarski et al., 2011; Liu et al., 2021; Markoska et al., 2019a; Mohaček-Grošev et al., 2001; Nikonenko et al., 2000).

Узимајући у обзир састав свих мешавина на бази *L. sulphureus* – висок садржај протеина у воденом екстракту, полисахариде различите од глукана, хетерогеност свих узорака коју показују резултати мерења величине честица (поготово CNPL, CNVL и TCNPL), присуство нискомолекулских пептида код неких мешавина (TRMPL, TRMVL, TCNVL), може се рећи да уколико има интеракција, оне су врло сложене. На основу досадашњих резултата, не може се са сигурношћу рећи каквим везама би који конституенти могли ступати у интеракције са другима, пошто су потенцијалне комбинације разноврсне, нити се може дискутовати о степену оваквих интеракција. Овакви закључци захтевају даља истраживања.

4.5. Микроструктура мешавина козјег млека и казеина са екстрактима гљива

На слици 4.19. су приказане микроструктуре мешавина млека и казеина са екстрактима *A. blazei* снимљене скенирајућим електронским микроскопом. Анализиране су слике под различитим увећањима – 150 X и 600 X. На свим сликама је уочљива неправилна структура. Видљива је разлика између мешавина на бази млека (слика 4.19; А, В, Е, F) и мешавина на бази казеина (слика 4.19; С, D, G, H). Мешавине на бази млека имају изглед разбијеног стакла, тј. личе на неправилне љуспице због акумулације протеина преко угљених хидрата током лиофилизације, што је у складу са литературним подацима везаним за лиофилизоване узорке млека (Deshwal et al., 2020; Rojas-Candelas et al., 2019; Saha et al., 2022; Zou et al., 2022), затим мешавине протеина млека и лактозе (Haque & Roos, 2006) или мешавине протеина и угљених хидрата (Millqvist-Fureby et al., 1999).



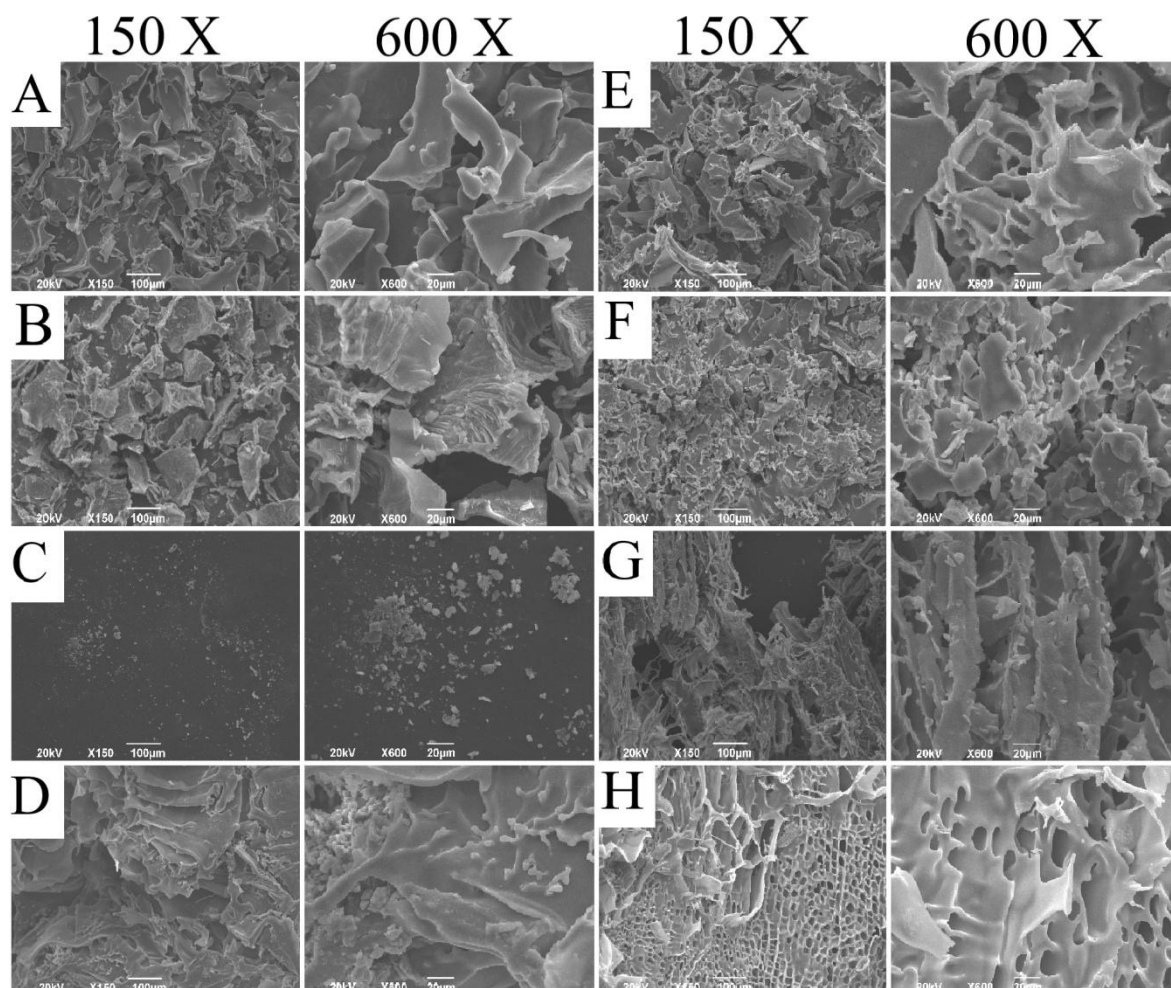
Слика 4.19. Микроструктура мешавина млека и казеина са полисахаридним екстрактом *A. blazei* (A-D) и воденим екстрактом *A. blazei* (E-H). Лева колона: увећање 150X; десна колона: увећање 600X. Узорци: А - RMPA (мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*); В - TRMPA (мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*); С - CNPA (мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*); D - TCNPA (мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*); Е - RMVA (мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*); F - TRMVA (мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*); G - CNVA (мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*); H - TCNVA (мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*).

Дехидратациони корак током припреме узорака резултује структурним деформацијама, па се сматра маном код SEM методе (Ayala-Hernandez et al., 2008). Без обзира на примењену технику микроскопије, припрема узорка подразумева кораке као што су дехидратација, замрзавање или облагање металима, што омета посматрање казеинске мицеле у нативном стању (Bahri et al., 2017). Аутори препоручују лиофилизацију у односу на сушење у вакууму или ваздухом у контексту антиоксидативности и полисахаридног састава (Wu et al., 2014). Иако се након спреј-сушења млека могу добити униформније и правилније честице (de Oliveira et al., 2021), предност је дата лиофилизацији због формулације адитива са очуванијим функционалним својствима. Код обезмашћеног млека нема присуства масти која делује као заштитни слој и спречава кретање воде, па структура није глатка као код пуномасног млека (Habtegebriel et al., 2018). Најмање, најсјајније честице неправилног облика на површини љуспица могу бити кристали лактозе, који због своје структуре интензивно рефлектују светлост (Sharma et al., 2021).

Мешавине на бази казеина (слика 4.19; С, D, G, H) имају порознију, поцепану и неравну микроструктуру. Код ових узорака нема присуства лактозе и серум протеина, за разлику од мешавина на бази млека. Површина која подсећа на гребен на слици 4.19. С (узорак CNPA) је последица сублимације кристала леда током лиофилизације, након чега остаје порозна структура (Lara-Castellanos et al., 2021), за шта постоје слични примери у литератури (Shen et al., 2015; Xu et al., 2020). Код раствора са великим садржајем воде, као што је реконституисано млеко (поготово 2% казеини), током лиофилизације ће се стварати већи кристали леда који ће нарушити микроструктуру, односно утицати на порозност (Arsiccio et al., 2019; Kamigaki, 2020). На слици 4.19. D (узорак TCNPA) може се видети утицај термичког третмана. Формирани WP/CN комплекси на површини казеинске мицеле вероватно обезбеђују боље повезивање између казеина током лиофилизације, па је микроструктура компактнија. X. Y. Li et al. (2020) су такође пронашли формирање густих мрежастих структура код термички третираних протеина козјег млека. Такође, узорци мешавина казеина су добијени након изоелектричне преципитације, где почиње агрегација казеина и повезивање у мреже. Реконституцијом ових узорака, тј. подизањем рН вредности на природну рН вредност млека не може се постићи иста структура као у свежем млеку. Казеинске мицеле козјег млека садрже више калцијума и фосфата у поређењу са крављим млеком, а пошто мицеларни калцијум фосфат има улогу у формирању интеракција између молекула казеина, преципитација, а затим реконституција може за последицу имати нарушавање равнотеже и несређенију мицеларну структуру (Park et al., 2007; Raynal-Ljutovac et al., 2007). Показано је да присуство калцијума утиче на формирање компактније структуре и неправилнијих честица (Khalesi & FitzGerald, 2022). Lima et al. (2008) су SEM микроскопијом лиофилизованих егзополисахарида из *A. brasiliensis* добили слике хетерогене микроструктуре, где полисахариди подсећају на штапиће и показали да нема глобуларне структуре протеинско-полисахаридног комплекса. На датим узорцима није видљива разлика између мешавина са полисахаридним и мешавина са воденим екстрактом, као ни присуство екстраката, вероватно због мање концентрације екстраката гљиве у односу на концентрацију млека и казеина. Такође, дехидратациони корак током лиофилизације утиче на структуру високо хидратисаних молекула, као што су полисахариди (Ayala-Hernandez et al., 2008).

На слици 4.20. су приказане микроструктуре мешавина млека и казеина са екстрактима *L. sulphureus* снимљене скенирајућим електронским микроскопом. Сlike су такође анализиране под увећањима од 150 X и 600 X. Као и код мешавина са *A. blazei*, може се приметити неправилна структура која подсећа на разбијено стакло, односно љуспице

које се јављају током лиофилизације узорака на бази млека (слика 4.20; А, В, Е, F). Мешавине на бази казеина (слика 4.20; С, D, G, H) такође имају поцепану и неравну микроструктуру, још порознију у односу на мешавине са *A. blazeyi*, посебно изражену код узорка TCNVL (слика 4.20; H). Аналогно мешавинама са *A. blazeyi*, и овде се порозност објашњава сублимацијом леда током лиофилизације (Lara-Castellanos et al., 2021; Shen et al., 2015; Xu et al., 2020). И овде је структура компактнија код мешавина на бази термички третираних казеина у односу на нетретиране казеине, без обзира на порозност, за шта се такође могу применити поменути објашњења. Показано је да се приликом испаравања у вакууму ради концентрисања више издваја вода из серум фазе него што је то случај са казеинском мицелом, док се приликом реконституције прво рехидратише мицела, иако некомплетно, а мицеле остају делимично контраховане услед овог процеса (Liu et al., 2012). Микроструктурне разлике између мешавина са *L. sulphureus* и *A. blazeyi* нису видљиве, као ни ензимско дејство воденог екстракта *A. blazeyi*. Такође није видљива казеинска мицеларна структура, јер се коришћеном техником посматрају узорци у вакууму, а не у свом нативном, течном стању у воденом раствору, па постоје потешкоће у анализирању наноструктура за које су потребније савременије технике микроскопије (Ogura & Okada, 2017).



Слика 4.20. Микроструктура мешавина млека и казеина са полисахаридним екстрактом *L. sulphureus* (A-D) и воденим екстрактом *L. sulphureus* (E-H). Лева колона: увеличање 150X; десна колона: увеличање 600X. Узорци: А - RMPL (мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*); В - TRMPL (мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*); С -

CNPL (мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*); D - TCNPL (мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *L. sulphureus*); E - RMVL (мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*); F - TRMVL (мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*); G - CNVL (мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*); H - TCNVL (мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*).

4.6. Шематски приказ казеинских мицела у узорцима козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*

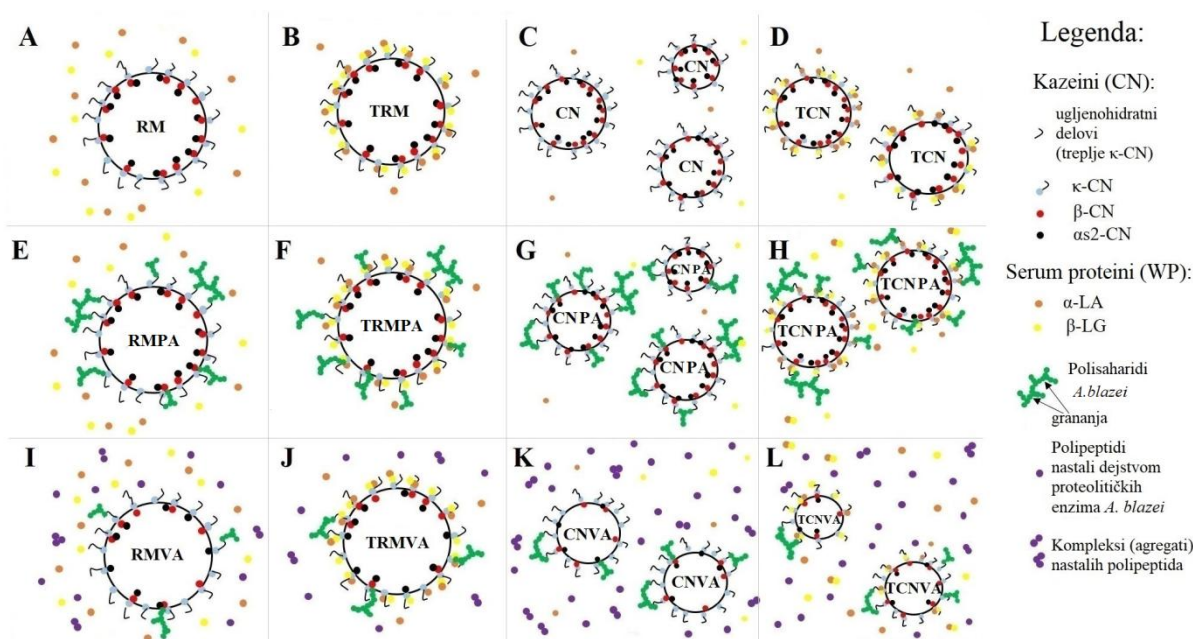
На основу DLS мерења, електрофоретских и FTIR анализа, као и SEM микроструктуре, на слици 4.21. приказан је шематски приказ казеинских мицела у термички третираном и нетретираном млеку и њихових мешавина са екстрактима *A. blazei*. Шематски приказ узорака козјег млека и казеина (слике 4.21. А–D) урађен је према Pesic et al. (2012), чији су закључци потврђени и у оквиру ове дисертације. На слици 4.21. А приказана је структура казеинске мицеле нетретираног козјег млека, која на површини садржи α_2 -CN, β -CN и κ -CN, док се серум протеини налазе у слободној форми. Ситуација је другачија код термички третираног козјег млека (слика 4.21. В), где WP нема у слободној форми, већ се након денатурације и агрегације са казеинима (α_2 -CN, β -CN и доминантно κ -CN) налазе подједнако распоређени на површини казеинске мицеле, чинећи WP/CN комплексе (Dalglish & Corredig, 2012). Узорак казеина (слика 4.21. С) приказује казеинску мицелу састављену од доминантних казеина, мањих дијаметара због издвајања изоелектричном преципитацијом. Термички третирано казеини (слика 4.21. D) су приказани са WP/CN комплексима (потврђено помоћу SDS-R-PAGE и SDS-NR-PAGE), пошто је њихово добијање извршено након термичког третмана који је узроковао њихов настанак, али се ипак мали део WP приказује у слободној форми где прелази због изоелектричне преципитације (Pesic et al., 2012).

На сликама 4.21. Е–H приказане су мешавине узорака козјег млека и казеина са полисахаридним екстрактом *A. blazei*. Замрљане и растегнуте траке ових мешавина на Native-PAGE електрофореграмима могу указивати на слабе интеракције мицеле и глукана, на шта указују и раздвајања у одређеним FTIR регионима. Полисахаридни екстракт са RM (слика 4.21. Е) вероватно формира водоничне везе са угљенохидратним деловима κ -CN и фосфатним групама κ -CN и β -CN (González-Morelo et al., 2020; Holland & Boland, 2014; Pesic et al., 2012; Popović Minić et al., 2023). На ово указују раздвајања мешавине RMPA у угљенохидратном региону због насталих водоничних (O–H) и/или гликозидних веза (C–O–C) (Grewal et al., 2017a). Осим поменутих интеракција, са TRM (слика 4.21. F) могуће су и хидрофобне интеракције, јер се ланци полисахарида могу убацити у унутрашњост WP/CN комплекса својим хидрофобним регионима (Milinčić et al., 2021). Хидрофобне интеракције утичу на промену структуре, па се раздвајање узорка TRMPA поред угљенохидратних, види и у протеинским регионима, мада је тешко тачно утврдити изглед мицела, јер осим интеракција казеина са површине мицеле са PA, они реагују и са WP у WP/CN комплексима (Pesic et al., 2012). Глукани из полисахаридног екстракта могли би да формирају водоничне везе са фосфатним групама казеина са површине мицеле (слика 4.21. G), што се види из раздвајања узорка CNPA у региону амид III због промене конформације, као и из великих варирања величине честица казеина (Grewal et al., 2017a; 2017b). Додатак полисахаридног екстракта у TCN могао би да резултује водоничним и гликозидним везама са угљенохидратним деловима κ -CN (слика 4.21. H), док је мање вероватно да формира везе са фосфатним групама казеина, јер оне реагују са серум протеинима

градећи WP/CN комплексе у мањој мери у односу на TRM због изоелектричне преципитације (Holland & Boland, 2014; Pesic et al., 2012).

Слике 4.21. I–L приказују мало сложенију ситуацију у односу на остале узорке, јер је осим до сада поменутих интеракција приказано и дејство протеолитичких ензима пореклом из *A. blazeyi*. Ови ензими својим протеолитичким дејством делују првенствено на β -CN и α_2 -CN, а новонастали полипептиди могу постојати и у форми мономера и као растворљиви комплекси, тј. агрегати (Nakamura et al., 2011; Omrane Benmrad et al., 2019). Настанак полипептида зависи од матрикса, односно β -CN и α_2 -CN из узорка CN и TCN (слика 4.21. K, L) су доступнији протеазама у односу на RM и TRM (слика 4.21. I, J). Такође, термички третман утиче негативно на степен хидролизе зато што супстрати (β -CN и α_2 -CN) нису доступни у истој мери протеазама због учешћа у WP/CN комплексима, који прекривају површину казеинске мицеле (Pesic et al., 2012). Осим протеолитичког дејства VA, и овде глукани могу реаговати са угљенохидратним деловима κ -CN, фосфатним групама κ -CN, као и нехидролизованом β -CN из узорка RM и TRM. Све наведено је у складу са FTIR анализом и PCA, где се узорци RMVA и TRMVA одвајају од осталих у свим регионима (због структуре казеинске мицеле). Узорци CNVA и TCNVA су груписани заједно дуж линије PC1, јер након хидролизе β -CN и α_2 -CN вероватно имају сличну структуру.

Мешавине козјег млека и казеина са екстрактима *L. sulphureus* показале су далеко већу полидисперзност услед хетерогености биохемијског састава у односу на аналогне мешавине са *A. blazeyi*, на шта указују DLS мерења, електрофоретске и FTIR анализе и жмикроструктура. Из овог разлога није могуће шематски приказати интеракције казеинских мицела са конституентима екстракта *L. sulphureus*.



Слика 4.21. Шематски приказ узорка млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *A. blazeyi*. Ознаке: А – обезмашћено термички нетретирано козје млеко (RM); В – термички третирано обезмашћено козје млеко (TRM); С – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека (CN); D – казеини термички третираног обезмашћеног млека (TCN); E – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazeyi* (RMPA); F – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazeyi* (TRMPA); G – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног

млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (CNPA); Н – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei* (TCNPA); I – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (RMVA); J – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* (TRMVA); K – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei* (CNVA); L – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei* (TCNVA).

4.7. Примена експерименталног дизајна у оптимизацији састава адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и екстраката гљива

Након анализе резултата биохемијске карактеризације, DLS мерења, електрофоретских и FTIR анализа, 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.

Помоћу хеометријског приступа, након завршеног експерименталног дизајна добијена су два оптимизована адитива – по један за сваку испитивану гљиву (**MA**, **ML**). У наставку истраживања коришћено је термички третирано обезмашћено козје млеко (**TRM**) и водени екстракти *A. blazei* (**VA**) *L. sulphureus* (**VL**). На овај начин су утврђени оптимални услови припреме адитива, као и интеракције између фактора у условима мањка литературних података на које би се могло ослонити приликом осмишљавања експеримената и тумачења њихових резултата. Предност је дата воденим екстрактима гљива због разноврсности састава, пре свега високог садржаја протеина, што је битно због антиоксидативних својстава, као и због активних протеаза из VA. Због бимодалне/полимодалне расподеле честица из поједних узорака казеина и њихових мешавина, као и због корака изоелектричне преципитације, предност је 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, а и средњи дијаметар честица TRMPA и TRMVA је значајно већи у односу на TRM, што може указивати на потенцијалне интеракције, па су ове мешавине даље испитиване кроз експериментални дизајн.

4.7.1. Фракциони факторијски дизајн (FFD) мешавина на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и екстраката гљива

Под претпоставком да се интеракције између више параметара могу занемарити, за прелиминарна истраживања изабран је FFD. FFD примењен у овом раду представља једну четвртину потпуног факторијског дизајна и то је 2^{5-2} дизајн, који је садржао 27 експеримената са три понављања у централној тачки. Интеракције нижег реда између испитиваних фактора су испитане дефинисањем централне тачке у којој су вредности за сваки испитивани фактор на средњем нивоу.

Матрица са експерименталним условима, за пет фактора (концентрација екстраката гљива – w(ME), концентрација термички третираног млека – w(MPP), температура мешања - T, време мешања - t, pH вредност) на три нивоа, према изабраном FFD, добијена је помоћу статистичког програма *MINITAB*. Реалне вредности матрице приказане су у табели 4.4. Статистички значај испитиваних параметара, као и њихових интеракција процењен је анализом варијанси (ANOVA) и коефицијента корелације (R^2). Одговор система су одабрана биолошка, тј. антиоксидативна својства, а употребљене су три методе које су засноване на различитим механизмима, односно хемијским реакцијама (Pešić et al., 2019). Анализа и поређење резултата извршено је помоћу три врсте дијаграма – Парето графика, графика главних ефеката и дијаграма интеракција.

Табела 4.4. FFD антиоксидативних својстава мешавина, реалне вредности

Број експеримента	% екстракта гљиве; w(ME)	% термички третираног млека; w(MPP)	Температура; T, °C	Време мешања; t, min	pH вредност мешавина
1	0,9	2	25	5	6,80
2	0,1	2	25	65	5,50
3	0,9	10	5	65	5,50
4	0,9	2	25	5	6,80
5	0,9	2	5	5	5,50
6	0,9	10	25	65	6,80
7	0,9	10	5	65	5,50
8	0,1	10	5	5	6,80
9	0,9	2	25	5	6,80
10	0,9	2	5	5	5,50
11	0,1	10	25	5	5,50
12	0,1	2	5	65	6,80
13	0,1	10	5	5	6,80
14	0,1	2	25	65	5,50
15	0,1	10	5	5	6,80
16	0,9	10	25	65	6,80
17	0,9	2	5	5	5,50
18	0,9	10	25	65	6,80
19	0,5	6	15	35	6,15
20	0,1	10	25	5	5,50
21	0,1	10	25	5	5,50
22	0,1	2	25	65	5,50
23	0,9	10	5	65	5,50
24	0,1	2	5	65	6,80
25	0,1	2	5	65	6,80
26	0,5	6	15	35	6,15
27	0,5	6	15	35	6,15

4.7.2. Испитивање утицаја фактора на антиоксидативна својства мешавина са екстрактом *A.blazei* применом FFD

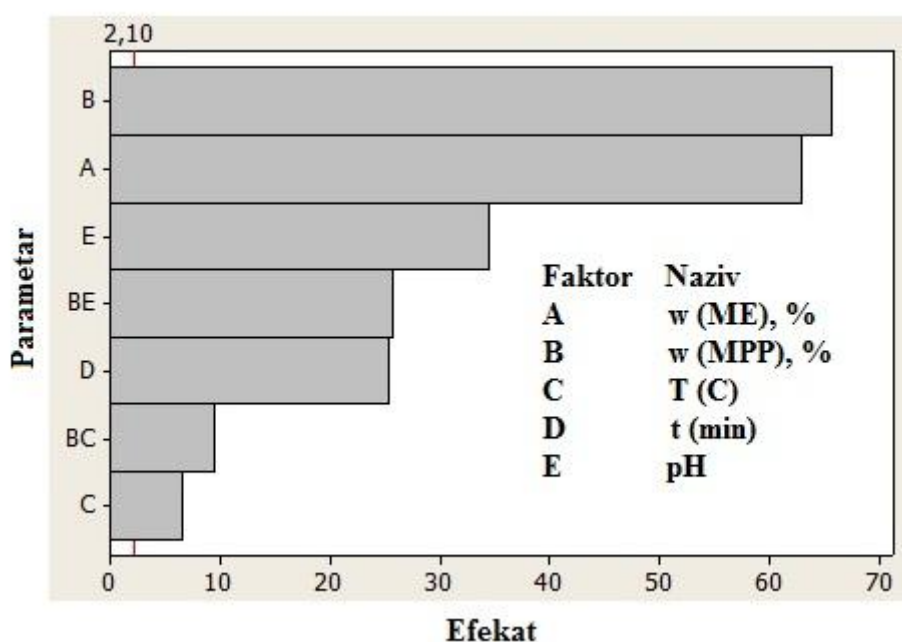
4.7.2.1. ABTS тест мешавина са екстрактом *A.blazei*

Средње вредности резултата мерења укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) код мешавина са *A.blazei* према шеми из табеле 4.4. су се кретале у опсегу 0,17 – 1,97 mg Trolox/ mL узорка (прилог 3). На Парето графику, који показује апсолутне вредности ефеката, њихов статистички значај, као и постојање потенцијалних интеракција између ефеката (Sredović Ignjatović, 2015), на слици 4.22. могу се упоредити апсолутне вредности ефеката на укупан антиоксидативни капацитет. У задатом подручју поверења од 95% (исти за цео експериментални дизајн) може се видети да сви параметри утичу на одговор, као и интеракција концентрације термички третираног млека са pH вредношћу и температуром мешања. Од највећег значаја су концентрације екстракта гљива и термички третираног млека.

Уколико посматрамо хемијске реакције које се користе у већини метода за мерење антиоксидативног капацитета, методе се могу поделити на две групе: НАТ методе (*Hydrogen Atom Transfer*), које мере способност потенцијалног антиоксиданта да неутралише слободни радикал помоћу донације водоника и SET методе (*Single Electron*

Transfer; помињане и као ЕТ методе – *Electron Transfer*) које мере способност антиоксиданта да редукује одређена једињења трансфером електрона (Gülçin, 2012; Huang et al., 2005; Schaich et al., 2015; Sun & Tanumihardjo, 2007). SET методе су брже од НАТ метода, што се сматра предношћу јер у реалним системима није битан само капацитет, већ и кинетика реакције, али су зависне од рН вредности, јер се јонизацијом повећава доступност електрона (Chen et al., 2003; Schaich et al., 2015).

АВТS тест мери способност потенцијалних антиоксиданата да утичу на пад апсорбанције АВТS⁺⁺. Већи део литературе наводи да се реакције са АВТS⁺⁺ могу сматрати комбинацијом SET и НАТ механизма (Gülçin, 2012; Munteanu & Apetrei, 2021). На основу Парето дијаграма се јасно види да је интеракција w(MPP) са рН вредношћу статистички значајна, што је у складу са наведеним.

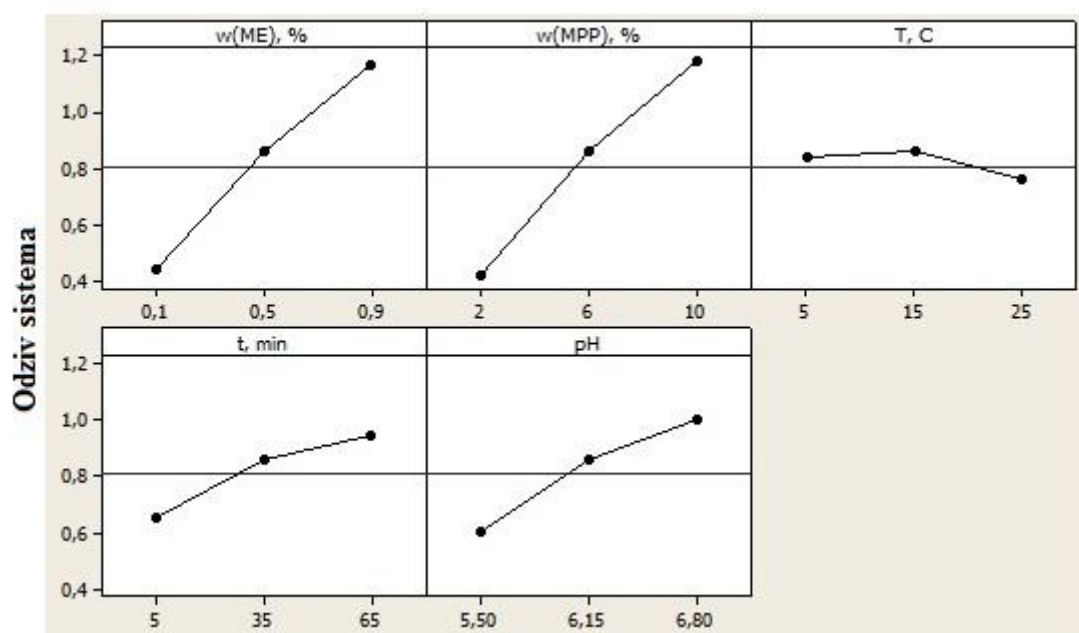


Слика 4.22. Парето график, ефекат испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (АВТS тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Упоређивање антиоксидативних својстава млека испитиваних АВТS тестом мора бити урађено пажљиво, јер тип млека у великој мери утиче на резултате. Као главни антиоксиданти у млеку наводе се тиолне групе аминокиселина (посебно аминокиселина цистеин), пептиди и протеини, с тим да је антиоксидативност протеина већа од активности слободних аминокиселина, на шта је оријентисан мањи број студија и може се рећи да је улога протеина као антиоксиданата маргинализована у литератури (Çekiç et al., 2015; Walker & Everette, 2009). Испитивањем укупног антиоксидативног капацитета млека и фракција млека, добијено је да укупном капацитету млека највише доприноси казеинска фракција (Çekiç et al., 2015). Chen et al. (2003) такође закључују да највећу улогу у неутралисању АВТS⁺⁺ имају казеини. На Парето графику се види да је ефекат концентрације млека мало већи од ефекта концентрације екстракта гљива. Веће апсолутне вредности антиоксидативног капацитета млека које постоје у литератури вероватно потичу од различитих полазних узорака, тј. пуномасна млека ће имати већи капацитет у односу на обезмашћене узорке, јер је ова метода пригодна и за

водене и за липидне фракције, па тако разне липофилне супстанце повећавају антиоксидативни капацитет, као нпр. витамин Е (Stobiecka et al., 2022). Са порастом концентрације масти у млеку, АВТS вредности значајно расту, делимично због интерференције липида, а делом због њихове антиоксидативности (Chen et al., 2003).

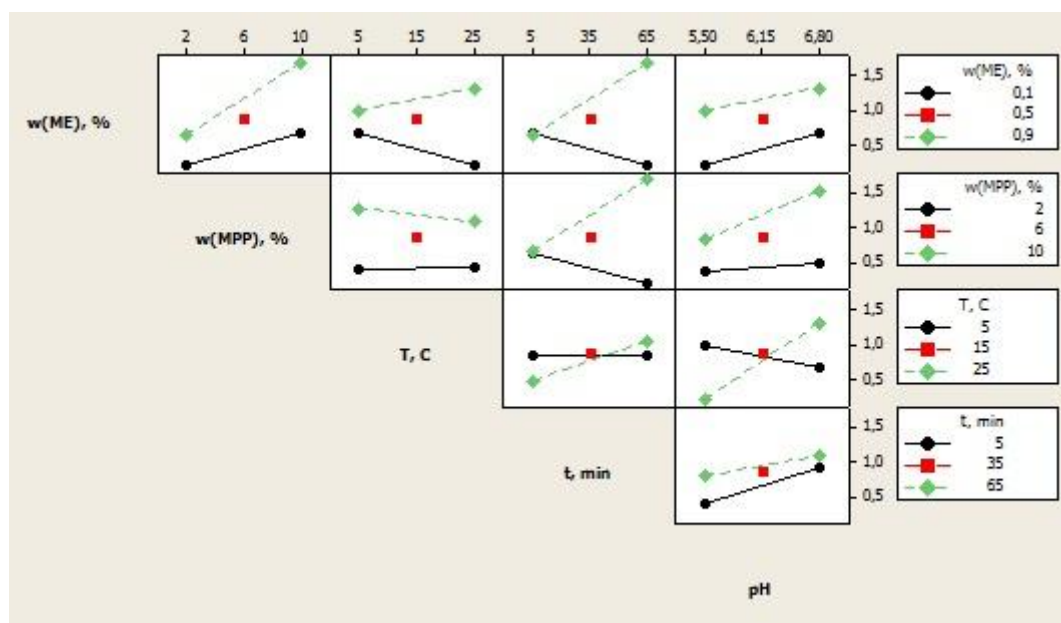
Код екстраката гљива, антиоксидативна својства се углавном приписују полисахаридима или фенолним једињењима, где се такође благо занемарује ефекат протеина. Најчешће коришћени екстракти полисахарида гљива за које се тврде одређени биолошки ефекти јесу сирови полисахариди добијени екстракцијом врелом водом уз преципитацију етанолом (Siu et al., 2014). Утврђено је да такви екстракти нису само полисахаридни, већ да могу садржати чак 15-30% укупних протеина и 2-5% фенолних компонената (Siu et al., 2014). Антиоксидативни капацитети ових екстраката значајно су у корелацији са садржајима укупних фенолних једињења и протеина; полисахариди пречишћени од ових компонената немају значајну антиоксидативну активност, што указује на велики значај других компонената осим полисахарида и поставља питање синергије међу компонентама (Siu et al., 2014). У овом контексту, коришћени водени екстракти *A.blazei* и *L. sulphureus*, које карактерише висок садржај протеина могу бити погодни за развој функционалних адитива (поглавље 4.1.1.). Shah & Modi (2020) су утврдили да 5 mg/ mL воденог екстракта *A.bisporus* инхибира око 49,4% активности АВТS⁺⁺. Дакле, код АВТS теста, носиоци антиоксидативног капацитета мешавина су и протеини млека и биоактивна једињења гљиве.



Слика 4.23. График главних ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (АВТS тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстраката гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Графици главних ефеката пружају додатне информације о утицају сваког појединачног параметра када се мења у испитиваној области, јер нису битне само апсолутне вредности ефеката, већ и информација да ли при промени фактора између два нивоа, долази до раста или опадања одговора система (Sredović Ignjatović, 2015). Слика 4.23. показује да ли укупни антиоксидативни капацитет расте или опада са са променом

вредности сваког испитиваног параметра појединачно, тј. три нивоа параметра (-1; 0; +1). Може се закључити да капацитет расте готово линеарно са порастом концентрације млека, односно екстракта *A.blazei*, што је у складу са претходно изнетим закључцима о носиоцима антиоксидативности код АВТS теста. Капацитет расте и са порастом рН вредности, као и са временом мешања, али споријим трендом у односу на садржај термички третираног млека (% МРР) и садржај екстракта гљива (% МЕ). Пошто се порастом рН вредности раствори мешавина све више удаљавају од изоелектричне тачке козјег млека, а јонизацијом повећава доступност електрона (Schaich et al., 2015), овај раст је оправдан јер је са кинетичке тачке гледишта пад апсорбанције АВТS⁺⁺ бржи у оваквим условима. Мешавине прављене на 5 и 15 °C имају готово исти одговор, а капацитет чак мало опада код 25 °C, што је једини негативни тренд који се може уочити на овој слици.



Слика 4.24. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (АВТS тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Дијаграм интеракција (слика 4.24.) показује промену одговора система (тј. антиоксидативног капацитета) када се вредности параметара једне променљиве мењају између њена два нивоа, док се вредност нивоа друге променљиве држи константним. Код графика главних ефеката и дијаграма интеракција веће одступање од хоризонталне линије (тј. укупне средње вредности одговора система) указује на већу интеракцију променљивих (Sredović Ignjatović, 2015). Црна линија, црвена тачка и зелена линија одговарају промени капацитета за нижи испитивани ниво дате променљиве (-1), средњој вредности, односно промени капацитета за виши испитивани ниво дате променљиве (+1), респективно. При повећању садржаја млека, антиоксидативни капацитет се повећава за обе вредности концентрације екстракта *A.blazei*, само је раст израженији за виши ниво % МЕ. При повећању температуре мешања, за вишу испитивану вредност % МЕ (0,9%) капацитет се повећава, док се за нижу вредност % МЕ (0,1%) смањује порастом температуре. Овакав закључак је могуће донети само на основу дијаграма интеракција, јер интеракције нису видљиве на графику главних ефеката, па утицај других фактора на пад антиоксидативног капацитета са порастом

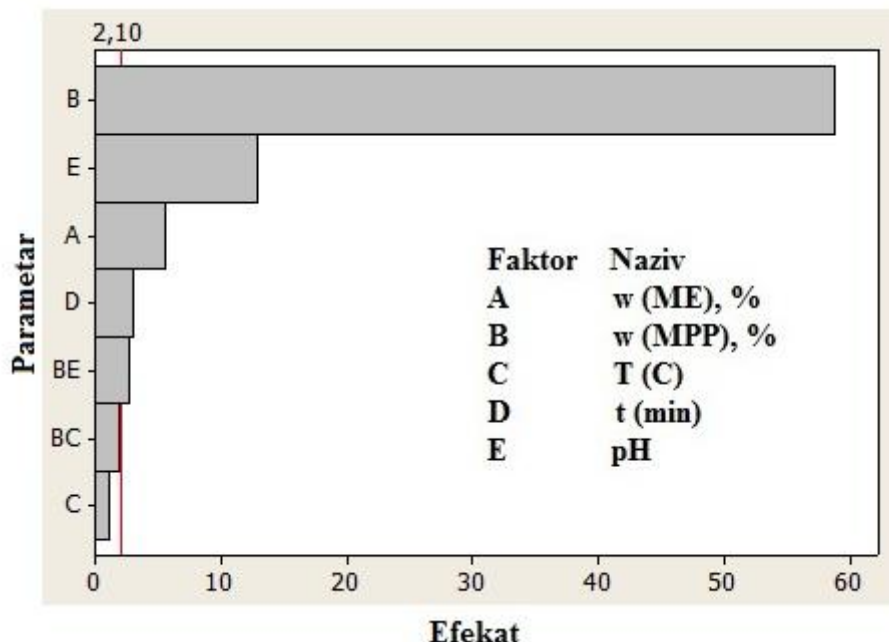
температуре не би био довољно јасан. Код пораста времена мешања, за 0,9% МЕ капацитет расте, док за 0,1% МЕ опада, што је слично као код пораста температуре. Растом рН вредности, за обе испитиване концентрације МЕ, капацитет расте истим трендом. Овакви закључци квалификују мешавине са 0,9% МЕ за наставак истраживања када се у обзир узме укупни антиоксидативни капацитет. Могуће је да је концентрација од 0,1% МЕ сувише ниска, тј. да су мешавине са 0,1% МЕ презасићене млеком, без обзира на концентрацију млека, па је тешко испитивати својства мешавина мењањем датих фактора. Две статистички значајне интеракције су $w(\text{MPP}) - \text{pH}$ и $w(\text{MPP}) - T$ (слика 4.22). Ипак, на дијаграму интеракција се може видети да је антиоксидативни капацитет скоро исти код свих мешавина са 2% МРР без обзира на промену температуре, опада са порастом времена мешања и благо расте са порастом рН вредности, док код 10% МРР капацитет благо опада са порастом температуре и расте са порастом времена мешања и рН вредности. У овом случају, када се у обзир узму једине две статистички значајне интеракције, бољи кандидат за наставак истраживања је 10% МРР, уз држање рН вредности и времена мешања на нивоу +1 (6,80; 65 min, респективно). Капацитет се не мења код мешавина прављених на 5 °C и расте код мешавина прављених на 25 °C са порастом времена мешања. Антиоксидативни капацитет благо опада за мешавине прављене на 5 °C и расте за мешавине прављене на 25 °C приликом пораста рН вредности, док расте сличним трендом приликом пораста рН вредности за обе испитиване вредности времена мешања.

4.7.2.2. FCC тест мешавина са екстрактом *A.blazei*

Прелазни метали, укључујући и Fe^{2+} , каталишу реакције формирања слободних радикала утичући непожељно на храну, као и на човеково здравље, па би присуство хелирајућих агената у испитиваним мешавинама било врло пожељно са функционалног аспекта (Acharya et al., 2016). Пошто ферозин реагује са Fe^{2+} градећи љубичасти комплекс, када постоји други хелирајући агенс у раствору, интензитет љубичасте боје се смањује и праћењем апсорбације могуће је закључити има ли потенцијалних антиоксиданата (Acharya et al., 2016). Хелирајућа својства протеина, уз њихове друге антиоксидативне механизме чине млеко идеалном базом за формулацију адитива (Elias et al., 2008). Козје млеко би потенцијално требало да има већи бенефит од крављег, због биоактивних пептида који између осталог имају и добра хелирајућа својства (Stobiecka et al., 2022).

Средње вредности резултата мерења капацитета хелирања FCC тестом код мешавина са *A.blazei* су биле 0,96 – 5,45 mg EDTA/ mL узорка (прилог 3). Независно од концентрације додатог екстракта гљиве, све мешавине са 2% и 6% МРР су показале резултате до $\approx 2,3$ mg EDTA/ mL узорка, док су мешавине са 10% МРР биле изнад $\approx 4,2$ mg EDTA/ mL узорка, без обзира на друге испитиване параметре. Ово је у складу са резултатима Kostić et al. (2021), где се такође висок садржај протеина доводи у везу са добрим капацитетом хелирања. Екстракт *A.blazei* није допринео порасту капацитета хелирања, иако неке студије наводе да га поседује, зависно од концентрације (Wu et al., 2014). Ове разлике највероватније потичу од разлика у хемијском саставу екстраката, као и начину екстракције, јер аутори наводе већи садржај полисахарида и шећера добијених екстракцијом у врелој води (95°C) након које је узорак концентрисан у ротационом испаривачу и испиран етанолом (Wu et al., 2014). Пречишћени полисахаридни екстракт из *Agaricus brasiliensis* показао је капацитет хелирања сличан као EDTA (96.5%), што вероватно потиче од присуства хидроксилних група које могу да стабилизују слободне електроне (Gonzaga et al., 2020).

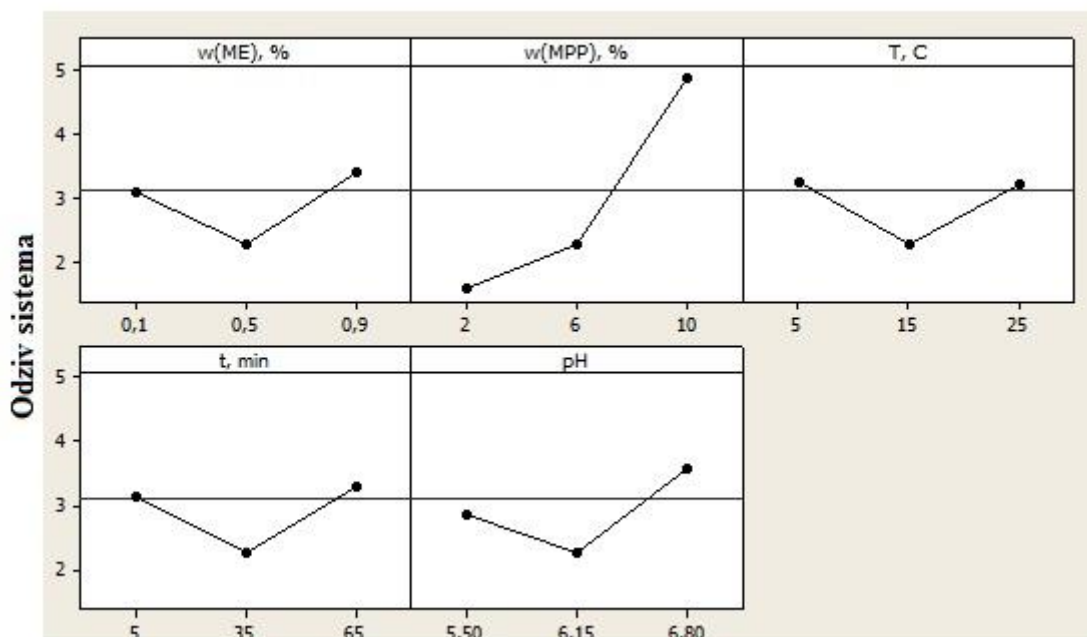
На Парето графику на слици 4.25. виде се апсолутне вредности ефеката на капацитет хелирања. Убедљиво највећи ефекат има концентрација млека, затим мањи утицај има рН вредност, утицај концентрације екстракта *A.blazei* је тек на трећем месту, затим следе време мешања и интеракција концентрације млека са рН вредношћу. Температура мешања, као и интеракција w(MPP) са температуром нису значајне.



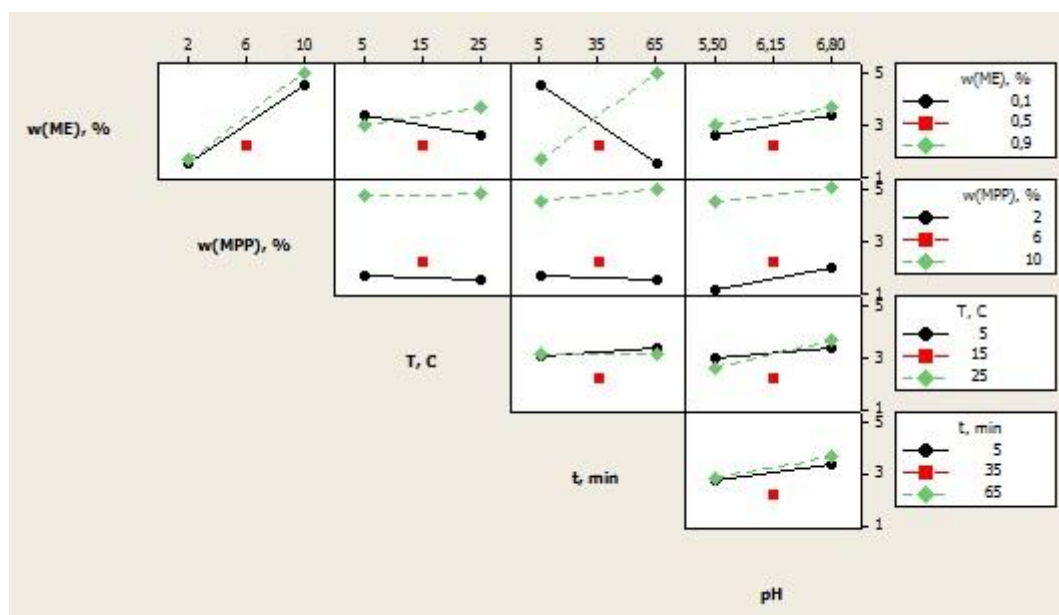
Слика 4.25. Парето график, ефекат испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Према овој методи, најбитнији носиоци капацитета хелирања су конституенти млека. У литератури се као хелирајући агенси наводе протеини млека, пре свега серум протеини и пептиди, али и казеини, јер остаци аминокиселина као што су хистидин, глутаминска киселина, аспарагинска киселина, треонин и фосфорилувани серин могу везивати метале (Elias et al., 2008). Ефекат концентрације екстракта *A.blazei* је значајан, али далеко мање у односу на % MPP. Код аналогних мешавина са *L. sulphureus*, значајан је само утицај % MPP. Ова разлика вероватно постоји због различите природе интеракција мешавина са две различите гљиве испитиваних у првој фази докторске дисертације. Пошто су интеракције конституената млека и VA извесније и пошто се конституенти VA највероватније делимично налазе на површини казеинских мицела (видети шематски приказ, слика 4.21.) и утичу на структуру казеина, могуће је да делимично доприносе побољшању хелирајућих својстава казеина млека. На природу оваквих промена утичу и рН вредност, као и време мешања, односно повећање вероватноће формирања веза дужим временом мешања.

Ситуација са Парето графика детаљније је разјашњена на графику главних ефеката (слика 4.26.), где се види најизраженији ефекат раста капацитета хелирања порастом % MPP, као и релативно слични одзиви свих осталих ефеката, без обзира на њихову статистичку значајност. Код свих параметара осим % MPP, види се релативно сличан ефекат минималних и максималних вредности, као и пад капацитета хелирања у средишњој тачки. Може се и приметити већи ефекат пораста капацитета хелирања код пораста рН вредности у односу на ефекте % ME, T и t.



Слика 4.26. График главних ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.



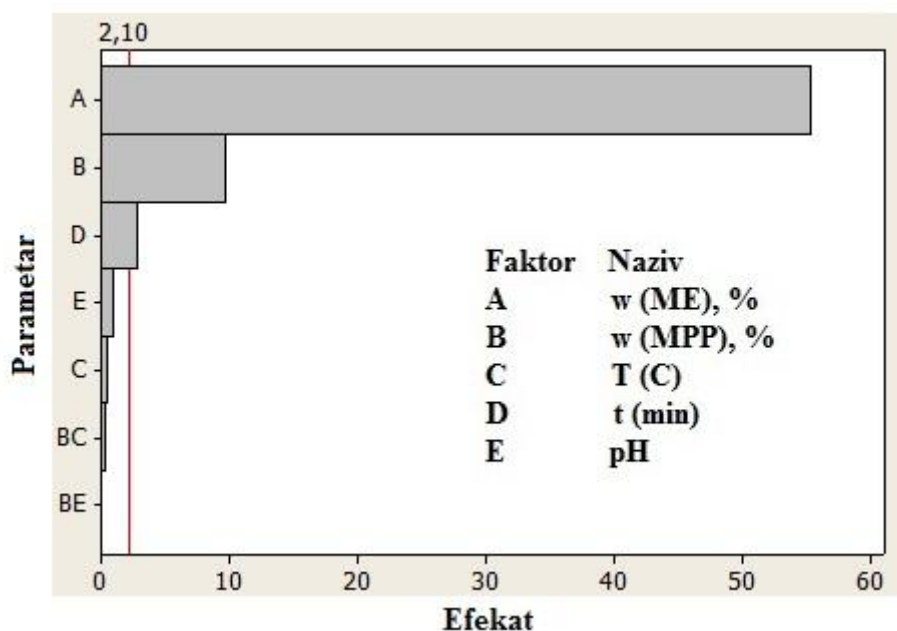
Слика 4.27. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Дијаграм интеракција (слика 4.27.) показује да капацитет хелирања мешавина расте исто за обе концентрације МЕ са порастом % МРР и рН вредности; благо опада за 0,1% МЕ и благо расте за 0,9% МЕ са порастом температуре мешања; опада код 0,1% МЕ и расте код 0,9% МЕ при порасту времена мешања. Капацитет хелирања је готово константан за обе вредности концентрације МРР при промени температуре, док благо расте код промене нивоа времена мешања и рН вредности (интеракција % МРР – рН је

једина статистички значајна). Капацитет хелирања врло благо расте, готово незнатно, за обе вредности температуре при промени времена мешања и рН вредности, као и код обе вредности времена мешања у односу на промену рН вредности. Дакле, и одавде би се могло закључити да је за наставак истраживања најбоље узети 10% млеко уз остале параметре са фиксним максималним вредностима (0,9% МЕ; 25 °С; 65 min; рН 6,8).

4.7.2.3. FRP тест мешавина са екстрактом *A.blazei*

Класичном SET методом – FRP методом се одређују антиоксидативна својства на основу могућности потенцијалних антиоксиданата да редукују Fe^{3+} -ферицијанид комплекс донирањем електрона и превођењем у Fe^{2+} -форму, чија се апсорбација прати (Gülçin, 2012; Moon & Shibamoto, 2009; Pešić et al., 2019). Средње вредности резултата мерења способности редукације Fe^{3+} FRP тестом код мешавина са *A.blazei* су се кретале у опсегу 21,83 – 523,05 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (прилог 3). Узорци 2А, 12А, 14А, 22А, 24А, 25А су показали најслабију редукујућу моћ, а то су узорци са концентрацијама 0,1% МЕ и 2% МРР, без обзира на остале параметре.

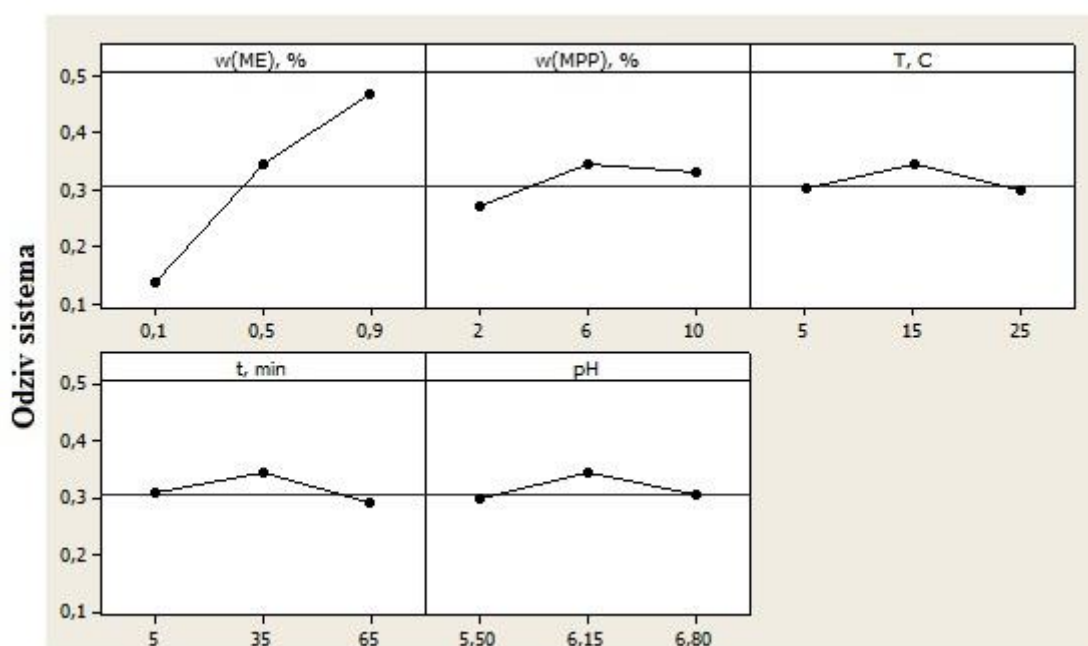


Слика 4.28. Парето график, ефекат испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(МЕ) – концентрација екстракта гљива; w(МРР) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

У литератури се такође може наћи да термички третирано козје млеко показује слаба редукујућа својства, која су се налазила испод 50 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (Milinčić et al., 2022). Умерена редукујућа својства се углавном наводе код протеина сурутке, који су у случају термички третираног козјег млека већим делом у интеракцији са казеинима, па је могуће да одатле потичу разлике (Chen et al., 2003; Pesić et al., 2012). Такође, FRAP метода која се често појављује у литератури, другачија у односу на овде коришћену методу, изводи се у киселим условима (рН 3,6), где казеини нису растворљиви, па се целокупна антиоксидативност може приписати само серум протеинима (Chen et al., 2003). Ово је и узрок ниже антиоксидативности млека мерене FRAP методом у односу на ABTS методу, јер она мери и антиоксидативност казеинске фракције (Chen et al., 2003). Упоредивањем антиоксидативних својстава три водена екстракта пореклом из три гљиве у варирајућим концентрацијама, установљене

су FRP вредности до ≈ 150 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (Shah & Modi, 2020). Wei et al. (2020) наводе одлична редукујућа својства етанолног и етил-ацетатног екстракта *A.blazei*.

Анализа је издвојила следећа три параметра као статистички значајне: % МЕ, % МРР и време мешања, са убедљиво најзначајнијим ефектом % МЕ (слика 4.28.). Остали параметри, као и интеракције параметара нису статистички значајни. У овом случају носиоци антиоксидативности су претежно једињења гљива, мада мали значај има и концентрација млека, вероватно због интеракција са једињењима гљива, као и време мешања, односно вероватноћа да дође до интеракција између конституената. Узимајући у обзир SET механизам овог теста, у литератури се наводи да се мора користити заједно са другим антиоксидативним методама, никако засебно, због лоше корелације са другим методама (Munteanu & Apetrei, 2021).

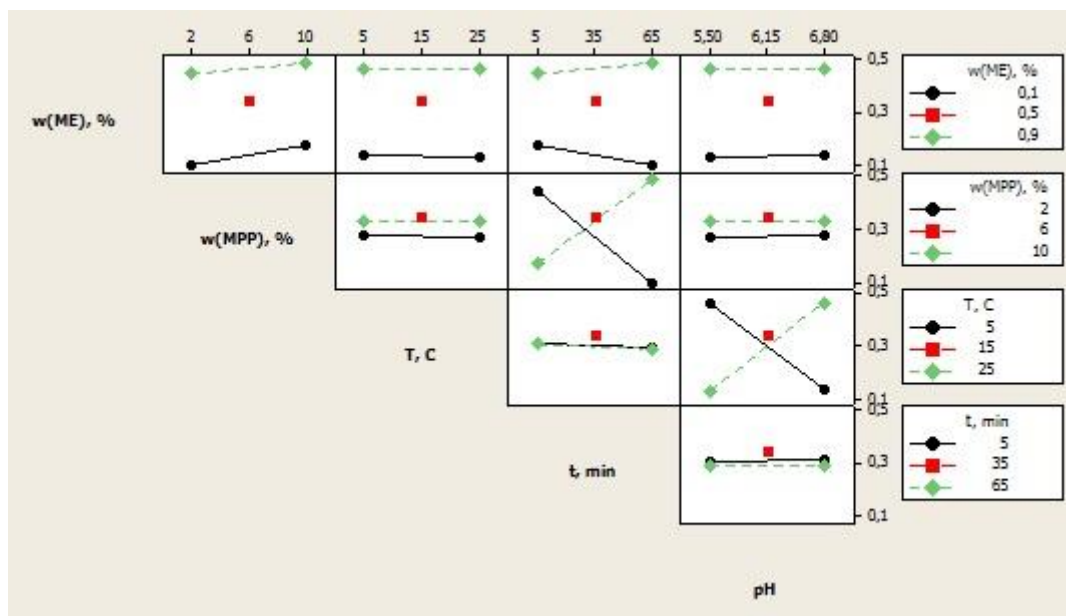


Слика 4.29. График главних ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *A.blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Са графика главних ефеката (слика 4.29.) је могуће закључити исто, очигледан је раст редукујуће моћи са растом % МЕ, док је благи раст редукујуће моћи порастом % МРР могуће видети у опсегу 2 – 6% МРР, а након тога чак благи пад у опсегу 6 – 10% МРР. Остали графици приказују сличан одзив система за T, t и pH вредност, где готово да нема разлике у минималним и максималним вредностима нивоа, са благим порастом редукујуће моћи у централним тачкама.

Са дијаграма интеракција (слика 4.30.) праћење промена редукујуће моћи са аспекта различитих нивоа % МЕ показује да на нижи ниво % МЕ повећање концентрације млека утиче благо позитивно, повећање времена мешања утиче благо негативно, а T и pH вредност немају утицаја. Такође се види максимална редукујућа моћ вишег нивоа % МЕ, уз врло благо повећање редукујуће моћи повећањем % МРР и времена мешања. Резултати су слични код 2% и 10% МРР и на њу не утичу промене T и pH вредности, али опада код 2% МРР и расте код 10% МРР са порастом времена мешања. Такође,

време мешања нема утицај на одговор различитих температура, нити рН вредност има утицај на одговор различитих времена мешања. Промена рН вредности има утицај на мешавине прављене на различитим температурама, па редукујућа моћ опада за мешавине прављене на 5 °С и расте за мешавине прављене на 25 °С.



Слика 4.30. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *A. blazei*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

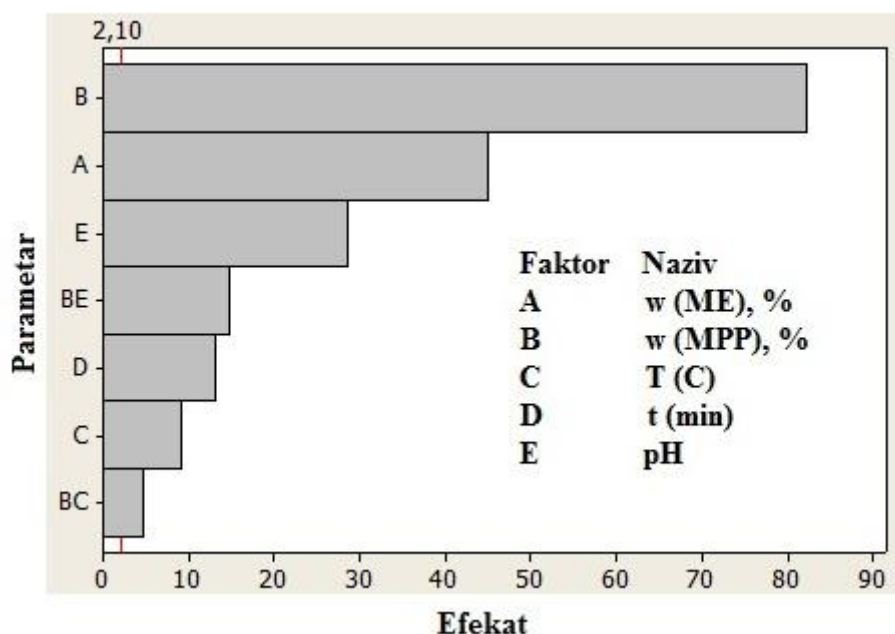
Дакле, на основу изнетих резултата, са аспекта антиоксидативних својстава анализираних помоћу три различите методе, оптимизација је настављена са фиксним параметрима: рН 6,8 (ниво +1), време мешања 65 min (ниво +1), температура 25 °С (ниво +1). Осим остварених резултата, овакве вредности су одабране и због потенцијалне примене у индустријским условима, јер је дата рН вредност природна рН вредност млека, а остваривање задате температуре не захтева никакве операције (собна температура). Овакви закључци у складу су са високим степеном корелације између експерименталних услова и одговора, који за сва три антиоксидативна теста износе преко 99% (прилог 4). Оптимизација састава мешавина у даљим истраживањима фокусира се само на варирање удела МЕ и МРР који су се током скрининга (FFD) показали као два најбитнија фактора са аспекта антиоксидативних својстава.

4.7.3. Испитивање утицаја фактора на антиоксидативна својства мешавина са екстрактом *L. sulphureus* применом FFD

4.7.3.1. ABTS тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

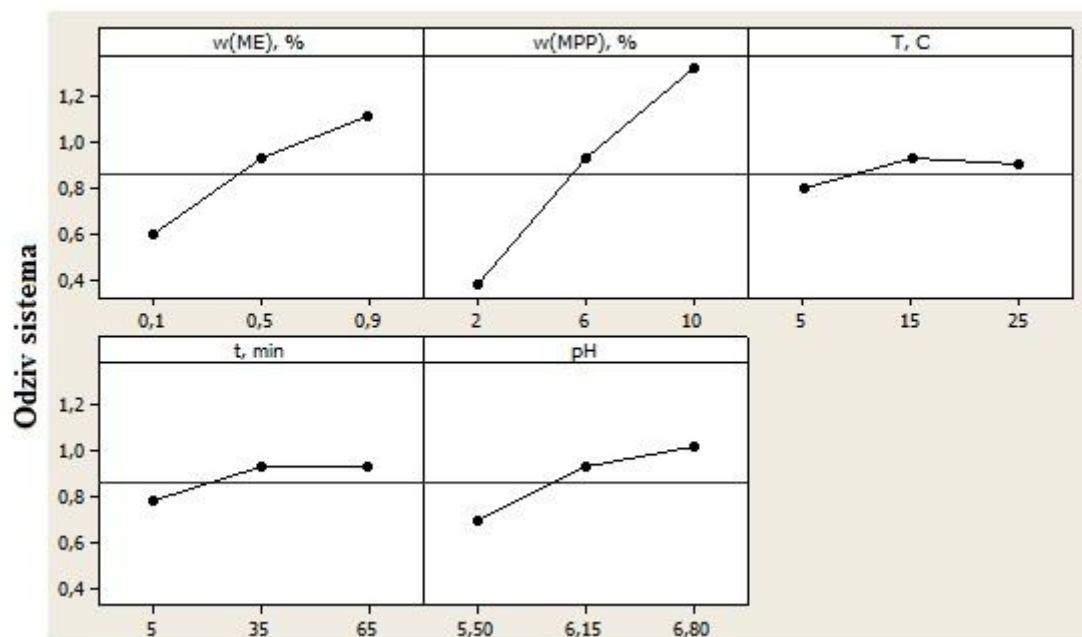
Средње вредности резултата мерења укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) код мешавина са *L. sulphureus* према шеми из табеле 4.4. су се кретале у опсегу 0,14 – 2,00 mg Trolox/ mL узорка, слично као код мешавина са *A. blazei* (прилог 5). У литератури се наводи да комбинација воденог и метанолног екстракта, као и водени раствор *L. sulphureus* боље сакупљају ABTS^{•+} у односу на етанолни екстракт, као и да је корелација између садржаја фенолних једињења и укупног антиоксидативног капацитета слаба ($R^2=0,5$), што упућује на антиоксидативност других компонената, пре свега полисахарида (Petrović et al., 2014a).

На Парето графику на слици 4.31. виде се апсолутне вредности ефеката на укупни антиоксидативни капацитет. И у овом случају сви испитивани параметри утичу на ниво укупног антиоксидативног капацитета, као и интеракције w(MPP) са рН вредношћу и температуром мешања, са две измене у односу на мешавине са *A.blazei*. Овде су такође најбитније концентрације термички третираног млека и екстраката гљива, с тим што су код мешавина са *A.blazei* утицаји промена % МЕ и % МРР били готово идентични, док се овде види израженији утицај промене % МРР у односу на промену % МЕ (слике 4.22, 4.31.). Ово је последица различитог биохемијског састава полазних гљива, односно њихових екстраката (поглавље 5.1.1.), пре свега нижи садржај фенолних једињења и глукана. Следи ефекат рН вредности на укупни антиоксидативни капацитет мешавина, што се може сматрати последицом механизма АВТS теста који је зависан од рН вредности (Schaich et al., 2015). Друга измена у односу на аналогне мешавине са *A.blazei* је редослед два најмање значајна ефекта, температуре и интеракције w(MPP) са температуром мешања. Генерално гледано, и овде су носиоци укупног антиоксидативног капацитета мешавина протеини млека и биоактивна једињења гљиве.

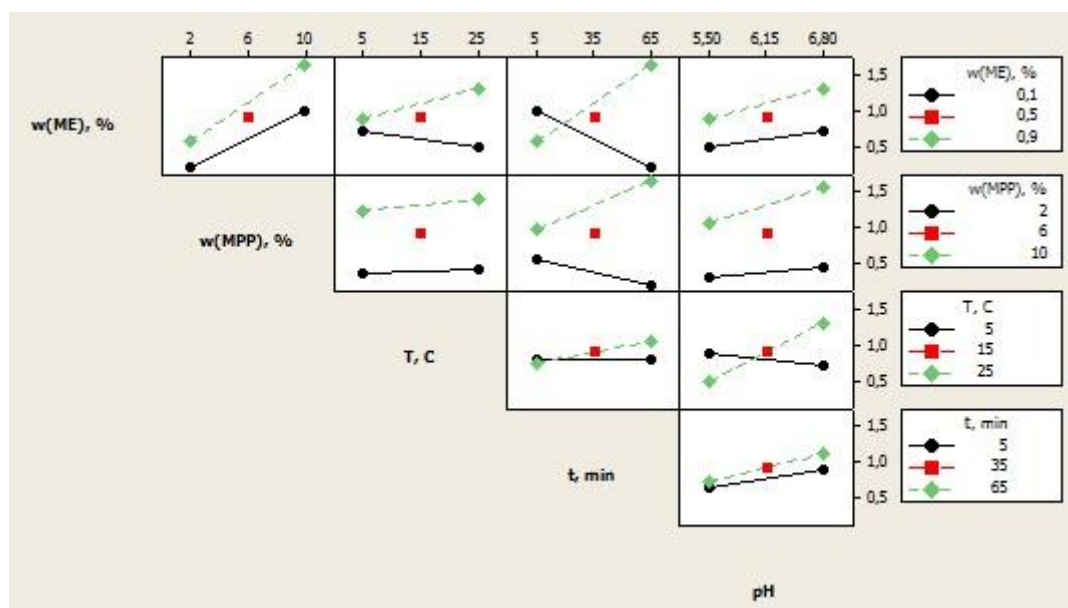


Слика 4.31. Парето график, ефекат испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (АВТS тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстраката гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

На слици 4.32. приказан је график главних ефеката где се детаљније виде промене укупног антиоксидативног капацитета са променом вредности сваког испитиваног параметра. Антиоксидативни капацитет расте са порастом концентрације млека, расте и са порастом концентрације екстраката гљива, али мало споријим трендом, што се види из нагиба. Раст укупног антиоксидативног капацитета се примећује и са порастом рН вредности. Код одзива ефекта времена мешања, капацитет расте до средње тачке, а онда се не мења даљим повећањем. Слично је и са температуром, где се види раст до средишње тачке, а онда и благи пад, једини негативни тренд у овом делу.



Слика 4.32. График главних ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.



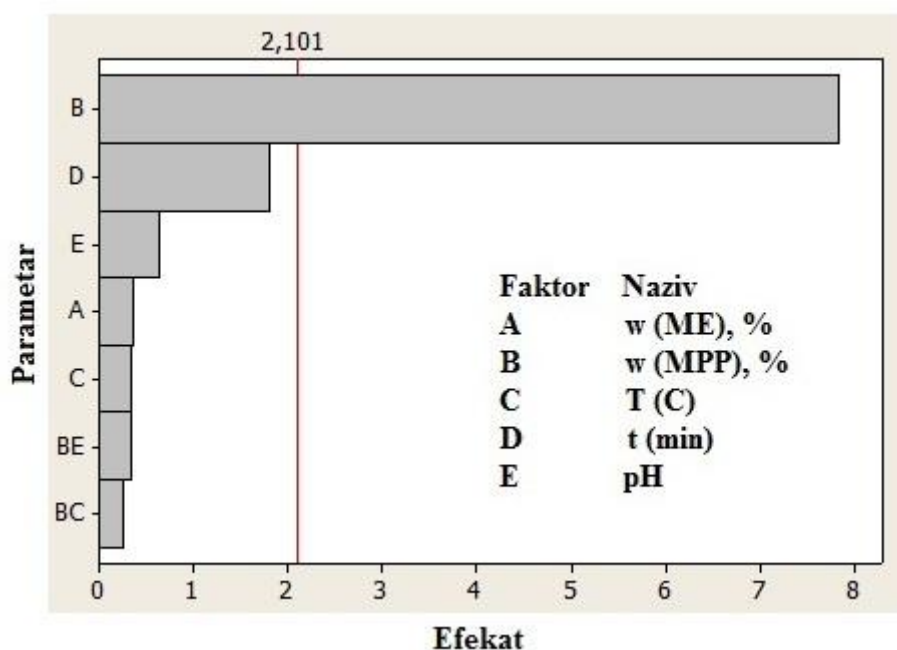
Слика 4.33. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Са дијаграма интеракција (слика 4.33.) види се да се укупни антиоксидативни капацитет повећава за обе вредности концентрације екстракта *L. sulphureus* при повећању концентрације млека. Исто је и код повећања рН вредности; за обе концентрације МЕ, укупни антиоксидативни капацитет расте, само што је тренд нижи у односу на пораст концентрације млека. При повећању температуре мешања, као и

времена мешања, за 0,9% МЕ капацитет расте, док за 0,1% МЕ опада. За обе испитиване концентрације млека, укупни антиоксидативни капацитет расте са порастом температуре и рН вредности, док код пораста времена мешања расте за 10% МРР, а опада за 2% МРР. Укупни антиоксидативни капацитет је константан код мешавина прављених на 5 °С и расте код мешавина прављених на 25 °С са порастом времена мешања; благо опада за мешавине прављене на 5 °С и расте за мешавине прављене на 25 °С док рН вредност расте. Укупни антиоксидативни капацитет расте сличним трендом приликом пораста рН вредности за обе вредности времена мешања. Разлика у тумачењу аналогних графика код *A.blazei* готово да нема. Благи пад укупног антиоксидативног капацитета видљив на графику главних ефеката за мешавине са *L. sulphureus* 15 – 25 °С везан је за ниже концентрације МРР (2%) и МЕ (0,1%).

4.7.3.2. FCC тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Средње вредности резултата мерења капацитета хелирања FCC тестом код мешавина са *L. sulphureus* су се кретале 1,04 – 5,00 mg EDTA/ mL узорка (прилог 5). И овде су све мешавине са 2% и 6% МРР показале капацитет хелирања до $\approx 2,1$ mg EDTA/ mL узорка, а мешавине са 10% МРР преко $\approx 4,0$ mg EDTA/ mL узорка, без обзира на друге параметре, са изузетком узорака 14L и 21L. Ово је у складу са претходно изнетим констатацијама у вези високих капацитета хелирања протеина млека (Elias et al., 2008; Kostić et al., 2021). Метанолни екстракт *L. sulphureus* показао је 50% хелирајућег капацитета за концентрацију од $\approx 0,3$ mg/ mL; и овде је указано на зависност капацитета од концентрације (Acharya et al., 2016). За разлику од њих, студија Klaus et al. (2013) наводи EC₅₀ вредност од $\approx 3,8$ mg екстракта/ mL за водени екстракт *L. sulphureus*.

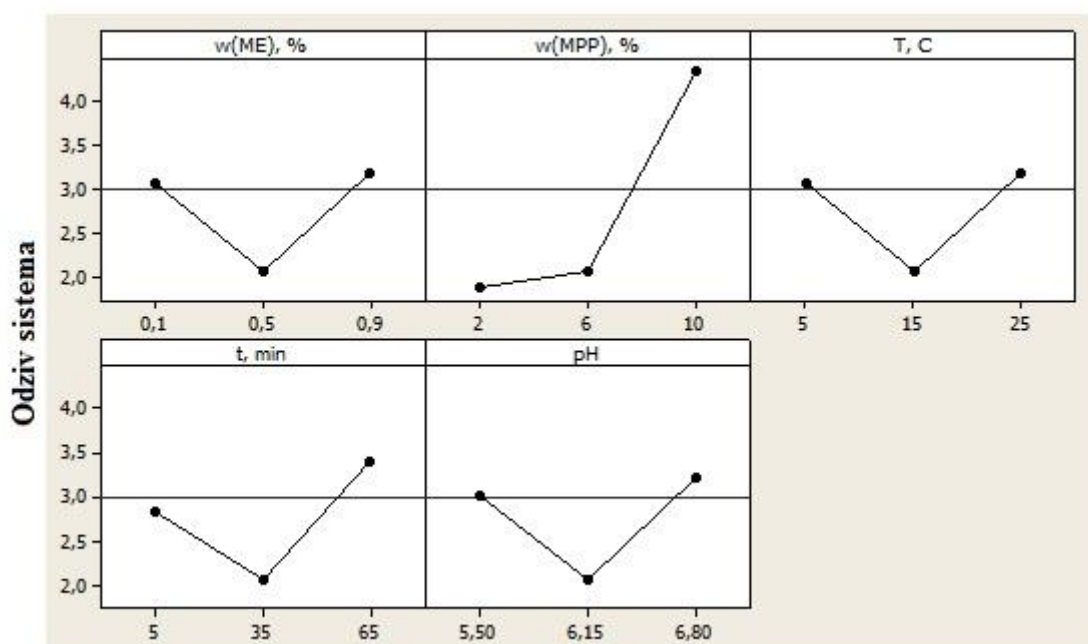


Слика 4.34. Парето график, ефекат испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(МЕ) – концентрација екстракта гљива; w(МРР) – концентрација термички третираног млека; Т – температура мешања; t – време мешања.

Хелирајућа својстава екстракта гљива зависна су од гликозидних веза у полисахаридима; од разлике у конфигурацији, углова, типа, степена гранања итд. зависиће и капацитет хелирања, која се може повећати нпр. екстракцијом у алкалним

условима која фаворизује α -конфигурацију гликозидних веза, тј. конформацију хеликса која има већи капацитет за формирање комплекса са металима (Klaus et al., 2013). У овом случају, због будуће употребе мешавина као прехранбених адитива, мора се наћи компромис између антиоксидативног капацитета и безбедности употребе екстраката гљива у исхрани, па је избор растварача ограничен.

На Парето графику са слике 4.34. види се једноставнија ситуација у односу на мешавине са *A.blazei*. У случају мешавина са *L. sulphureus*, статистички је значајан само параметар концентрације млека, док остали испитивани фактори нису значајни. Могуће је да због хетерогености биохемијског састава VL и мањег обима / изостанка интеракција са казеинима овај екстракт не утиче на структуру једињења млека и његова хелирајућа својства, па су у овом случају једини носиоци капацитета хелирања конституенти млека.

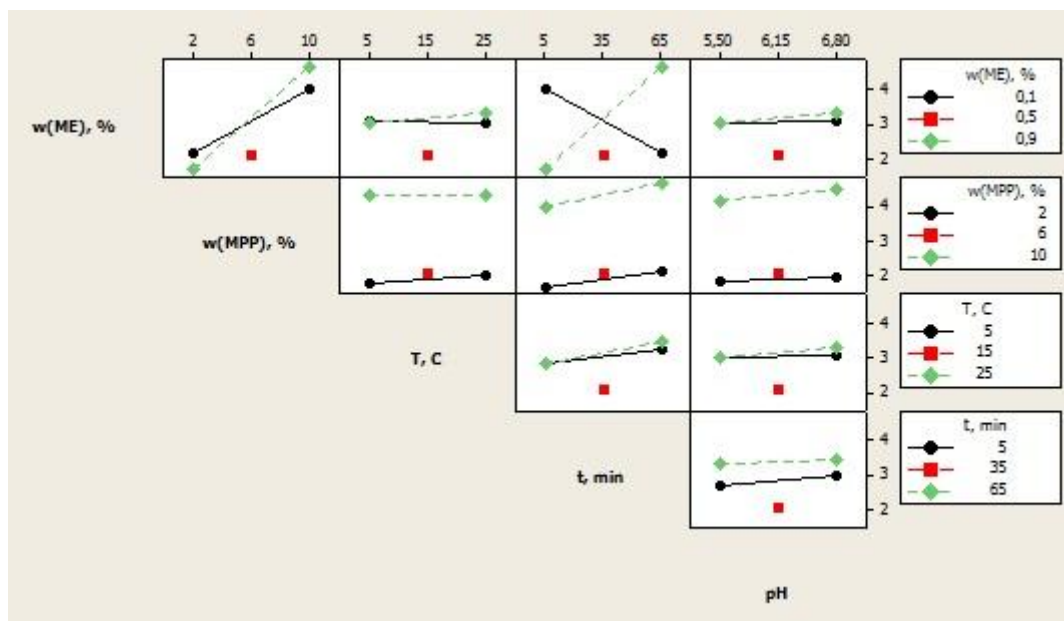


Слика 4.35. График главних ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстраката гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

График главних ефеката (слика 4.35.) потврђује да је једино значајан утицај концентрације млека, и то не у великој мери од 2 до 6% MPP, где се уочава благи тренд раста, већ у делу од 6 до 10% MPP, где је раст капацитета хелирања веома изражен. Одзиви осталих ефеката нису статистички значајни и максималне и минималне вредности испитиваних нивоа параметара имају сличан одзив, уз падове одзива у централним тачкама.

На дијаграму интеракција (слика 4.36.) се може видети да је капацитет хелирања готово константан за обе вредности концентрације MPP при променама осталих параметара. Могу се издвојити два карактеристична случаја, а то су раст капацитета хелирања узорака за обе концентрације ME са порастом % MPP, као и пад капацитета хелирања за 0,1% ME и раст за 0,9% ME са порастом времена мешања. У свим другим случајевима промене параметара не утичу значајно на друге параметре, тј. виде се

константне линије или линије са врло благим растом за оба нивоа датих параметара. И овде најбоље резултате показује 10% млеко, као код аналогних мешавина са *A.blazei*.

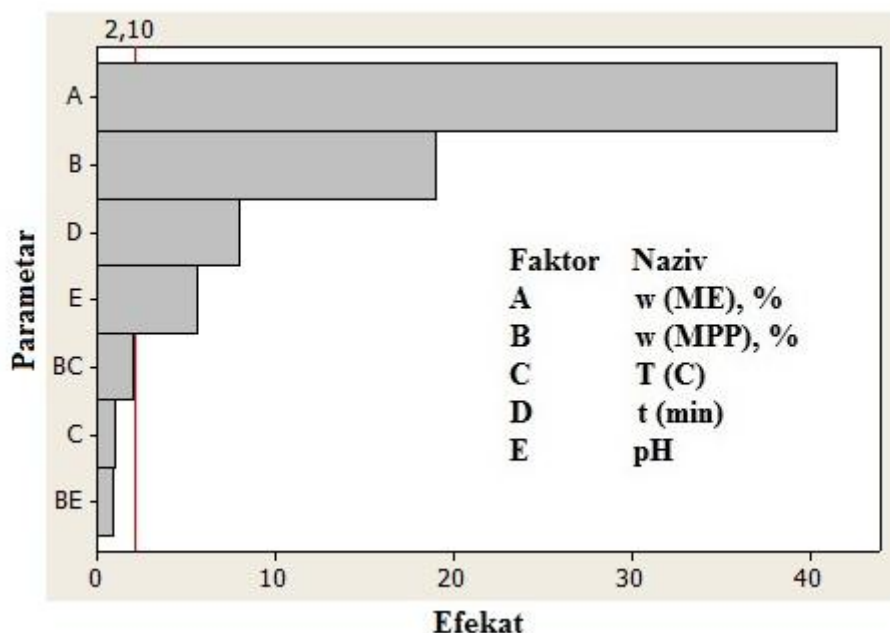


Слика 4.36. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на капацитет хелирања (FCC тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

4.7.3.3. FRP тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Средње вредности резултата мерења способности редукције Fe^{3+} FRP тестом код мешавина са *L. sulphureus* су се кретале у опсегу 45,00 – 737,07 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (прилог 5). И овде су узорци 2L, 12L, 14L, 22L, 24L, 25L показали најслабију редукујућу моћ (узорци са концентрацијама 0,1% МЕ и 2% МРР, без обзира на остале параметре). Веће средње вредности мерења у односу на мешавине са *A.blazei* могу потицати од различитог састава полазних екстракта гљива, где се VL одликује већом хетерогеношћу, као и од мањег степена интеракција са казеинима. Уколико у случају мешавина са екстрактом *L. sulphureus* нема интеракција са казеинима или их има у мањем степену, тј. има мање водоничних веза, гликозидних веза или хидрофобних интеракција, конституенти пореклом из гљива су доступнији и могу у већем степену редуковати Fe^{3+} у Fe^{2+} и показати већу редукујућу моћ. У литератури се наводи добра редукујућа моћ полисахаридних екстракта гљива (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2012; Petrović et al., 2014b). У студији Petrović et al. (2014a) приказане су веће FRP вредности водених и водено-метанолних екстракта *L. sulphureus* у односу на етанолни екстракт. Добра редукујућа својства екстракта гљива су између осталог у корелацији са садржајем α -глюкана (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2012). Протеини делују антиоксидативно трансфером водоника, па их FRP мерења не детектују (Stobiecka et al., 2022), а нема литературе која се бави антиоксидативношћу екстракта гљива са овако високим садржајем протеина. Са Парето графика (слика 4.37.) види се да су статистички значајни следећи испитивани параметри: % МЕ, % МРР, време мешања и рН вредност. И у овом случају, као код исте анализе мешавина са *A.blazei*, најзначајнији ефекат на редукујућу моћ има % МЕ. Разлика код мешавина са *L. sulphureus* је и значајност рН вредности, која за претходне мешавине није била

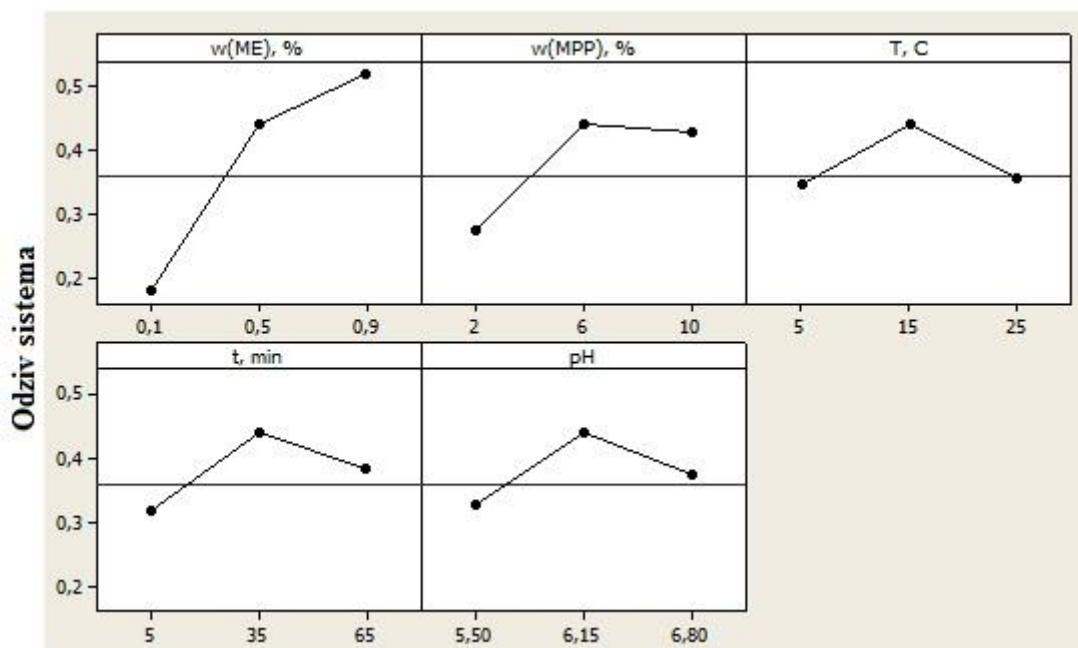
значајна. Утицај температуре, као и интеракције између параметара нису статистички значајни.



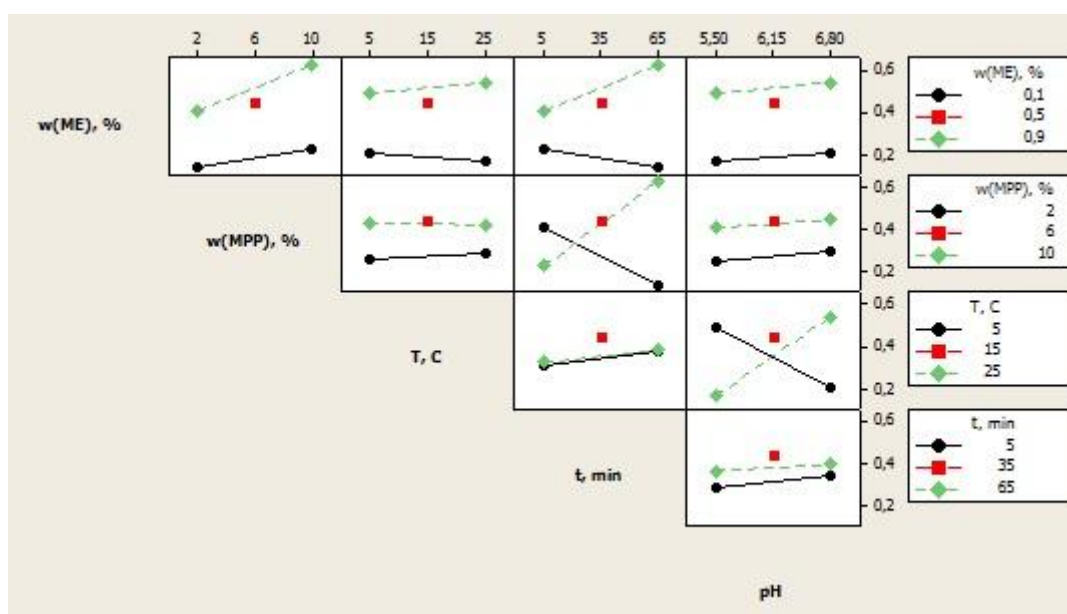
Слика 4.37. Парето график, ефекат испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстракта гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

График главних ефеката (слика 4.38.) указује на раст редукујуће моћи са растом % ME, као и на раст у опсегу 2 – 6% MPP (драстичнијим трендом у односу на аналогне мешавине са *A. blazei*), а затим благи пад у опсегу 6 – 10% MPP. Види се и да промена температуре овде нема утицаја, као и делимично бољи одговори виших испитиваних нивоа времена мешања и рН вредности, са благим порастом редукујуће моћи у централним тачкама.

На слици 4.39. приказан је дијаграм интеракција који показује да мешавине са 0,1% ME имају мало већу редукујућу моћ при порасту % MPP и рН вредности, као и за нијансу лошији одговор повећањем температуре и времена мешања. Код мешавина са 0,9% ME редукујућа моћ расте различитим темпом при порасту свих других параметара. На редукујућу моћ мешавина на оба нивоа % MPP не утичу температура и рН вредност, док пораст времена мешања утиче на већу редукујућу моћ мешавина са 10% MPP и мању са 2% MPP. Као код мешавина са *A. blazei*, време мешања не утиче на одговор различитих температура, а рН вредност нема утицај на одговор различитих времена мешања. Промена рН вредности утиче двојачко на мешавине прављене на различитим температурама; редукујућа моћ опада за мешавине прављене на 5 °C и расте за мешавине прављене на 25 °C.



Слика 4.38. График главних ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстраката гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.



Слика 4.39. Дијаграм интеракција ефеката испитиваних параметара на редукујућу моћ (FRP тест) код мешавина са *L. sulphureus*. Скраћенице: w(ME) – концентрација екстраката гљива; w(MPP) – концентрација термички третираног млека; T – температура мешања; t – време мешања.

Овде се могу изнети исти генерални закључци као за мешавине са *A. blazei* – на основу одговора базираних на три различита антиоксидативна теста, даљи експериментални дизајн се наставља са фиксним параметрима: pH 6,8 (ниво +1), време мешања 65 min (ниво +1), температура 25 °C (ниво +1). Између експерименталних услова и одговора и

овде постоји одлична корелација за АВТS и FRP тест (преко 99%), док је код FCC теста мало нижа (око 80%; прилог 6). Централни композитни дизајн наставља са испитивањем варирања два најугицајнија параметра - % ME и % MPP, како би се пронашао оптимални однос конституената са више аспеката.

4.7.4. Оптимизација мешавина применом централног композитног дизајна (CCD)

Након фракционог факторијског дизајна и анализе утицаја пет фактора и њихових интеракција, настављено је са централним композитним дизајном, где је испитиван утицај два фактора (независно променљиве) на антиоксидативна (ABTS тест, FCC тест, FRP тест) и техно-функционална својства (капацитет пене – FC, стабилност пене – FS, индекс активности емулзије – EAI, индекс стабилности емулзије – ESI). Поред већ испитиваних антиоксидативних својстава, у овој фази експерименталног дизајна анализирана су и техно-функционална својства, 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. За сваки фактор изабрана су три нивоа: минимални (-1), централни (0) и максимални (+1) (табела 4.5.). Ови нивои су слични као опсег концентрација конституената код фракционог факторијског дизајна. На основу резултата скрининга (FFD) утврђено је да опсеге не треба битније мењати, већ у овим оквирима одредити оптималне вредности. Преостала три фактора из FFD су била константна: температура мешања ја износила 25 °С, време мешања је било 65 min, а рН вредност је износила 6,80.

Табела 4.5. Експериментални фактори и њихови нивои код CCD

Испитивани фактори (независно променљиве)	Ниво		
	Минимални (-1)	Централни (0)	Максимални (+1)
w(ME) – концентрација екстракта гљива (%)	0,2	0,6	1,0
w(MPP) – концентрација термички третираног млека (%)	2	6	10

Централни композитни дизајн је садржао по 14 експеримената за сваку гљиву, тј. припремљено је 14 мешавина TRM са VA (1A, 2A, 3A, итд.) и 14 мешавина TRM са VL (1L, 2L, 3L, итд.). 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*. Реалне вредности матрице приказане су у табели 4.6. Током CCD за припрему мешавина искоришћена је нова тура екстракта гљива са садржајем глукана приказаним у табели 4.7. Будући да је CCD део методологије одговора површина (RSM), анализа и поређење резултата су извршени помоћу дијаграма одговора површина који представљају зависност одговарајућег антиоксидативног или техно-функционалног својства у односу на промене концентрација екстракта гљива и термички третираног млека, као и помоћу вредности регресионих коефицијената.

Табела 4.6. CCD антиоксидативних и техно-функционалних својстава мешавина, реалне вредности

Број експеримента	% екстракта гљиве - w(МЕ)	% термички третираног млека - w(MPP)
1	1,00	10,00
2	0,60	6,00
3	0,20	2,00
4	1,00	2,00
5	0,60	6,00
6	0,20	10,00
7	0,60	6,00
8	0,60	0,34
9	0,60	6,00
10	0,60	6,00
11	1,17	6,00
12	0,03	6,00
13	0,60	6,00
14	0,60	11,66

Табела 4.7. Садржај глукана у воденим екстрактима гљива коришћеним за прављење мешавина током и након CCD

Узорак	Укупни садржај глукана (g/100 g)	Садржај α -глукана (g/100 g)	Садржај β -глукана (g/100 g)
VA*	7,95 \pm 0,18 ^a	1,23 \pm 0,02 ^a	6,72 \pm 0,21 ^a
VL*	8,29 \pm 0,20 ^a	1,50 \pm 0,04 ^b	6,80 \pm 0,25 ^a

У оквиру сваке колоне, резултати после којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*.

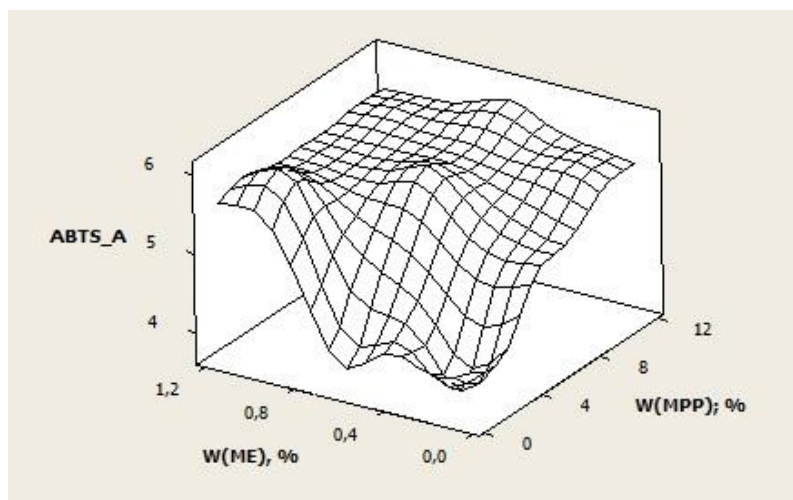
4.7.5. Оптимизација мешавина са екстрактом *A. blazei* применом CCD

4.7.5.1. ABTS тест мешавина са екстрактом *A. blazei*

Средње вредности резултата мерења укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) код мешавина са *A. blazei* према шеми из табеле 4.6. су се кретале у опсегу 3,73 – 6,04 mg Trolox/ mL узорка (прилог 7), што је више у односу на вредности ABTS теста измерене у FFD. За наставак, тј. CCD, одабрани су оптимални услови за три фактора из FFD који су фиксирани, а водени екстракт *A. blazei* коришћен у овој етапи истраживања садржао је већу концентрацију глукана у односу на екстракт коришћен током FFD, па одатле потичу разлике. Такође, тип млека, концентрација казеина, тип екстракта гљиве, удео биоактивних материја у екстрактима гљива, њихова синергија и други фактори утичу на варирање резултата и отежавају поређење са литературом, посебно када су полазни узорци храна, тј. природни материјал који је специфичан и има различит биохемијски састав (Çekiç et al., 2015; Chen et al., 2003; Shah & Modi, 2020; Siu et al., 2014). Фактори који утичу на укупни антиоксидативни капацитет, главни носиоци капацитета пореклом из млека и екстраката гљива, као и значајни литературни подаци детаљније су описани у поглављу 4.7.2.1.

На слици 4.40. приказан је дијаграм одговора површина који показује укупни антиоксидативни капацитет у функцији концентрација екстракта *A. blazei* и термички третираног млека. Укупни антиоксидативни капацитет је био у високој корелацији са експерименталним условима ($R^2 = 90,49\%$). За испитиване параметре и њихове нивое

примећује се да су највиши резултати повезани са највећом концентрацијом екстракта гљиве ($w(\text{ME})=1\%$), као и да највиши укупни антиоксидативни капацитет имају мешавине са 6-10% МРР, тј. да се за формулацију оптималног адитива са овог аспекта може користити и млеко са нижом концентрацијом од 10%, уз одличне резултате.



Слика 4.40. Дијаграм одговора површина; укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) мешавина са *A.blazei* у зависности од концентрације екстракта гљиве ($w(\text{ME})$) и термички третираног млека ($w(\text{MPP})$); $R^2=90,49\%$

Табела 4.8. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) мешавина са *A.blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободе	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-вредност	p-вредност
Блокови	1	0,02983	0,02983	0,02983	0,31	0,595
Регресија	5	6,39320	6,39320	1,27864	13,27	0,002
Линеарна	2	3,86466	3,86466	1,93233	20,05	0,001
$w(\text{ME})$	1	1,22145	1,22145	1,22145	12,67	0,009
$w(\text{MPP})$	1	2,64321	2,64321	2,64321	27,42	0,001
Квадратна	2	1,37067	1,37067	0,68533	7,11	0,021
$w(\text{ME}), w(\text{ME})$	1	0,18652	0,26451	0,26451	2,74	0,142
$w(\text{MPP}), w(\text{MPP})$	1	1,18415	1,18415	1,18415	12,28	0,010
Интеракција	1	1,15788	1,15788	1,15788	12,01	0,010
$w(\text{ME}), w(\text{MPP})$	1	1,15788	1,15788	1,15788	12,01	0,010
Резидуална грешка	7	0,67473	0,67473	0,09639		
Неинтерполирано	3	0,48158	0,48158	0,16053	3,32	0,138
Грешка	4	0,19315	0,19315	0,04829		
Укупно	13	7,09776				

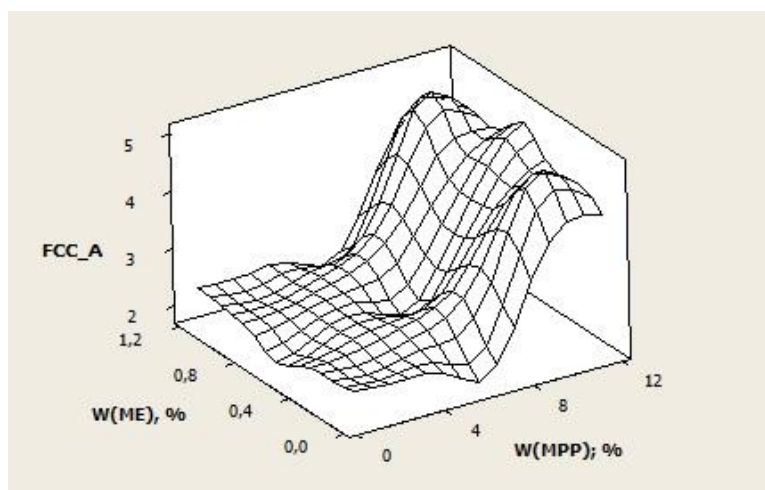
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободе.

У табели 4.8. приказана је анализа варијанси (ANOVA) за модел одговора површине код одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест). ANOVA укупан варијабилитет скупа података дели на факторску или организовану компоненту, која је последица промене испитиваних параметара између одабраних нивоа и резидуалну или случајну компоненту, која настаје услед случајне грешке која је повезана са мерењем изабраног одговора система (Sredović Ignjatović, 2015). Статистички значајни

регресиони коефицијенти су они чија је p -вредност једнака или мања од изабране вредности α (у овој дисертацији $\alpha=0,05$; тј. подручје поверења је 95%) (Sredović Ignjatović, 2015). Може се закључити да на вредности АВТS теста утичу линеарни чланови концентрације МРР и МЕ, интеракција између ових променљивих, као и квадрат концентрације МРР.

4.7.5.2. FCC тест мешавина са екстрактом *A.blazei*

Средње вредности резултата мерења капацитета хелирања FCC тестом код мешавина са *A.blazei* су биле у опсегу 1,88 – 5,00 mg EDTA/ mL узорка (прилог 7), што је врло слично када се резултати упореде са вредностима FCC теста из FFD, као и са литературом (Kostić et al., 2021; Milinčić et al., 2022). За разлику од АВТS теста, где фигуришу и једињења гљиве и једињења млека, овде је ефекат млека кључан, па промена садржаја глукана код новог екстракта *A.blazei* није видљива. Јасно се могу уочити три узорка са високим FCC вредностима (1А, 6А, 14А) која се тичу млека са $\geq 10\%$ МРР, док су остали узорци слични, са капацитетом хелирања $\approx 1,9 - 2,2$ mg EDTA/ mL узорка. Може се приметити и мали утицај $w(\text{ME})$, јер се једина мешавина са 0,34% МРР (8А) може упоредити са мешавинама са 2 и 6% МРР. Овде се и поред ниске концентрације млека испољава капацитет хелирања од 1,93 mg EDTA/ mL, вероватно због концентрације екстракта *A.blazei* од 0,6%.



Слика 4.41. Дијаграм одговора површина; капацитет хелирања (FCC тест) мешавина са *A.blazei* у зависности од концентрације екстракта гљиве ($w(\text{ME})$) и термички третираног млека ($w(\text{MPP})$); $R^2=95,51\%$

Са дијаграма одговора површина (слика 4.41.) види се зависност капацитета хелирања од % МРР, посебно у рангу 6-10%, као и да капацитет хелирања не зависи пуно од % МЕ. Ово је видљиво и у табели 4.9. где је значајна концентрација млека, али не и концентрација екстракта *A.blazei*, као ни њихова интеракција. Одговор система је и овде високо корелисан са експерименталним условима ($R^2 = 95,51\%$).

Табела 4.9. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета хелирања (FCC тест) мешавина са *A.blazei*, кодиране вредности

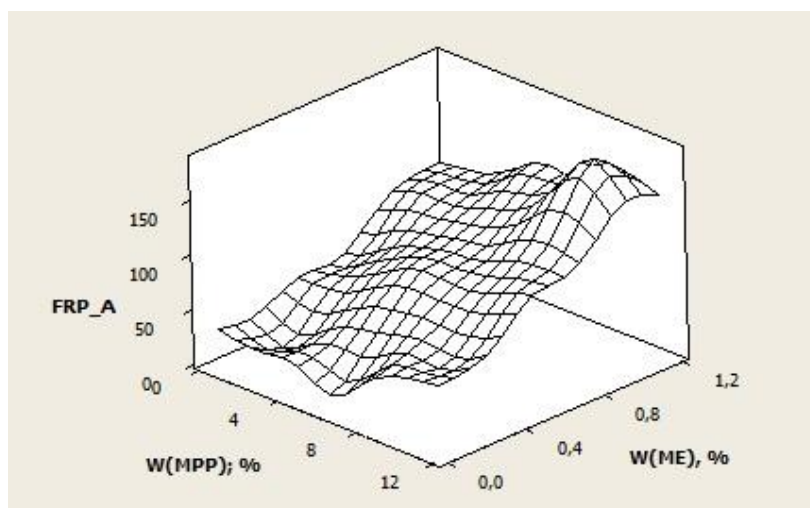
Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	0,8345	0,8345	0,8345	6,90	0,034
Регресија	5	17,1837	17,1837	3,4367	28,41	0,000
Линеарна	2	11,8832	11,8832	5,9416	49,12	0,000
w(ME)	1	0,0348	0,0348	0,0348	0,29	0,608
w(MPP)	1	11,8483	11,8483	11,8483	97,95	0,000
Квадратна	2	5,2993	5,2993	2,6497	21,91	0,001
w(ME), w(ME)	1	0,0438	0,1482	0,1482	1,23	0,305
w(MPP), w(MPP)	1	5,2556	5,2556	5,2556	43,45	0,000
Интеракција	1	0,0012	0,0012	0,0012	0,01	0,925
w(ME), w(MPP)	1	0,0012	0,0012	0,0012	0,01	0,925
Резидуална грешка	7	0,8467	0,8467	0,1210		
Неинтерполирано	3	0,8367	0,8367	0,2789	110,93	0,000
Грешка	4	0,0101	0,0101	0,0025		
Укупно	13	18,8650				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.5.3. FRP тест мешавина са екстрактом *A.blazei*

Средње вредности резултата мерења способности редукације Fe^{3+} FRP тестом код мешавина са *A.blazei* су се кретале између 10,96 и 181,30 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (прилог 7). Највећу редукујућу моћ показао је узорак 1А, са комбинацијом нивоа испитиваних параметара од 1% ME и 10% MPP.

На слици 4.42. се може приметити равномеран пораст редукујуће моћи истовременим растом % ME и % MPP до највише тачке са максималним вредностима оба параметра, односно значајан утицај оба параметра. Већи утицај имају конституенти екстракта *A.blazei*, али се утицај млека огледа када се нпр. упореде сличне вредности редукујуће моћи узорака 4А и 5А (≈ 102 и $101 \mu g$ аскорбинске киселине/ mL) уз услове 1% ME/2% MPP и 0,6% ME/6% MPP, респективно. У овом случају већа концентрација млека може да надомести нижи проценат додатог екстракта гљиве, тј. да резултује сличним вредностима редукујуће моћи. Ово је битно због могуће формулације адитива, јер се смањењем концентрације екстракта *A.blazei* уз већи додатак млека може остварити значајан економски ефекат, уз непромењена функционална својства. Значајност концентрације оба конституента видљива је у табели 4.10, док квадратни и интеракцијски члан једначине математичког модела нису значајни. Експериментални услови и редукујућа моћ и овде су високо корелисани ($R^2 = 97,27\%$). Максималне вредности редукујуће моћи у складу су са литературом везаном за водене екстракте гљива (Shah & Modi, 2020), али су ниже у односу на вредности FRP теста добијене у FFD. 10% MPP са додатком ниске концентрације ME (0,2%; узорак 6) такође не испољава високу редукујућу моћ, што је у складу са литературом (Milinčić et al., 2022).



Слика 4.42. Дијаграм одговора површина; редукујућа моћ (FRP тест) мешавина са *A.blazei* у зависности од концентрације екстракта гљиве ($w(\text{ME})$) и термички третираног млека ($w(\text{MPP})$); $R^2=97,27\%$

Табела 4.10. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања редукујуће моћи (FRP тест) мешавина са *A.blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободе	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-вредност	p-вредност
Блокови	1	207,7	207,7	207,7	2,03	0,197
Регресија	5	25256,2	25256,2	5051,2	49,45	0,000
Линеарна	2	24516,0	24516,0	12258,0	120,01	0,000
$w(\text{ME})$	1	19195,5	19195,5	19195,5	187,93	0,000
$w(\text{MPP})$	1	5320,5	5320,5	5320,5	52,09	0,000
Квадратна	2	327,1	327,1	163,6	1,60	0,268
$w(\text{ME}), w(\text{ME})$	1	232,7	254,6	254,6	2,49	0,158
$w(\text{MPP}), w(\text{MPP})$	1	94,5	94,5	94,5	0,92	0,368
Интеракција	1	413,1	413,1	413,1	4,04	0,084
$w(\text{ME}), w(\text{MPP})$	1	413,1	413,1	413,1	4,04	0,084
Резидуална грешка	7	715,0	715,0	102,1		
Неинтерполирано	3	435,5	435,5	145,2	2,08	0,246
Грешка	4	279,5	279,5	69,9		
Укупно	13	26178,9				

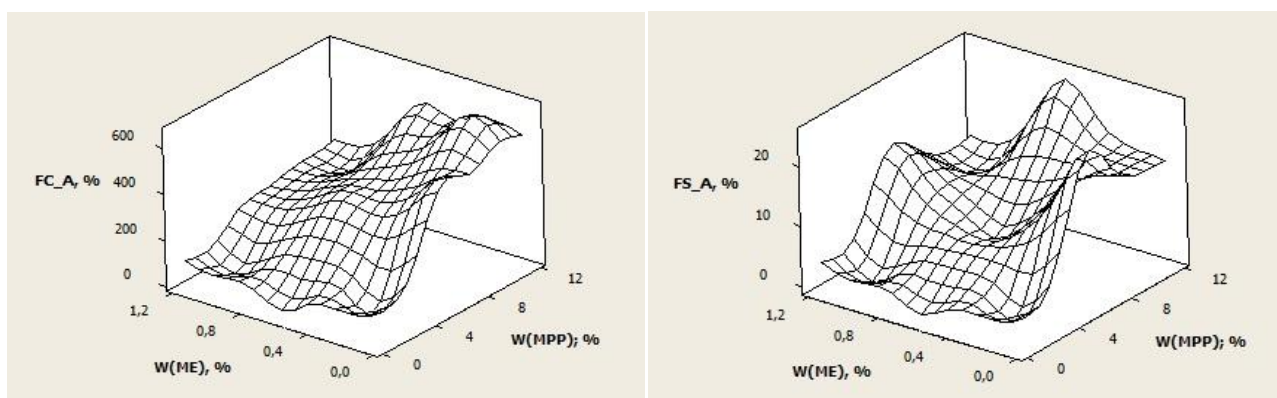
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободе.

4.7.5.4. Пенива својства мешавина са екстрактом *A.blazei*

Вредности мерења капацитета пене (FC) и стабилности пене (FS) мешавина са *A.blazei* налазе се у прилогу 7. Сви узорци су показали капацитет формирања пене, углавном због утицаја протеина млека. Узорци 3А, 4А и 8А ($w(\text{MPP}) \leq 2\%$) су показали најниже вредности пенивих својстава (FC 16,67 – 33,33%) без обзира на концентрацију екстракта гљиве. Интересантно је да је мешавина 6А показала најбољи капацитет формирања пене (650%) уз 10% МРР и само 2% МЕ, док су нпр. мешавине са високим процентом МЕ (узорци 1А и 11А) имале далеко лошије FC вредности (233,33 и 225,00%, респективно). Када се посматра стабилност пене (FS), само седам од четрнаест узорака је показало стабилност након три минута. Резултати су варирали од

8,33 до 25,00%, што указује на ниску стабилност. У литератури се наводе добра пенива својства термички третираног козјег млека, поготово на рН вредностима 6,5 – 7,1 (Pešić, 2011). Наводи се и да настали WP/CN комплекси, због своје равномерне распрострањености по површини мицеле дају правилан сферни облик и да се могу повезивати хидрофобним везама и/или ковалентним везама, што омогућује кохезивност, компактност и стабилност протеинских филмова (Pešić, 2011). Стабилност пене зависи од јачине протеинског филма и пермеабилности према гасовима; претпоставка је да велике молекулске масе комплекса екстракта *A.blazei* и млека онемогућавају интеракције протеина из мешавина, па преовлађују гравитационе силе, а пене нестају (Bagać et al., 2011; Barac et al., 2010). Студија Ashraf Khan et al. (2017) такође наводи лошија пенива својства β -глюкана из *Agaricus bisporus* у односу на *Pleurotus ostreatus* и *Coprinus atramentarius*.

Дијаграми одговора површина (слика 4.43.) показују да се најбољи капацитет пене постиже при највећим концентрацијама млека уз ниже концентрације гљиве (до 0,6%), као и на неправилнији облик површине везане за FS, због постојања доста узорака који не показују стабилност (FS=0). Ипак, може се приметити да је стабилност пене већа ако је w(MPP) већи. Корелација између експерименталних услова и пенивих својстава је умерена, мања него у случају антиоксидативних тестова ($R^2(FC) = 72,66\%$; $R^2(FS) = 63,62\%$). У табелама 4.11. и 4.12. приказана је анализа варијанси (ANOVA) за модел одговора површине код одређивања капацитета пене и стабилности пене мешавина, респективно. Према p -вредностима може се закључити да је за обе методе једино битна концентрација млека (линеарни члан), док остали чланови нису статистички значајни, што је у складу са наведеним литературним подацима. Уз велика варирања, ипак се може закључити да једињења из воденог екстракта *A.blazei* делимично блокирају протеине млека да испоље добра пенива својства, вероватно због помињаних интеракција, што може бити искоришћено за смањење пенивости тамо где она није пожељна (Huppertz, 2010).



Слика 4.43. Дијаграми одговора површина; пенива својства мешавина са *A.blazei* (лево – капацитет пене; десно – стабилност пене) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)); FC - $R^2=72,66\%$; FS - $R^2=63,62\%$.

Табела 4.11. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета пене мешавина са *A.blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	1434	1434	1434	0,06	0,820
Регресија	5	474204	474204	94841	3,71	0,058
Линеарна	2	406537	406537	203269	7,95	0,016
w(ME)	1	93420	93420	93420	3,65	0,098
w(MPP)	1	313117	313117	313117	12,25	0,010
Квадратна	2	24264	24264	12132	0,47	0,641
w(ME), w(ME)	1	172	625	625	0,02	0,880
w(MPP), w(MPP)	1	24092	24092	24092	0,94	0,364
Интеракција	1	43403	43403	43403	1,70	0,234
w(ME), w(MPP)	1	43403	43403	43403	1,70	0,234
Резидуална грешка	7	178971	178971	25567		
Неинтерполирано	3	28600	28600	9533	0,25	0,856
Грешка	4	150370	150370	37593		
Укупно	13	654608				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

Табела 4.12. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања стабилности пене мешавина са *A.blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	124,01	124,008	124,008	1,81	0,220
Регресија	5	712,21	712,206	142,441	2,08	0,183
Линеарна	2	505,94	505,940	252,970	3,70	0,080
w(ME)	1	50,59	50,594	50,594	0,74	0,418
w(MPP)	1	455,35	455,346	455,346	6,66	0,036
Квадратна	2	188,91	188,905	94,453	1,38	0,312
w(ME), w(ME)	1	183,34	187,188	187,188	2,74	0,142
w(MPP), w(MPP)	1	5,56	5,564	5,564	0,08	0,784
Интеракција	1	17,36	17,361	17,361	0,25	0,630
w(ME), w(MPP)	1	17,36	17,361	17,361	0,25	0,630
Резидуална грешка	7	478,27	478,270	68,324		
Неинтерполирано	3	107,90	107,899	35,966	0,39	0,768
Грешка	4	370,37	370,370	92,593		
Укупно	13	1314,48				

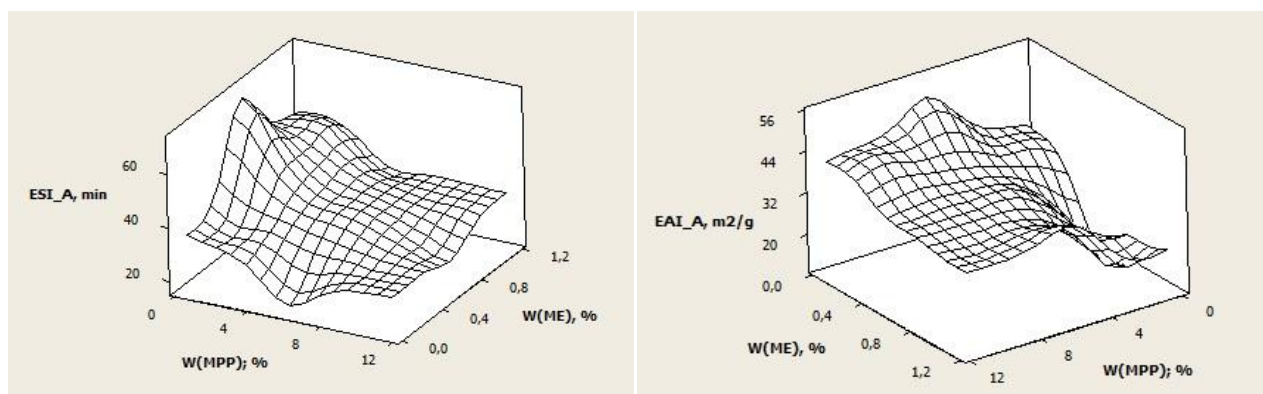
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.5.5. Емулгујућа својства мешавина са екстрактом *A.blazei*

У прилогу 7 приказане су средње вредности одређивања емулгујућих својстава мешавина са *A.blazei* помоћу два параметра - ESI и EAI индекса. Ове вредности кретале су се између 17,88 и 70,97 min (ESI) и 11,48 – 51,03 m²/g (EAI). EAI индекс је у складу са подацима везаним за козје млеко, док су ESI вредности ниже од литературних података (Pešić, 2011). Могу се уочити више вредности ESI код узорака 4А и 8А, односно код мешавина са ниским садржајем млека у комбинацији са средњим или високим концентрацијама екстракта гљиве. Обрнуто, ова два узорка показала су

најниже EAI вредности, док су највише показали узорци са већом концентрацијом млека. Претпоставка је да одмах након хомогенизације долази до адсорпције протеина млека, али да њихова стабилност није висока. Разлог могу бити поменуте интеракције са конститuentима гљиве, које им онемогућују да се повезују. Након 10 минута утицај екстракта *A.blazei* постаје пресудан за одржавање стабилности, можда због добрих емулгујућих својстава протеина *A.blazei* ($\approx 34 \text{ g}/100\text{g}$). У литератури се наводе и добра емулгујућа својства β -глюкана пореклом из гљива, али рачуната преко других показатеља (Ashraf Khan et al., 2017). Додатак гљива не утиче или слабо снижава вредности емулгујућих својстава кукурузног брашна (Ishara et al., 2018).

Ово је у складу са дијаграмима одговора површина са слике 4.44, где се виде највеће вредности ESI код мешавина са нижим % MPP и средњим и вишим % ME, као и обрнути тренд код EAI индекса, односно пад EAI код ниских % MPP и виших % ME. Ово је подржано високом корелацијом између експерименталних услова и емулгујућих својстава ($R^2(\text{ESI}) = 85,64\%$; $R^2(\text{EAI}) = 81,58\%$). У табелама 4.13. и 4.14. приказана је анализа варијанси (ANOVA) за модел одговора површине код одређивања ESI и EAI, респективно. Према p -вредностима може се закључити да су за обе методе битни сви линеарни и квадратни чланови, као и да интеракције концентрација млека и екстракта *A.blazei* нису од статистичког значаја. Додатак екстракта *A.blazei* утиче на побољшање емулгујућих својстава козјег млека, што може бити корисно у прехранбеној индустрији.



Слика 4.44. Дијаграми одговора површина; емулгујућа својства мешавина са *A.blazei* (лево – индекс стабилности емулзије; десно – индекс активности емулзије) у зависности од концентрације екстракта гљиве ($w(\text{ME})$) и термички третираног млека ($w(\text{MPP})$); ESI - $R^2=85,64\%$; EAI - $R^2=81,58\%$.

Табела 4.13. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса стабилности емулзије мешавина са *A. blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	0,01	0,01	0,006	0,00	0,991
Регресија	5	1799,94	1799,94	359,988	8,35	0,007
Линеарна	2	1266,41	1266,41	633,206	14,68	0,003
w(МЕ)	1	346,83	346,83	346,834	8,04	0,025
w(MPP)	1	919,58	919,58	919,578	21,32	0,002
Квадратна	2	489,25	489,25	244,627	5,67	0,034
w(МЕ), w(МЕ)	1	312,21	275,35	275,347	6,39	0,039
w(MPP), w(MPP)	1	177,04	177,04	177,045	4,11	0,082
Интеракција	1	44,27	44,27	44,274	1,03	0,345
w(МЕ), w(MPP)	1	44,27	44,27	44,274	1,03	0,345
Резидуална грешка	7	301,86	301,86	43,123		
Неинтерполирано	3	219,36	219,36	73,119	3,54	0,127
Грешка	4	82,51	82,51	20,626		
Укупно	13	2101,81				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

Табела 4.14. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса активности емулзије мешавина са *A. blazei*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	0,12	0,12	0,122	0,00	0,957
Регресија	5	1231,21	1231,21	246,243	6,20	0,017
Линеарна	2	751,41	751,41	375,703	9,46	0,010
w(МЕ)	1	334,91	334,91	334,914	8,43	0,023
w(MPP)	1	416,49	416,49	416,492	10,48	0,014
Квадратна	2	465,48	465,48	232,742	5,86	0,032
w(МЕ), w(МЕ)	1	132,97	101,90	101,896	2,56	0,153
w(MPP), w(MPP)	1	332,52	332,52	332,515	8,37	0,023
Интеракција	1	14,32	14,32	14,323	0,36	0,567
w(МЕ), w(MPP)	1	14,32	14,32	14,323	0,36	0,567
Резидуална грешка	7	278,11	278,11	39,731		
Неинтерполирано	3	34,12	34,12	11,372	0,19	0,900
Грешка	4	244,00	244,00	60,999		
Укупно	13	1509,45				

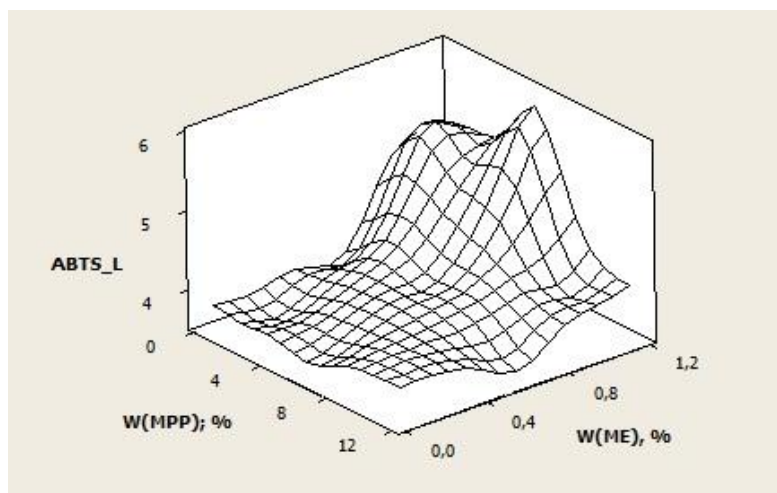
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.6. Оптимизација мешавина са екстрактом *L. sulphureus* применом CCD

4.7.6.1. ABTS тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Средње вредности резултата мерења укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) мешавина са *L. sulphureus* према шеми из табеле 4.6. су се кретале у опсегу 3,63 – 5,88 mg Trolox/ mL узорка (прилог 8), тј. вредности су се кретале у опсегу \approx 3,7 – 4,2 mg Trolox/ mL узорка за све узорке, осим узорка 4L и 11L ($>5,4$ mg Trolox/ mL узорка).

И ове вредности су више у односу на вредности ABTS теста измерене у FFD, делимично због фиксирања оптималних вредности три параметра из FFD (pH, t, T), као и због коришћења свеже припремљеног екстракта који је садржао скоро два пута веће концентрације глукана у односу на први екстракт (коришћен за FFD експеримент). Petrović et al. (2014a) такође упућују на могућу повезаност укупног антиоксидативног капацитета екстракта *L. sulphureus* мерену ABTS (TEAC) методом и садржаја полисахарида.



Слика 4.45. Дијаграм одговора површина; укупни антиоксидативни капацитет (ABTS тест) мешавина са *L. sulphureus* у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)); $R^2=93,94\%$

Табела 4.15. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања укупног антиоксидативног капацитета (ABTS тест) мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	0,01876	0,01876	0,01876	0,38	0,555
Регресија	5	5,29003	5,29003	1,05801	21,64	0,000
Линеарна	2	3,30683	3,30683	1,65341	33,82	0,000
w(ME)	1	3,07979	3,07979	3,07979	63,00	0,000
w(MPP)	1	0,22704	0,22704	0,22704	4,64	0,068
Квадратна	2	1,26822	1,26822	0,63411	12,97	0,004
w(ME), w(ME)	1	1,08227	1,00816	1,00816	20,62	0,003
w(MPP), w(MPP)	1	0,18595	0,18595	0,18595	3,80	0,092
Интеракција	1	0,71498	0,71498	0,71498	14,62	0,007
w(ME), w(MPP)	1	0,71498	0,71498	0,71498	14,62	0,007
Резидуална грешка	7	0,34222	0,34222	0,04889		
Неинтерполирано	3	0,30888	0,30888	0,10296	12,35	0,017
Грешка	4	0,03334	0,03334	0,00834		
Укупно	13	5,65102				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

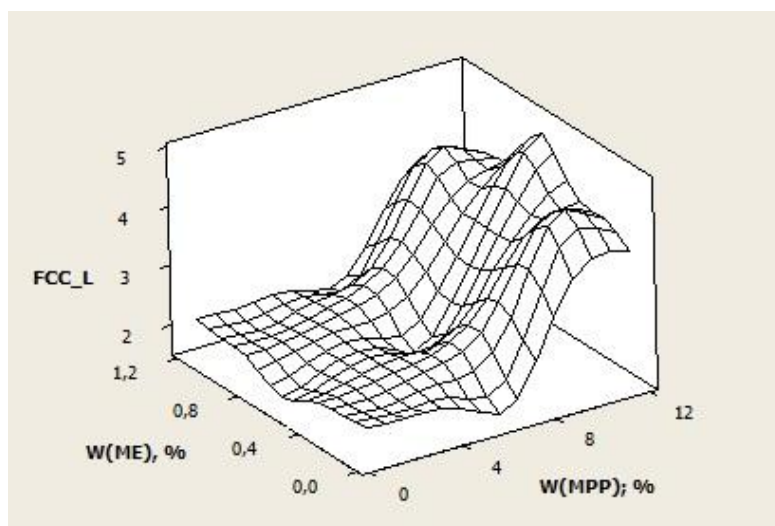
На слици 4.45. приказан је дијаграм одговора површина који показује укупни антиоксидативни капацитет мешавина. ABTS тест је високо корелисан са експерименталним условима ($R^2 = 93,94\%$), тј. нивоима концентрација екстракта *L.*

sulphureus и термички третираног млека. Примећује се да укупни антиоксидативни капацитет расте са порастом концентрације екстракта гљиве у опсегу 0,6 - 1%, као и да има највиши одговор за w(ME) од 1%, док је код млека ситуација другачија, односно за 2% је одговор добар, за 6% највиши, док се за 10% MPP вредности ABTS теста смањују. Највиши пик приметан је код мешавина са највећом концентрацијом екстракта *L. sulphureus* и средишњом концентрацијом млека (6%). Из табеле 4.15. може се приметити да је статистички значајан утицај концентрације екстракта VL, и то и линеаран и квадратни члан, као и интеракција између ME и MPP, док утицај концентрације млека није статистички значајан.

4.7.6.2. FCC тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Средње вредности резултата мерења капацитета хелирања FCC тестом код мешавина са *L. sulphureus* су биле у опсегу 1,68 – 4,89 mg EDTA/ mL узорка (прилог 8), што је слично као код мешавина са *A. blazei*, резултатима из FFD, као и у складу са литературом (Kostić et al., 2021; Milinčić et al., 2022). Као код мешавина са *A. blazei*, и овде се уочавају драстично бољи резултати код мешавина са $\geq 10\%$ MPP (узорци 1L, 6L, 14L), као и слични одговори осталих узорака, где се види делимичан утицај додатка екстракта *L. sulphureus* (узорак 8L).

Са дијаграма одговора површина (слика 4.46.) видљив је утицај додатка млека у опсегу 6-10%, као и релативно слични одговори када се прати утицај додатка различитих % ME, са мало бољим резултатима додатка 0,6% ME у односу на 0,2% и 1%, а при највишим концентрацијама млека. Одговор система је одлично корелисан са експерименталним условима ($R^2 = 97,86\%$). Анализа варијансе јасно потврђује утицај концентрације млека (табела 4.16.).



Слика 4.46. Дијаграм одговора површина; капацитет хелирања (FCC тест) мешавина са *L. sulphureus* у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)); $R^2=97,86\%$

Табела 4.16. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета хелирања (FCC тест) мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободе	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	0,3820	0,3820	0,3820	7,44	0,029
Регресија	5	16,0705	16,0705	3,2141	62,59	0,000
Линеарна	2	10,3112	10,3112	5,1556	100,39	0,000
w(ME)	1	0,0068	0,0068	0,0068	0,13	0,726
w(MPP)	1	10,3044	10,3044	10,3044	200,65	0,000
Квадратна	2	5,7400	5,7400	2,8700	55,88	0,000
w(ME), w(ME)	1	0,0429	0,1522	0,1522	2,96	0,129
w(MPP), w(MPP)	1	5,6971	5,6971	5,6971	110,93	0,000
Интеракција	1	0,0193	0,0193	0,0193	0,38	0,559
w(ME), w(MPP)	1	0,0193	0,0193	0,0193	0,38	0,559
Резидуална грешка	7	0,3595	0,3595	0,0514		
Неинтерполирано	3	0,3500	0,3500	0,1167	49,22	0,001
Грешка	4	0,0095	0,0095	0,0024		
Укупно	13	16,8120				

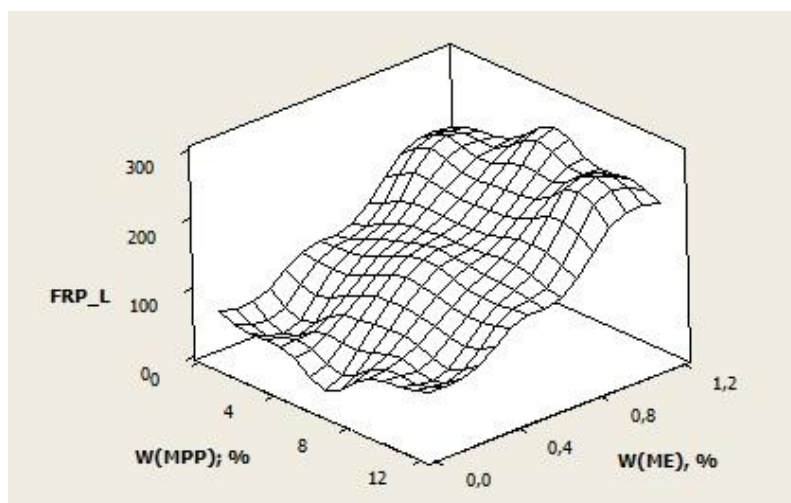
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободе.

4.7.6.3. FRP тест мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Средње вредности резултата мерења способности редукције Fe^{3+} FRP тестом код мешавина са екстрактом *L. sulphureus* су се кретале између 17,95 и 269,01 μg аскорбинске киселине/ mL узорка (прилог 8). За разлику од мешавина са екстрактом *A. blazei*, овде је најбољу редукујућу моћ остварио узорак 11L (1,17% ME; 6% MPP), који је имао за нијансу бољу антиоксидативност од узорка 1L (1% ME; 10% MPP), па се овде још боље види израженији ефекат раста концентрације ME у односу на концентрацију MPP. Као и у FFD, мешавине са *L. sulphureus* имају већу редукујућу моћ у односу на мешавине са *A. blazei*, делом због различитог биохемијског састава ове две гљиве, а делом због мањег степена или изостанка интеракција конституената *L. sulphureus* са протеинима млека, што их чини доступнијим за редукцију Fe^{3+} -ферицијанидног комплекса. FRP вредности мешавина са *L. sulphureus* ниже су у CCD у односу на сличне мешавине из FFD. Ово може бити последица другачијег састава глукана у новом сету екстракта, јер иако су у CCD коришћени екстракти са вишим садржајем укупних и β -глукана, може се приметити пад у концентрацији α -глукана (табела 8), који су у корелацији са добрим редукујућим својствима (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2012). На пример, студија Roncero-Ramos et al. (2017) је испитивала утицај кувања и других кулинарских техника на садржај глукана и антиоксидативна својства гљива. Код *A. bisporus*, кувањем се мења садржај глукана (укупни/ α -/ β -глукани: свежа гљива $\approx 16/3/13$; након кувања $\approx 21/4/17$ g/100g), па већи пораст концентрације укупних и β - у односу на α -глукане резултује падом FRAP вредности са 2,4 код свеже на 1,2 μmol TE/100 mg код гљиве након кувања.

Са дијаграма одговора површина (слика 4.47.) такође се види равномеран раст редукујуће моћи порастом % ME и % MPP, мало блажим трендом у односу на мешавине са *A. blazei*, али и мањи утицај пораста % MPP у односу на утицај пораста % ME. Видљиво је и да је највиша вредност редукујуће моћи код мешавина са максималном концентрацијом екстракта *L. sulphureus* и средишњим нивоом концентрације млека (6%). Анализа варијансе (табела 4.17.) приказала је значајност

концентрације екстракта VL, док концентрација млека не фигурише као значајан фактор када је у питању линеарна варијација. Статистички нису значајни ни квадратни ни интеракцијски члан. Постоји висока корелација између експерименталних услова и антиоксидативности ($R^2 = 97,51\%$).



Слика 4.47. Дијаграм одговора површина; редукујућа моћ (FRP тест) мешавина са *L. sulphureus* у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)); $R^2=97,51\%$

Табела 4.17. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања редукујуће моћи (FRP тест) мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-вредност	p-вредност
Блокови	1	28,6	28,6	28,6	0,11	0,754
Регресија	5	73634,4	73634,4	14726,9	54,74	0,000
Линеарна	2	72252,3	72252,3	36126,2	134,29	0,000
w(ME)	1	70793,0	70793,0	70793,0	263,16	0,000
w(MPP)	1	1459,4	1459,4	1459,4	5,42	0,053
Квадратна	2	1356,7	1356,7	678,4	2,52	0,150
w(ME), w(ME)	1	62,9	113,9	113,9	0,42	0,536
w(MPP), w(MPP)	1	1293,8	1293,8	1293,8	4,81	0,064
Интеракција	1	25,3	25,3	25,3	0,09	0,768
w(ME), w(MPP)	1	25,3	25,3	25,3	0,09	0,768
Резидуална грешка	7	1883,1	1883,1	269,0		
Неинтерполирано	3	731,4	731,4	243,8	0,85	0,536
Грешка	4	1151,6	1151,6	287,9		
Укупно	13	75546,1				

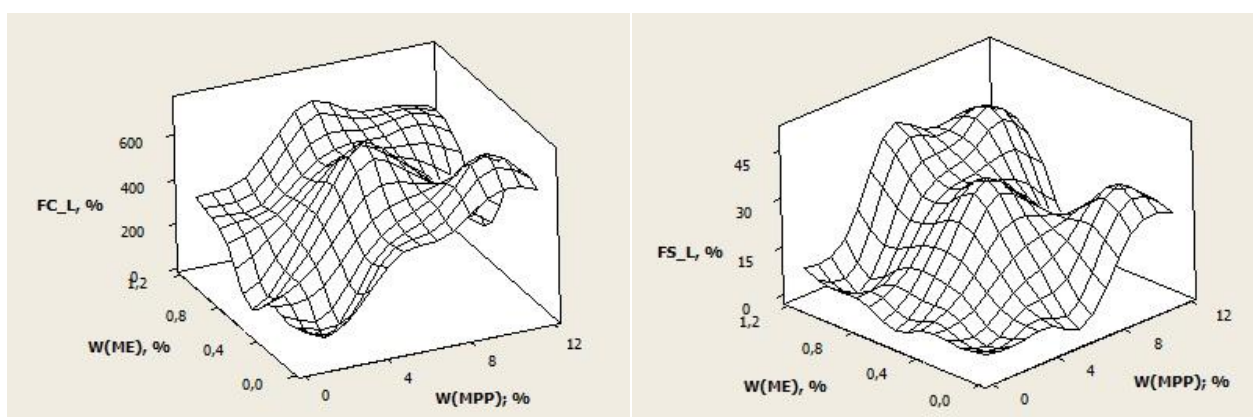
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.6.4. Пенива својства мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

Вредности мерења капацитета пене (FC) и стабилности пене (FS) мешавина са екстрактом *L. sulphureus* налазе се у прилогу 8. Сви узорци су показали капацитет формирања пене; у односу на мешавине са екстрактом *A. blazeyi*, приметне су веће вредности FC. Узорци 3L и 8L су показали најниже вредности капацитета формирања пене. Ради се о мешавинама са $w(MPP) \leq 2\%$, па се и овде може истаћи пресудан утицај

протеина млека. Интересантно, узорак 14L (0,6% МЕ; 11,66% МРР) је поред највише концентрације млека постигао нижу вредност FC, што можда указује на ограничења у виду максималне концентрације млека. Сви остали узорци показали су високе вредности FC. Пенивим својствима мешавина вероватно је допринео мањи степен или изостанак интеракција конституената гљиве са казеинима, тј. формирани WP/CN комплекси су могли без сметње да се повезују хидрофобним везама и/или ковалентним везама, што утиче на формирање протеинских филмова (Pešić, 2011). Што се тиче стабилности пене, овде је већи број узорака показао стабилност након три минута, али са ниским вредностима FS (33,33 – 50,00%). Узорци који нису показали стабилност пене су мешавине са $w(\text{MPP}) \leq 2\%$ (3L, 4L, 8L), као и узорак 12L, који поред 6% МРР има најнижу испитивану концентрацију гљиве (0,03% МЕ).

На слици 4.48. приказани су дијаграми одговора површина. Корелација између експерименталних услова и капацитета формирања пене је висока ($R^2 = 91,13\%$), док је у случају стабилности пене умерена ($R^2 = 74,16\%$). Може се закључити да се при средњим и високим концентрацијама млека постиже добар капацитет пене, уз што већу концентрацију екстракта *L. sulphureus*. И овде је облик одговора површина неправилнији због 4 узорака која не показују стабилност (FS=0), али се могу приметити три пика везана за 6 и 10% МРР. Анализа варијансе код одређивања капацитета пене мешавина са *L. sulphureus* (табела 4.18.) указује на значај концентрације млека, и то и на линеарни и на квадратни члан. Анализа варијансе код одређивања стабилности пене мешавина (табела 4.19.) показала је да је статистички значајан само квадратни члан везан за концентрацију млека, али се ово мора пажљиво тумачити, узимајући у обзир умерену корелацију у овом случају, одређен број резултата који не показују стабилност пене, као и на то да се метода одређивања пенивих својстава може сматрати полуемпиријском. Генерално се може закључити да водени екстракт *L. sulphureus* утиче позитивно на пенива својства млека, па се мешавине могу користити за побољшање пенивости. Аутори наводе добра пенива својства брашна од *Agaricus bisporus* и *Pleurotus ostreatus* и наводе како би могли добро да се искористе у производњи колача или прелива где је битна пенивост (Ishara et al., 2018). Такође се може видети оправданост испитивања техно-функционалних својстава поред антиоксидативних, јер две испитиване гљиве показују различита пенива својства и мешавине на бази њих су прикладне за додатак у различите врсте производа, зависно од потреба (Huppertz, 2010).



Слика 4.48. Дијаграми одговора површина; пенива својства мешавина са *L. sulphureus* (лево – капацитет пене; десно – стабилност пене) у зависности од концентрације екстракта гљиве ($w(\text{ME})$) и термички третираног млека ($w(\text{MPP})$); FC - $R^2=91,13\%$; FS - $R^2=74,16\%$

Табела 4.18. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања капацитета пене мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	13934	13934	13934	1,30	0,292
Регресија	5	758105	758105	151621	14,13	0,002
Линеарна	2	199268	199268	99634	9,28	0,011
w(ME)	1	24553	24553	24553	2,29	0,174
w(MPP)	1	174715	174715	174715	16,28	0,005
Квадратна	2	523681	523681	261840	24,40	0,001
w(ME), w(ME)	1	7404	19899	19899	1,85	0,216
w(MPP), w(MPP)	1	516277	516277	516277	48,10	0,000
Интеракција	1	35156	35156	35156	3,28	0,113
w(ME), w(MPP)	1	35156	35156	35156	3,28	0,113
Резидуална грешка	7	75129	75129	10733		
Неинтерполирано	3	72537	72537	24179	37,30	0,002
Грешка	4	2593	2593	648		
Укупно	13	847168				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

Табела 4.19. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања стабилности пене мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	178,57	178,57	178,57	1,03	0,344
Регресија	5	3308,94	3308,94	661,79	3,81	0,055
Линеарна	2	1268,59	1268,59	634,30	3,65	0,082
w(ME)	1	565,47	565,47	565,47	3,26	0,114
w(MPP)	1	703,13	703,13	703,13	4,05	0,084
Квадратна	2	2022,98	2022,98	1011,49	5,83	0,032
w(ME), w(ME)	1	139,08	227,92	227,92	1,31	0,289
w(MPP), w(MPP)	1	1883,90	1883,90	1883,90	10,85	0,013
Интеракција	1	17,36	17,36	17,36	0,10	0,761
w(ME), w(MPP)	1	17,36	17,36	17,36	0,10	0,761
Резидуална грешка	7	1214,87	1214,87	173,55		
Неинтерполирано	3	1029,69	1029,69	343,23	7,41	0,041
Грешка	4	185,19	185,19	46,30		
Укупно	13	4702,38				

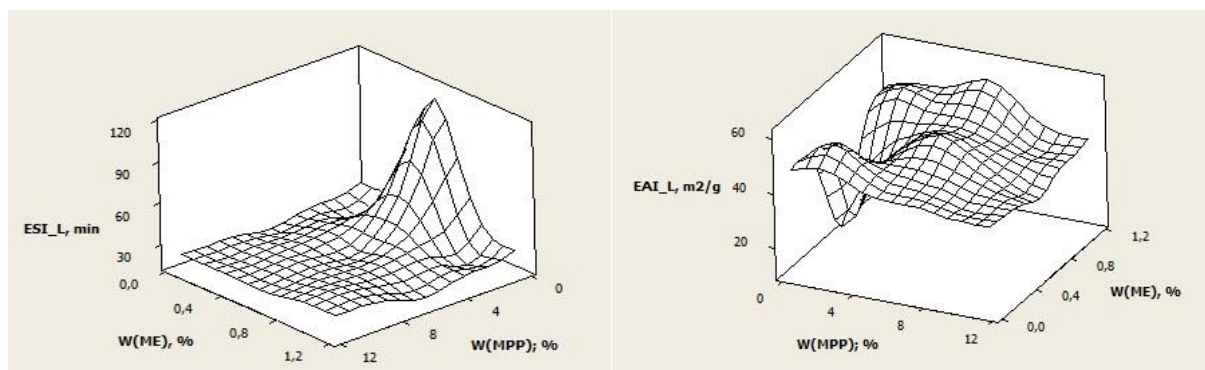
Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.6.5. Емулгујућа својства мешавина са екстрактом *L. sulphureus*

У прилогу 8 приказане су средње вредности ESI и EAI индекса код мешавина са *L. sulphureus*. Код ESI, вредности су се кретале од 17,42 до 29,64 min, осим за узорак 8L који је испољио максимални ESI индекс са вредношћу 114,56 min. Исти узорак имао је најнижу вредност EAI индекса (11,18 m²/g), док су се остали кретали у опсегу 35,37 – 60,75 m²/g. Слично као код мешавина са *A. blazeyi*, највећи ESI индекс и најнижи EAI индекс имала је мешавина са најнижим процентом млека (0,34% MPP) уз 6% екстракта *L. sulphureus*, што доводи до претпоставке да се протеини млека брже адсорбују, али да

су нестабилни и да након 10 минута већу стабилност показују конституенти екстракта *L. sulphureus*. И овде су вредности EAI индекса сличне као код Решић (2011), док су ESI вредности ниже. Иако су вредности оба индекса веће код мешавина са *L. sulphureus* у односу на мешавине са додатком екстракта *A.blazei*, корелација експерименталних услова и емулгујућих својстава је лошија, па се резултати морају разматрати са одређеним опрезом ($R^2(\text{ESI}) = 61,63\%$; $R^2(\text{EAI}) = 56,92\%$). Ово је видљиво и код p -вредности из табела 4.20. и 4.21. Изглед дијаграма површина је специфичан због карактеристичних резултата, тј. максимума код узорка 8L за ESI и минимума код 8L за EAI (слика 4.49.). Мешавине на бази екстракта *L. sulphureus* и термички третираног козјег млека показују одређена емулгујућа својства, али њихова употреба за побољшање емулгујућих својстава прехранбених производа захтева даља истраживања са другачијим нивоима испитиваних параметара. Са оваквом поставком експерименталних услова, тј. у овом односу концентрација млека и екстракта гљиве не могу се користити у ову сврху.

Као и код мешавина на бази екстракта *A.blazei*, показало се да добра пенива својства искључују добра емулгујућа својства, и обрнуто, односно да није могуће добити један адитив који би се користио за побољшање оба техно-функционална својства. **Узимајући у обзир резултате мерења техно-функционалних својстава мешавина на бази оба екстракта, може се закључити да мешавине са екстрактом *A.blazei* имају потенцијал за коришћење у производима где се од адитива захтевају добра емулгујућа својства, док се мешавине са екстрактом *L. sulphureus* могу користити у производима за побољшање пенивости.**



Слика 4.49. Дијаграми одговора површина; емулгујућа својства мешавина са *L. sulphureus* (лево – индекс стабилности емулзије; десно – индекс активности емулзије) у зависности од концентрације екстракта гљиве (w(ME)) и термички третираног млека (w(MPP)); ESI - $R^2=61,63\%$; EAI - $R^2=56,92\%$

Табела 4.20. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса стабилности емулзије мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	504,81	504,81	504,81	1,11	0,327
Регресија	5	4597,93	4597,93	919,59	2,03	0,191
Линеарна	2	1649,61	1649,61	824,81	1,82	0,231
w(МЕ)	1	6,00	6,00	6,00	0,01	0,912
w(MPP)	1	1643,61	1643,61	1643,61	3,62	0,099
Квадратна	2	2933,63	2933,63	1466,81	3,23	0,101
w(МЕ), w(МЕ)	1	521,61	360,74	360,74	0,79	0,402
w(MPP), w(MPP)	1	2412,02	2412,02	2412,02	5,32	0,055
Интеракција	1	14,68	14,68	14,68	0,03	0,862
w(МЕ), w(MPP)	1	14,68	14,68	14,68	0,03	0,862
Резидуална грешка	7	3176,61	3176,61	453,80		
Неинтерполирано	3	3134,54	3134,54	1044,85	99,35	0,000
Грешка	4	42,07	42,07	10,52		
Укупно	13	8279,34				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

Табела 4.21. Анализа варијанси (ANOVA), модел централног композитног дизајна, одговор површине код одређивања индекса активности емулзије мешавина са *L. sulphureus*, кодиране вредности

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F- вредност	p- вредност
Блокови	1	83,21	83,21	83,206	0,67	0,441
Регресија	5	1071,02	1071,02	214,203	1,72	0,249
Линеарна	2	36,72	36,72	18,362	0,15	0,866
w(МЕ)	1	34,40	34,40	34,401	0,28	0,616
w(MPP)	1	2,32	2,32	2,323	0,02	0,895
Квадратна	2	1033,70	1033,70	516,852	4,14	0,065
w(МЕ), w(МЕ)	1	43,63	17,35	17,349	0,14	0,720
w(MPP), w(MPP)	1	990,07	990,07	990,074	7,93	0,026
Интеракција	1	0,59	0,59	0,589	0,00	0,947
w(МЕ), w(MPP)	1	0,59	0,59	0,589	0,00	0,947
Резидуална грешка	7	873,69	873,69	124,813		
Неинтерполирано	3	705,29	705,29	235,096	5,58	0,065
Грешка	4	168,40	168,40	42,101		
Укупно	13	2027,91				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe.

4.7.7. Функција пожељности

Након FFD и CCD, примењена је оптимизација више одговора (*Multi-response Optimization*) коришћењем Деринџерове функције пожељности (*Derringer's Desired Function Methodology*) (Buratti et al., 2018; Derringer & Suich, 1980; Lučić, 2022). 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*; **МЛ** - финална оптимизована мешавина, тј. адитив термички третираног млека и воденог екстракта *L. sulphureus*) на којима су настављена даља испитивања. За оптимизацију мешавина прво су дефинисани жељени одговори приказани у табелама 4.22. и 4.23. Након дефинисања одговора, завршен је експериментални део и анализа добијених резултата помоћу статистичког софтвера *MINITAB*. Због специфичности добијених резултата из претходне две фазе оптимизације, осим одговора везаних за антиоксидативност, код оптимизоване мешавине са *A.blazei* додатни критеријум била су емулгујућа својства, а код оптимизоване мешавине са *L. sulphureus*, уз антиоксидативност додатни критеријум била су пенива својства. Ова два техно-функционална својства (емулгујућа и пенива) показала су се као супротна, тј. захтеви за испуњење оптимална оба својства нису били могући, па су мешавине оптимизоване тако да једна представља добар емулгатор, а да друга има добра пенива својства при додатку у прехранбене производе, уз добру антиоксидативност у оба случаја како би се сачувала функционалност. Оваква примена је честа у формулацији нових прехранбених производа или процеса (Deswal et al., 2014; Mang et al., 2015; Marchetti et al., 2014; Sayuti et al., 2021).

Табела 4.22. Параметри оптимизације одговора мешавина са *A.blazei* према функцији пожељности задати статистичком програму Minitab

Метода	Циљ	Доња гранична вредност	Циљана вредност	Горња гранична вредност	Распоред	Значај
ABTS (mg Trolox / mL)	Максимум	4,00	6,00	6,00	1	1
ESI (min)	Тражена вредност	10,00	40,00	60,00	1	1
FRP (μg AA / mL)	Минимум	100,00	100,00	120,00	1	1
FCC (mg EDTA / mL)	Тражена вредност	2,00	2,50	3,00	1	1

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања $\text{ABTS}^{\bullet+}$; FCC - способност хелирања јона Fe^{2+} ; FRP - способност редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ); ESI - индекс стабилности емулзије; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Табела 4.23. Параметри оптимизације одговора мешавина са *L. sulphureus* према функцији пожељности задати статистичком програму Minitab

Метода	Циљ	Доња гранична вредност	Циљана вредност	Горња гранична вредност	Распоред	Значај
ABTS (mg Trolox / mL)	Максимум	3,50	4,00	4,00	1	1
FRP (μg AA / mL)	Максимум	110,00	180,00	180,00	1	1
FC (%)	Тражена вредност	450,00	600,00	733,00	1	1
FCC (mg EDTA / mL)	Тражена вредност	1,50	3,50	5,00	1	1

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања ABTS^{*+} ; FCC - способност хелирања јона Fe^{2+} ; FRP - способност редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ); FC – капацитет пене; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Деринцерава метода је једна од метода заснованих на функцији пожељности, једноставна је за коришћење и може се лако прилагодити потребама истраживача (Costa et al., 2011). Иако се релативно често користи, највећу употребу је пронашла у хеометрији, док је употреба везана за оптимизацију процеса или производа пореклом из природе, као што је храна, мање заступљена, па је и литература везана за ову тематику оскуднија (Costa et al., 2011). Према функцији пожељности, прво се сваки појединачни одговор преводи у појединачну функцију пожељности (d_i), која има вредности од 0 за непожељан одговор до 1 за пожељан одговор, док се у другој фази израчунава укупна или композитна пожељност која укључује све појединачне функције (Costa et al., 2011; Луčić, 2022). Приказ коришћених метода, предвиђених и добијених одговора, вредности појединачних функција и композитне пожељности, као и финалних састава мешавина приказане су у табелама 4.24. и 4.25. за адитиве МА и МЛ, респективно. Добијене вредности за сваку методу варирају у одређеној мери у односу на предвиђене, што је прихватљиво када се ради о комплексним системима природног порекла.

Табела 4.24. Оптимизација одговора мешавина са *A. blazei* према функцији пожељности

Метода	Предвиђене вредности	Пожељност (<i>Desirability</i>)	Добијене вредности
ABTS (mg Trolox / mL)	5,92	0,96	4,58
ESI (min)	36,68	0,89	67,50
FRP (μg AA / mL)	98,84	1,00	46,83
FCC (mg EDTA / mL)	2,51	0,99	3,83

Састав оптимизоване мешавине **МА**: $w(\text{ME}) = 0,62\%$;
 $w(\text{MPP}) = 6,97\%$; композитна пожељност (*Composite Desirability*): 0,96

Скраћенице: ABTS – укупан антиоксидативни капацитет, ABTS тест; FCC - способност хелирања јона Fe^{2+} , FCC тест; FRP - способност редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ) FRP тест; ESI - индекс стабилности емулзије; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине; МА – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу.

Табела 4.25. Оптимизација одговора мешавина са *L. sulphureus* према функцији пожељности

Метода	Предвиђене вредности	Пожељност (<i>Desirability</i>)	Добијене вредности
ABTS (mg Trolox / mL)	4,00	1,00	4,29
FRP (μg AA / mL)	203,92	1,00	128,40
FC (%)	600,18	1,00	633,33
FCC (mg EDTA / mL)	3,44	0,97	4,20

Састав оптимизоване мешавине **ML**: w(ME) = 0,79%;

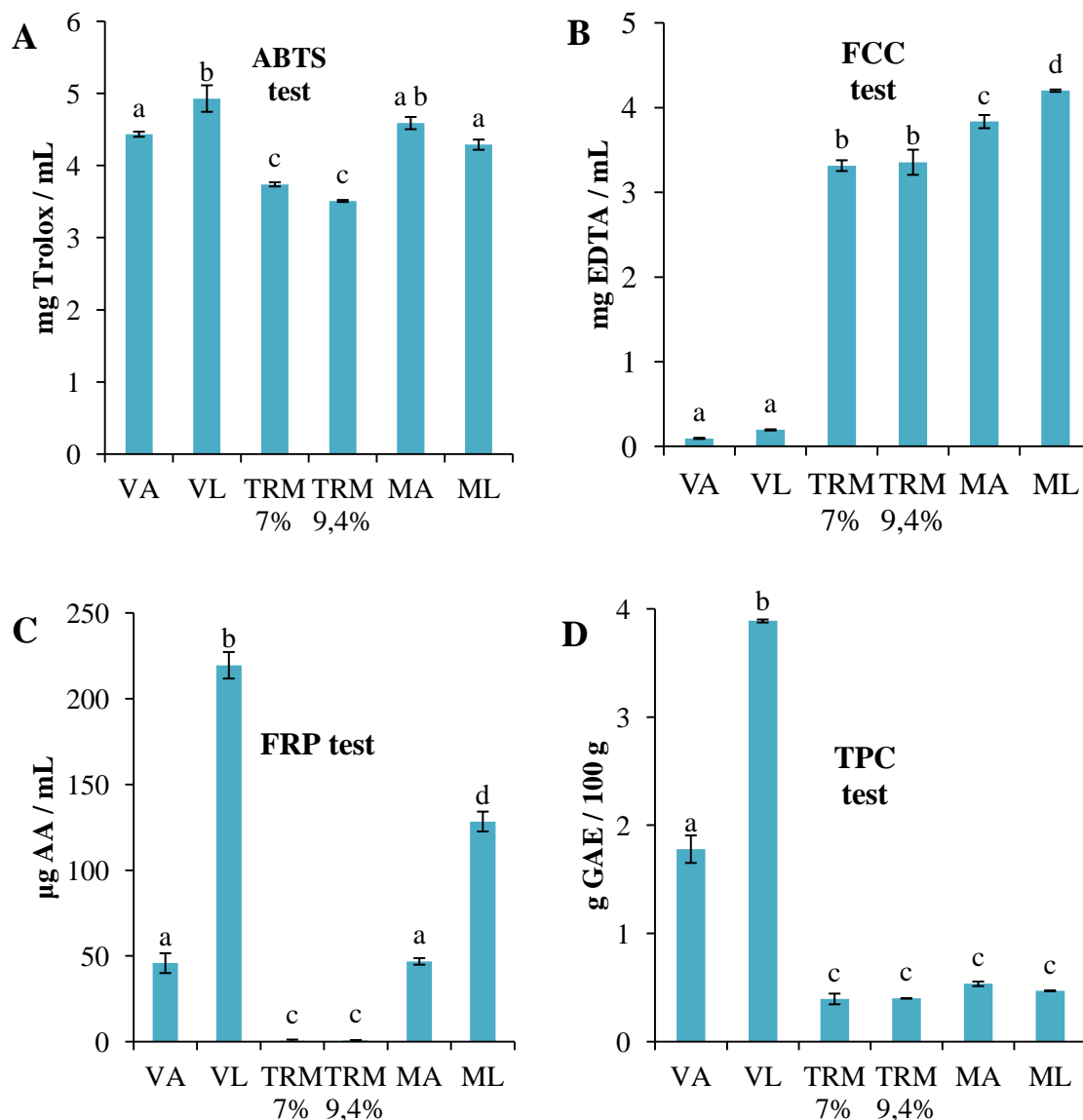
w(MPP) = 9,37%; композитна пожељност (*Composite Desirability*): 0,99

Скраћенице: ABTS - укупан антиоксидативни капацитет, ABTS тест; FCC - способност хелирања јона Fe^{2+} , FCC тест; FRP - способност редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ), FRP тест; FC – капацитет пене; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу;

4.8. Истраживања на оптимизованим адитивима

4.8.1. Антиоксидативна својства оптимизованих адитива

Након експерименталног дизајна, испитана су антиоксидативна својства оптимизованих адитива (MA; ML), као и почетних конституената – водених екстраката *A. blazei* и *L. sulphureus* (VA; VL) и термички третираног млека у обе финалне концентрације (TRM 7%; TRM 9,4%; слика 4.50.). Поред ових резултата додатно је приказан и садржај укупних фенолних једињења који се може посматрати и као метода одређивања укупног антиоксидативног редукујућег капацитета (објашњења у поглављу 3.14.4).



Слика 4.50. Антиоксидативна својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената; A - укупан антиоксидативни капацитет (ABTS тест); B - способност хелирања јона Fe^{2+} (FCC тест); C - способност редуције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ; FRP тест); D – укупни антиоксидативни редукујући капацитет (TPC). У оквиру сваке методе, резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према Tukey тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; TRM 7% - 7% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 9,4% - 9,4% термички третирано

обезмашћено козје млеко; МА – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; EDTA - етилендиаминтетракарбонатна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине; GAE – еквиваленти галне киселине.

Резултати ABTS теста (слика 4.50.A) потврђују закључке из експерименталног дизајна, односно видљиво је да укупни антиоксидативни капацитет показују и екстракти гљива и конституенти млека, захваљујући свом саставу (Carneiro et al., 2013; Çekiç et al., 2015; Chen et al., 2003; Petrović et al., 2014a). Како је раније наведено, укупном антиоксидативном капацитету млека у највећој мери доприносе казеини (Çekiç et al., 2015; Chen et al., 2003). Екстракти гљива и оптимизовани адитиви имају значајно већи капацитет у односу на млеко, што указује на добра потенцијална функционална својства адитива. Млеко је додатком екстракта гљива обogaћено антиоксидантима, пре свега протеинима и полисахаридима, али у мањој мери и фенолним једињењима, који могу сакупити слободне радикале у ћелијама, али и деловати синергистички (Siu et al., 2014). Водени екстракти гљива имају висок укупан антиоксидативни капацитет, али је питање у којој мери се он може искористити у ћелији, ако се зна судбина великог процента антиоксидативних супстанци у организму и ако се узму у обзир велика одступања резултата *in vivo* и *in vitro* експеримената (Yildirim-Elidikoglu, 2019). Обогаћивање млека конституентима гљива могло би обезбедити очување антиоксидативног потенцијала, па се он може испољити у већем обиму.

Капацитет хелирања екстракта гљива је врло низак, иако се наводи да гликозидне везе полисахарида гљива хелирају (Klaus et al., 2013), док се одлична хелирајућа својства млека и овде виде јасно на основу резултата FCC теста (слика 4.50.B) и у складу су са литературом (Elias et al., 2008; Kostić et al., 2021; Stobiecka et al., 2022). Најинтересантнији закључак је да, иако сами водени екстракти слабо хелирају, ипак утичу на хелирајућа својства адитива, који показују статистички значајан скок у односу на полазна млека, поготово у случају адитива ML. Могуће је да су код МА интеракције казеина, односно WP/CN комплекса са конституентима VA, мењајући конформацију протеина млека учиниле доступнијима регионе који имају добра хелирајућа својства, што доводи до повећања капацитета хелирања. Такође не треба ни занемарити висок садржај протеина у екстрактима обе гљиве, што се поготово види код адитива ML, где је мешање са млеком вероватно довело до повећања капацитета хелирања протеина пореклом из *L. sulphureus*.

На слици 4.50.C могу се видети резултати одређивања редукујуће моћи FRP тестом, који првенствено зависе од конституената гљива, а посебно су високи код *L. sulphureus*. Редукујућа моћ термички третираног козјег млека је готово занемарљива, као код Milinčić et al. (2022). Редукујућа моћ обе гљиве потврђена је у разним истраживањима (Carneiro et al., 2013; Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2011; Petrović et al., 2014b; Wei et al., 2020). Између редукујућих својстава воденог екстракта *A. blazei* и адитива МА нема статистичке разлике, тј. редукујућа својства адитива су резултат редукујуће моћи конституената ове гљиве, али су се очувала мешањем са млеком. Kozarski et al. (2011) наводе умерену редукујућу моћ екстракта *A. brasiliensis* која расте са порастом концентрације. Хидроксилне групе полисахарида могу донирати електроне; тип гликозидне везе је у значајној корелацији са редукујућом моћи, а у мањој мери редукујућа моћ зависи и од састава моносахарида (Lo et al., 2011). Ово потенцијално може објаснити разлику у редукујућој моћи VA и VL, јер се полисахариди *L. sulphureus* одликују већом хетерогеношћу састава (Alquini et al., 2004;

Olennikov et al., 2008, 2009a, 2009b, 2010). Редукујућа својства адитива МЛ су нижа у односу на одлична својства полазног воденог екстракта *L. sulphureus*, али и даље висока. Мешање са млеком у овом случају резултовало је смањењем редукујуће моћи. Ипак, треба поново напоменути да се због SET механизма и лоше корелације са другим методама ова метода мора користити заједно са другим антиоксидативним методама (Munteanu & Apetrei, 2021).

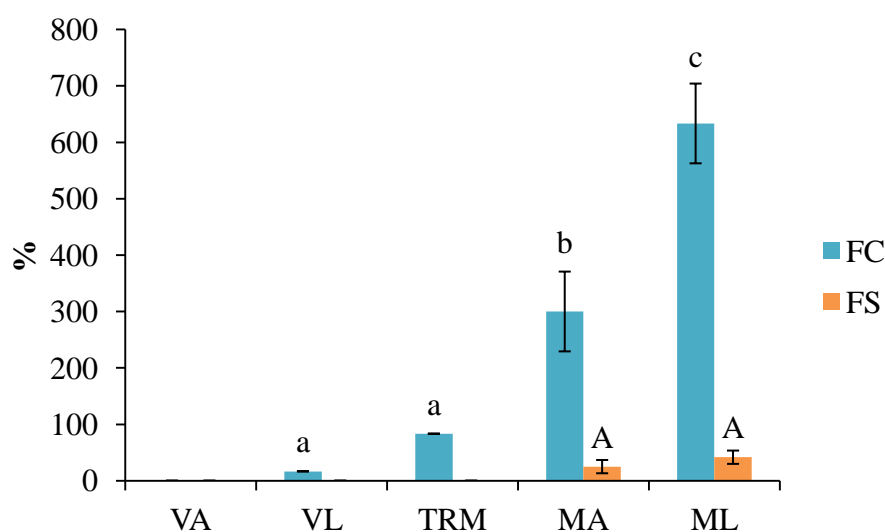
Укупни антиоксидативни редукујући капацитет највећи је код полазних екстраката гљива, и то приближно дупло већи код VL у односу на VA (слика 4.50.D). Укупни антиоксидативни редукујући капацитет млека и адитива приближно је исти и далеко мањи у односу на водене екстракте гљива и може се приписати њиховим протеинима или другим биоактивним супстанцама које су такође реактивне према Фолин-Чиколтеовом реагенсу (Everette et al., 2010). Као код резултата FRP теста, екстракти гљива, посебно VL, показују високу антиоксидативност, далеко већу у односу на млеко или адитиве (осим у случају сличних резултата FRP теста за VA и MA). Иако VA и VL показују висок капацитет редуковања и редукујућу моћ, она брзо опада као последица мешања са млеком, вероватно због мање доступности редукујућих региона њихових биоактивних молекула. Потребне су даље анализе како би се утврдило због чега се ово дешава и како се узорци понашају у дигестивном тракту.

Између резултата четири антиоксидативна теста примењена је Пирсонова корелациона анализа која је указала на значајну негативну корелацију између резултата FCC и TRC теста ($r = -0,852$) на нивоу $p < 0,05$, док између осталих резултата нису пронађене статистички значајне корелације. Ово је видљиво и са слике 4.50, где се може приметити да се мешањем са млеком побољшава капацитет хелирања и снижава редуциона моћ, односно да додаток екстраката утиче на доступност региона са хелирајућим/редукујућим својствима.

Дакле, на основу различитих механизма на којима су засновани, побројани тестови послужили су за преглед антиоксидативних својстава адитива и конституената чијим су мешањем добијени. Једињења пореклом из млека, као и из гљива различитим механизмима делују антиоксидативно, а то је случај и са адитивима, који нпр. код FCC теста значајно премашују антиоксидативност својих полазних компонената. Ово је резултат сложених односа у системима где постоји више различитих антиоксидативних супстанци, па су резултат адитивне, синергистичке или чак антагонистичке интеракције између њих (Cömert & Gökmen, 2017). Добра антиоксидативност адитива приказана на основу *in vitro* испитивања генерално указује на могућу употребу у формулацији функционалне хране, где као додаток може утицати на потенцијално обогаћење одабраног прехранбеног производа.

4.8.2. Техно-функционална својства оптимизованих адитива

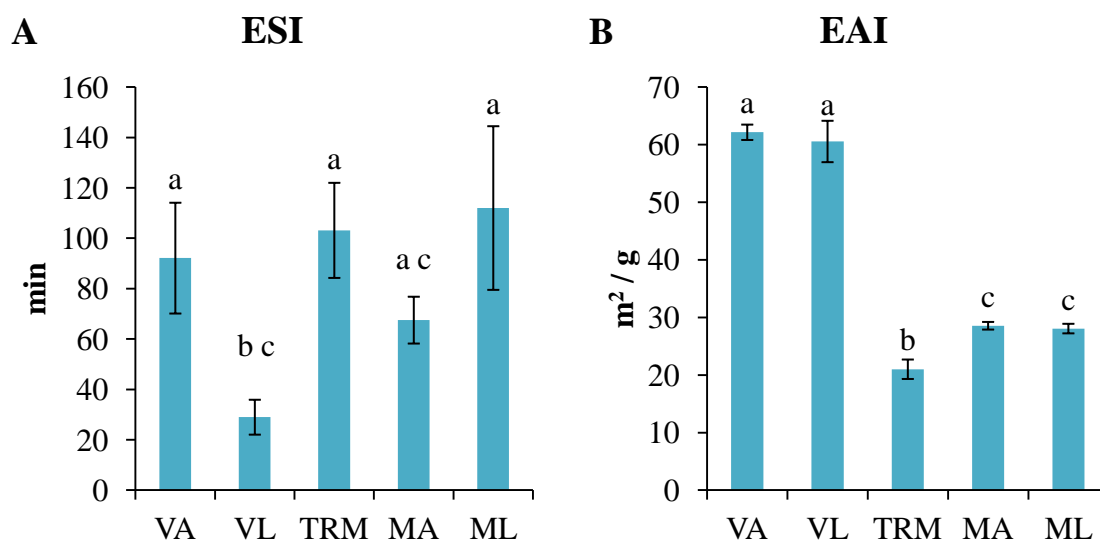
Са слике 4.51. могу се видети пенива својства адитива и њихових конституената. Водени екстракт *L. sulphureus* има низак капацитет формирања пене (FC), док водени екстракт *A. blazei* уопште не формира пену, а оба екстракта не показују стабилност пене (FS=0), можда због ниске концентрације (0,1%). β -гљукани из *Agaricus bisporus* показују лошија пенива својства од гљукана пореклом из других гљива (Ashraf Khan et al., 2017), док за род *Laetiporus* нису пронађени релевантни подаци. Додатак две спрашене гљиве у кукурузно брашно резултовао је повећаним капацитетом формирања и стабилношћу пене (Ishara et al., 2018). Повећање стабилности пене је било израженије код мешавина брашна са *Pleurotus ostreatus* у односу на *Agaricus bisporus*, а разлог овоме може бити већи садржај протеина (око 32% код *Pleurotus ostreatus* у односу на око 25% код брашна од *Agaricus bisporus*) (Ishara et al., 2018).



Слика 4.51. Пенива својства (FC – капацитет пене; FS – стабилност пене) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената. Вредности FC изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Вредности FS изнад којих стоје различита велика латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; TRM - термички третирано обезмашћено козје млеко; MA – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу.

Термички третирано козје млеко показује одређен капацитет формирања пене, али не и стабилност. Као што је раније наведено, серум протеини млека показују боља пенива својства од казеина због флексибилности своје молекуларне структуре, услед чега могу снизити међуфазни напон на међуфазној површини ваздух/вода (Milinčić, 2023). Казеинске мицеле козјег млека, које се могу упоредити са глобуларним протеинима, круте су и нефлексибилне и термичким третманом, тј. термички индукованим WP/CN комплексима им се донекле побољшавају пенива својства тако што се серум протеинима „обогаћује“ површина мицеле (Milinčić, 2023; Pešić, 2011). Pešić (2011) наводи највећу стабилност пене козјег млека на рН вредностима 6,5 -7,1, што није у складу са овде изнетим резултатима, делимично и због концентрације, јер наведена студија испитује 2% млека, док се овде ради о 0,1% растворима.

Интересантно је да, иако ни водени екстракти гљива ни млеко немају добра пенива својства, адитиви на бази ова два конституента имају далеко већи капацитет формирања пене и показују стабилност пене након три минута коју немају почетни конституенти, чак и при ниским концентрацијама. Ово делимично оправдава формулацију оваквих мешавина и могућу примену код производа који захтевају оваква својства – кремове, павлаке, колачи и други, уз модификацију концентрације (Ishara et al., 2018). Могуће је да је разлог већег капацитета формирања пене код ML у односу на MA већи садржај протеина. Ипак, ове пене су растресите због великих мехурова ваздуха, па је стабилност ниска. Могуће је и да интеракције конституената екстракта *A. blazei* и термички третираних казеинских мицела утичу на капацитет, тј. отежавање стварања компактних филмова око мехурића, што је олакшано код адитива са екстрактом *L. sulphureus*, где интеракције нису заступљене, па би се предност дала адитиву ML за побољшање пенивих својстава прехранбених производа. Потребна су даља истраживања како би се ова својства адитива ML искористила у већем обиму, као што је нпр. испитивање оптималне концентрације додатог адитива, интеракције са одређеним производом у који би се додавао или чак истовремено додавање адитива са другим хидроколоидима (нпр. гумама) који могу утицати на вискозитет водене фазе, који спречава да честице ваздуха наруше стабилност система током процеса као што је мућење (Pasban et al., 2014).



Слика 4.52. Емулгујућа својства оптимизованих адитива и њихових почетних конституената; А – ESI (индекс стабилности емулзије), В – EAI (индекс активности емулзије). У оквиру сваке методе, резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; TRM - термички третирано обезмашћено козје млеко; MA – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу.

Емулгујућа својства адитива и њихових почетних конституената упоређена су помоћу ESI и EAI индекса (слика 4.52.). Термички третирано млеко има добру вредност EAI индекса и одличну вредност ESI индекса, што би указивало на његову способност формирања емулзије и могућност да утиче на стабилност емулзија, али се мора узети са опрезом због великих варијација и испитати у другим концентрацијама. Истраживања Рејић (2011) истичу повећану стабилност емулзија козјег млека након

термичког третмана. Као што је већ наведено, протеини млека се могу адсорбовати на међуфазну површину, смањити површински напон, спречити поновно удруживање мањих уљаних капљица у веће и тиме обезбедити стабилност емулзија типа уље/вода. Супротно од пенивих својстава, овде су бољи казеини од серум протеина, а још једном треба нагласити да, поред других фактора, ефикасност емулгатора зависи и од присуства других супстанци (Dalglish, 2006; Pešić, 2011). За разлику од млека, екстракти гљива имају високе EAI вредности, али је приметан пад након 10 минута. Екстракт VL има мању стабилност у поређењу са VA, који има сличан ESI индекс са млеком. Иако је вредност ESI индекса VA значајно већа од VL, ова поређења треба узети са резервом због великих варијација током мерења стабилности VA која могу указивати на његову нехомогеност. Оба адитива показују добре EAI вредности, веће у односу на почетно млеко. Стабилност емулзија са MA је добро очувана након 10 минута, што указује на могућу употребу овог адитива као емулгатора. ESI вредности адитива ML доста варирају. Иако је средња вредност мерења ESI индекса већа од MA, статистички не постоји разлика због великих варијација резултата. Ова варирања указују на нестабилност емулзија са додатим ML, тј. њихов нехомоген састав, па се овај адитив не може користити као емулгатор у прехранбеним производима.

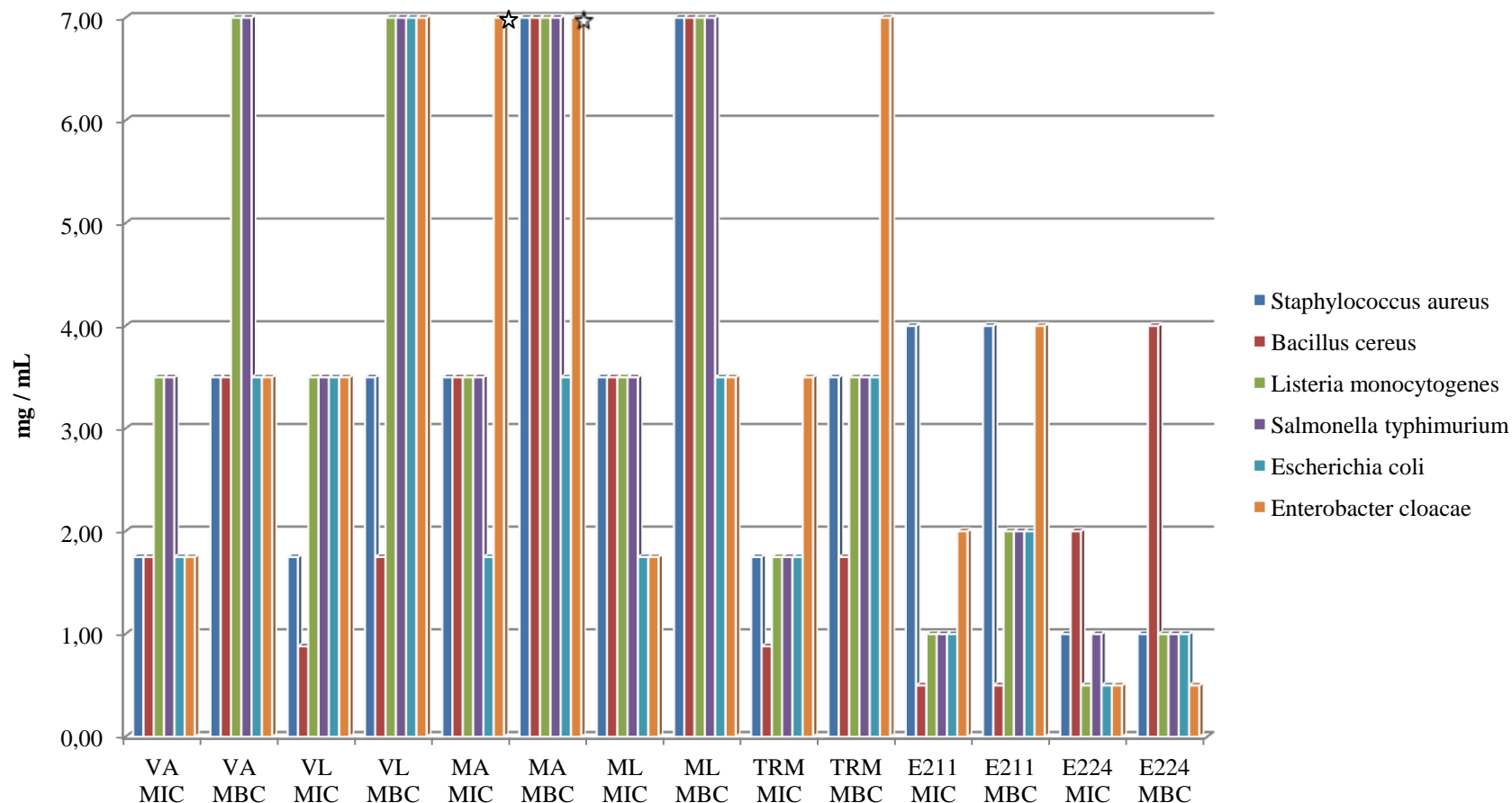
Дакле, од свих испитиваних узорака, за адитив MA се може тврдити да поседује најбоља емулгујућа својства. Интересантно је да, иако додатек екстракта VA повећава средњи дијаметар казеинске мицеле термички третираног млека, овај додатек утиче на бољу адсорпцију на међуфазну површину, можда због промене конформације протеина млека услед додатка VA, на шта указују резултати FTIR анализа. Ситуација је супротна када се ради о ML и VL; могуће је да хетерогеност екстракта *L. sulphureus* утиче на нестабилност конформације под међуфазним притиском. Umaña et al. (2021) су испитивали емулгујућа својства нуспроизвода гљиве *Agaricus bisporus* који су се састојали већински од полисахарида и протеина и закључили да њихов додатек у већем проценту (5% и 7,5%) побољшава стабилност емулзија смањивањем дијаметра капљица уља, док нижи проценти (1,5% и 3%) резултују флокулацијом услед великих честица уља. Ови аутори, као и Santipanichwong & Suphantharika (2009) наводе да ово може бити услед присуства β -глюкана који утиче на стабилност емулзија повећањем вискозитета. Према литератури, за побољшање емулгујућих својстава битно је присуство полисахарида, који формирају мрежасту структуру унутар које се заробљавају честице уља (Umaña et al., 2021). Могуће је да услед присуства β -глюкана у екстрактима гљива они показују висок EAI индекс, али услед ниског испитиваног процента (0,1%) стабилност опада са временом услед флокулације. У складу са овим, могуће је да интеракције у MA утичу на очување стабилности емулзија, док их њихов изостанак или мањи обим код ML не чини погодним емулгаторима. Pérez-Bassart et al. (2024) су испитивали емулгујућа својства екстракта *Pleurotus ostreatus* и пронашли да је осим садржаја β -глюкана, који је кључан за повећање вискозитета, чиме се успорава кретање и повезивање капљица уља, пресудан и удео протеина у екстрактима, као и њихова доступност. И Jung et al. (2022) су дошли до сличног закључка. Повећање стабилности емулзија у кобасицама додатком праха *Pleurotus ostreatus* остварује се двојачко – вискозитет се повећава услед мрежасте структуре коју формирају полисахариди, а протеини формирају слојеве око глобула масти. Могуће је да протеини *A. blazei* формирају слој око капљица уља, услед тога што гљукани интерагују са казеинском мицелом, па су протеини гљиве слободни и доступни за овакву стабилизацију. Насупрот томе, иако *L. sulphureus* има већи садржај протеина од *A. blazei*, ови протеини се вероватно делимично налазе у комплексима са полисахаридима

L. sulphureus, који их фаворизују у односу на протеине млека, па нису доступни за стабилизацију капљица уља.

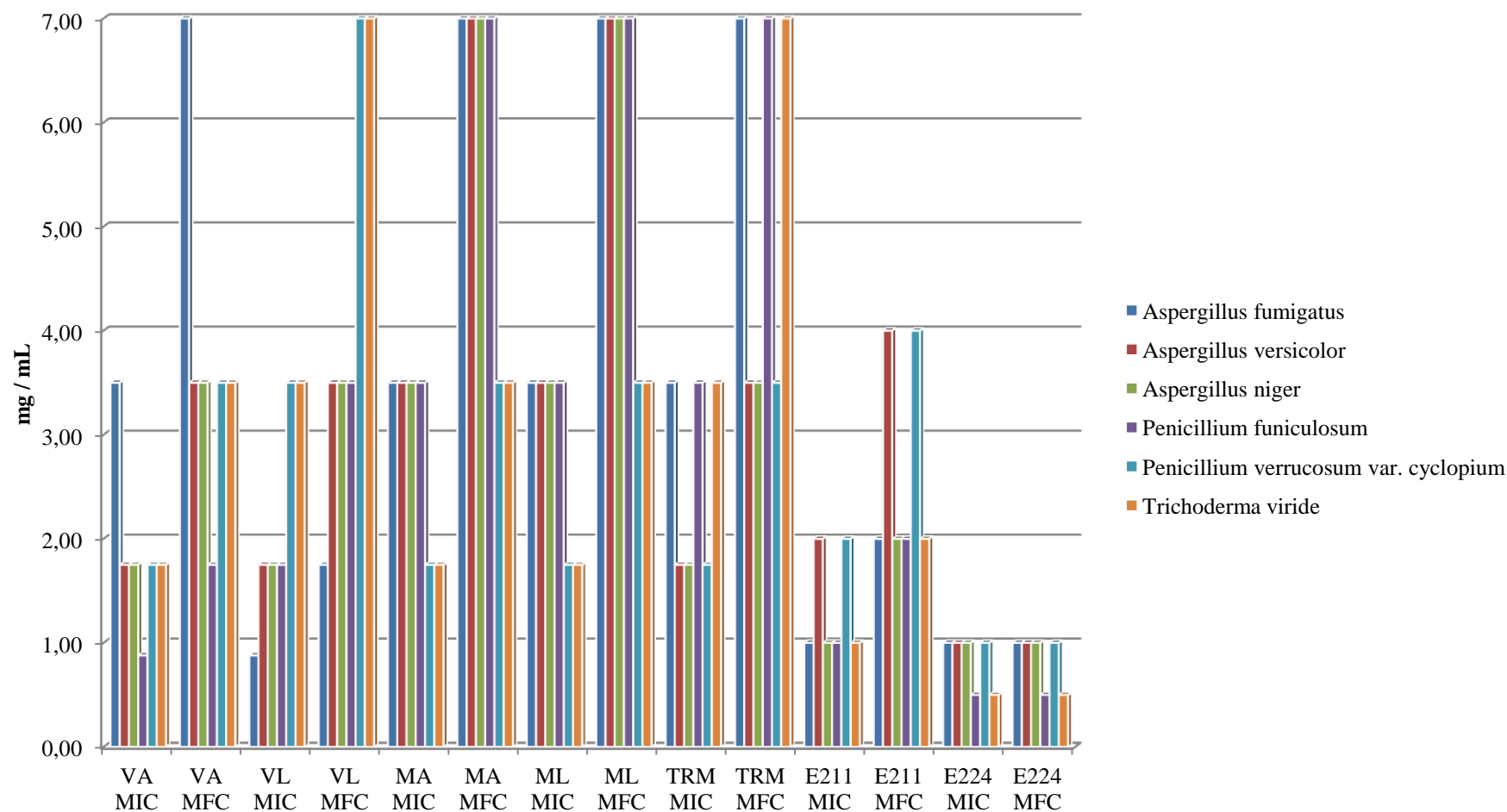
4.8.3. Антимикробна својства оптимизованих адитива

Резултати антибактеријске и антифунгалне активности оптимизованих адитива и почетних конституената, МИС и МВС/МФС вредности, приказане су на сликама 4.53. и 4.54, респективно, као и антимикробна својства два комерцијална адитива (конзерванса) – Е211 (натријум бензоат) и Е224 (калијум метаби сулфит).

На слици 4.53. може се видети антибактеријско дејство адитива и конституената адитива према три Грам позитивне и три грам негативне бактерије. Генерално посматрано, антибактеријско дејство узорака је слабо до умерено. Водени екстракти гљива су имали већину МИС вредности од 3,5 mg/mL или 1,75 mg/mL. Најнижа МИС вредност опажа се код екстракта VL, који се показао изразито бактериостатски са МИС вредношћу од само 0,88 mg/mL, и то према култури *Bacillus cereus*, која је изолат из хране, што представља одличну вредност, нижу од конзерванса Е224 и сличну као Е211. Иако не постоји званична класификација природних антимикробних агенаса, у литератури се може наћи да се јаким инхибиторима сматрају екстракти који имају МИС вредности мање од 500 µg/mL, умеренима они где су МИС вредности у рангу 600 – 1500 µg/mL и слабима они са МИС вредностима већим од 1600 µg/mL (Mazzutti et al., 2012). Исти аутори наводе јаку инхибицију екстраката *A. brasiliensis* ка Грам позитивним бактеријама и слабу инхибицију ка Грам негативним бактеријама, можда због комплекснијег ћелијског зида, што овде није случај када је VA у питању (Mazzutti et al., 2012). Petrovic et al. (2011) наводе да је *L. sulphureus* извор антимикробних једињења као што су полисахариди, лектини, терпени, који ослабљују бактеријску цитоплазматичну мембрану. Поред антибактеријског ефекта, у *in vivo* експериментима је потврђено да етанолни и лектински екстракти *L. sulphureus* нису токсични (Petrović et al., 2020). Када је у питању бактерицидни ефекат екстраката гљива, VA је показао за нијансу боља антимикробна својства од VL. Генерално се може приметити нешто виши антимикробни ефекат VL према Грам позитивним у односу на Грам негативне бактерије, што је већ примећено за *L. sulphureus* у литератури (Turkoglu et al., 2007). Приметно је бактерицидно дејство VL према изолату из хране *B. cereus*, (1,75 mg/mL), више него два пута ниже од комерцијално доступног Е224 (4,00 mg/mL), што може бити искоришћено у практичне сврхе. Антимикробно дејство супстанци из природних извора према изолатима из хране представља битан податак и повећава функционалност оваквих супстанци, пошто се у литератури наводи доста изолата патогених микроорганизама пореклом из хране који су резистентни на доступна антимикробна једињења. Такав случај је нпр. са *Salmonella spp*, *Escherichia coli* и *Enterococcus spp*. изолованим из хране, као и многим другима, што представља велики проблем за безбедност хране и јавно здравље (Friedman, 2015; Маџа & Popowska, 2016; Pormohammad et al., 2019; Semedo et al., 2003).



Слика 4.53. Антибактеријска својства оптимизованих адитива и њихових почетних конститутената; звездицама су означена два резултата где су вредности >7 mL. Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; TRM - термички третирано обезмашћено козје млеко; MA – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; MIC – минимална инхибиторна концентрација; MBC – минимална бактерицидна концентрација; E211 – адитив E211 (натријум бензоат); E224 – адитив E224 (калијум метабисулфит).



Слика 4.54. Антифунгална својства оптимизованих адитива и њихових почетних конститuenta. Скраћенице: VA – водени екстракт *A. blazei*; VL – водени екстракт *L. sulphureus*; TRM - термички третирано обезмашћено козје млеко; MA – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; ML – оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; MIC – минимална инхибиторна концентрација; MFC – минимална фунгицидна концентрација; E211 – адитив E211 (натријум бензоат); E224 – адитив E224 (калијум метабисулфит).

Интересантно је и да козје млеко има антибактеријско дејство, вероватно због присуства биоактивних пептида за које се тврди да имају антибактеријску улогу зависно од молекулске масе, аминокиселинског састава и наелектрисања (Atanasova & Ivanova, 2010; Sansi et al., 2022). Антибактеријско дејство се приписује и лактоферину, иако није заступљен у млеку у великом проценту (Conesa et al., 2008). Већина МИС вредности је била 1,75 mg/mL, а МВС 3,50 mg/mL, уз лошије дејство ка *Enterobacter cloacae* и боље дејство ка *B. cereus*. Оба адитива су имала инхибиторно дејство ка већини бактерија (3,50 mg/mL), уз боље резултате према *E. coli* (1,75 mg/mL; МА и ML) и *E. cloacae* (1,75 mg/mL; само ML). Адитив МА имао је слабо инхибиторно дејство ка *E. cloacae* (>7 mg/mL); ово се види и код бактерицидног дејства МА према *E. cloacae* (>7 mg/mL). Бактерицидно дејство МА и ML је исто према скоро свим бактеријама (7,00 mg/mL) и мало боље у три случаја – МА према *E. coli* 3,50 mg/mL; ML према *E. coli* и *E. cloacae* 3,50 mg/mL).

На слици 4.54. приказано је антифунгално дејство узорака. И овде је већина МИС вредности водених екстраката гљива била 3,50 mg/mL или 1,75 mg/mL, уз ниску вредност VA ка *Penicillium funiculosum* (0,88 mg/mL) и VL према *Aspergillus fumigatus* (0,88 mg/mL), што је ниже од МИС вредности E211 и E224 за *A. fumigatus*. Већина MFC вредности екстраката гљива је била 3,50 mg/mL или 7,00 mg/mL, осим за *A. fumigatus* (VL) и *P. funiculosum* (VA). Козје млеко имало је МИС и MFC вредности у рангу 1,75 – 7,00 mg/mL. Генерално посматрано, антифунгална активност VL била је боља у односу на екстракте *L. sulphureus* у метанолу, ацетону и дихлорметану (Petrović et al., 2013). Younis et al. (2019) наводи добра антифунгална својства воденог екстракта *L. sulphureus* ка различитим гљивама, док Turkoglu et al. (2007) наводи одличну антифунгалну активност етанолног екстракта *L. sulphureus* ка *Candida albicans*. Метанолни екстракт *L. sulphureus* може да инхибира раст *Aspergillus flavus* у прехранбеним производима као што су пилећа паштета и парадајз сос, зависно од дозе (Petrović et al., 2013; 2014b). Mazzutti et al. (2012) наводе антифунгално дејство екстраката *A. brasiliensis* према *Candida sp.* само ако су добијени суперкритичном екстракцијом. Такође, ревијални рад Lima et al. (2016) наводи мањак литературе везан за антимикуробна својства *A. blazei*, вероватно због тога што су аутори више окренути проучавању других биолошких својстава ове гљиве, као што су антитуморна и имуномодулаторна својства. Оба адитива имају МИС вредности од 3,50 mg/mL ка већини микромицета, осим ка *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* и *Trichoderma viride*, према којима делују и у нижим концентрацијама (1,75 mg/mL). Фунгистатичко дејство адитива ка *P. verrucosum* var. *cyclopium*, који је изолат из хране, је боље у односу на E211 (2,00 mg/mL), што је један од најбољих података. Фунгицидно дејство оба адитива се кретало од 3,50 до 7,00 mg/mL.

Сви узорци су испољили сличну антибактеријску и антифунгалну активност. Када се упореди антимикуробна активност адитива у односу на полазне компоненте, могу се приметити нешто више МИС/МВС/МФС вредности адитива, можда због поменутих интеракција или хетерогености састава, што донекле умањује доступност антимикуробних региона. Већина наведених узорака није успела да достигне антифунгални ниво конзерванса E224, али треба узети у обзир да постоји више фактора који утичу на антимикуробна својства, па да умерено антимикуробно дејство може бити задовољавајуће ако се адитив нпр. убацује у прехранбени производ са нижом рН вредношћу или ако омогућава пастеризацију уместо стерилизације производа. Натријум-бензоат (E211) делује против гљива и бактерија, иако се антимикуробно дејство бензоеве киселине најчешће односи на квасце и гљиве, а у мањој мери на бактерије, док се E224 (калијум-метабисулфит) и слични конзерванси који ослобађају

SO₂ током дејства користе као конзерванси који инхибирају раст квасаца, гљива и бактерија (Silva & Lidon, 2016). У литератури се могу наћи тврдње о нежељеним ефектима ова два адитива, иако се не наводе студије у којима су потврђени, или се наводе студије које доводе до непоузданих извора (Pisoschi et al., 2018; Silva & Lidon, 2016). Без обзира на непровереност оваквих тврдњи, сумња и одбојност потрошача ка комерцијалним адитивима постоје, па формулација адитива на бази природних екстраката и млека који поред осталих бенефита нуди и умерено антимикуробно дејство може бити вишеструко корисно и са аспекта прехранбене индустрије и са аспекта потрошача (Jansen et al., 2020).

Такође, у светлу све чешће разистентности микроорганизама ка антибактеријским и антифунгалним агенсима и појаве мултирезистентних сојева (Alves et al., 2014a; 2014b; Pisoschi et al., 2018), мора се обратити пажња на природне изворе антимикуробних супстанци, посебно ако су на бази безбедних супстанци, што је овде испуњено – протеини млека који имају GRAS статус и вода као медијум за екстракцију биоактивних једињења гљива (Petrovic et al., 2011).

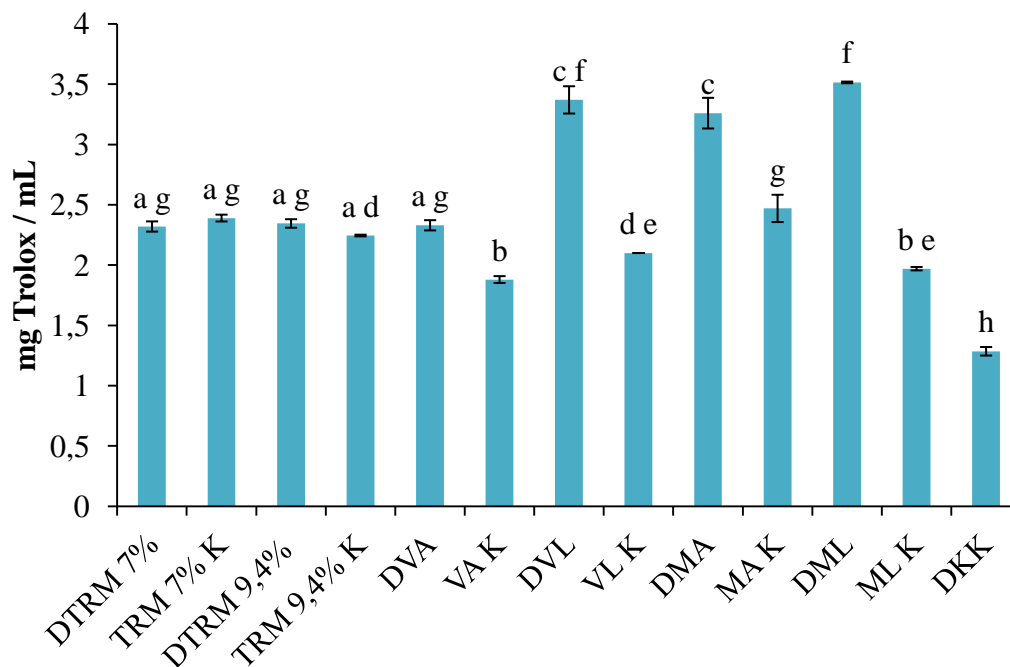
4.8.4. *In vitro* гастроинтестиналне дигестије оптимизованих адитива

Не може се тврдити да ће се добри резултати антиоксидативног потенцијала испитани *in vitro* методама потврдити у *in vivo* условима; многи антиоксиданти се врло слабо апсорбују или се брзо елиминису путем урина; такође, антиоксидативна улога прехранбених биомолекула се не може поистоветити само са елиминисањем слободних радикала (Schaich et al., 2015). Такође, када у испитиваном узорку постоји више различитих типова антиоксиданаса, интеракције између њих могу бити адитивне, синергистичке или антагонистичке, што додатно отежава процену (Cömert & Gökmen, 2017). Имајући у виду оваква ограничења најчешће коришћених антиоксидативних метода, симулација *in vitro* ГИД адитива је покушај да се резултати ове дисертације приближе реалним условима, уз сва ограничења која носе *in vitro* методе, тако што се омогућава поређење антиоксидативних својстава пре и после симулираног варења у гастроинтестиналном тракту, па се може пратити промена у односу на апсолутне вредности антиоксидативног капацитета. Симулација дигестија извршена је на узорцима термички третираног обезмашћеног козјег млека у обе финалне концентрације (7% и 9,4%), на воденим екстрактима гљива и на обе оптимизоване мешавине. Припремљене су и контроле дигестија узорака, тј. недигестовани узорци, како би се утврдио утицај дигестије на мерене параметре, као и контрола дигестивног коктела како би се елиминисао утицај његових једињења.

На слици 4.55. приказане су средње вредности мерења укупног антиоксидативног капацитета ABTS тестом пре и после симулације ГИД, као и контролни узорак (DKK) који је садржао дигестивни коктел. Може се уочити добра способност млека ка неутралисању ABTS^{•+} пре (узорци TRM 7% К и TRM 9,4% К) и након ГИД (узорци DTRM 7% и DTRM 9,4%).

Очекивано, након дигестија антиоксидативни капацитет је висок због присуства продуката ензимске хидролизе млека, тј. слободних аминокиселина и пептида мале молекулске масе, који због свог састава (хистидин, триптофан, метионин, цистин) показују добре антиоксидативне резултате (Kostić et al., 2021; Lamothe et al., 2019; Power et al., 2013). Занимљиво је да и пре дигестија козје млеко има висок антиоксидативни капацитет. У литератури се може наћи да казеинска фракција највише доприноси антиоксидативном капацитету млека због највеће улоге у неутралисању ABTS^{•+} (Çekiç et al., 2015; Chen et al., 2003). Највећи антиоксидативни

капацитет се приписује α -CN, затим β -CN и β -LG (Kim et al., 2019). Такође, поред овога, антиоксидативним својствима млека пре и после дигестија вероватно доприносе и недигестибилне материје, као што су олигосахариди (van Leeuwen et al., 2020).



Слика 4.55. Укупан антиоксидативни капацитет (ABTS тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената. Резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: DTRM 7% - дигестовано 7% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 7% K – разблажено 7% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DTRM 9,4% - дигестовано 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 9,4% K – разблажено 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DVA – дигестовани водени екстракт *A. blazei*; VA K – разблажени водени екстракт *A. blazei* (контрола); DVL – дигестовани водени екстракт *L. sulphureus*; VL K – разблажени водени екстракт *L. sulphureus* (контрола); DMA – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; MA K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу (контрола); DML – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; ML K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу (контрола); DKK – контрола дигестивног коктела.

Екстракти гљива показују добру антиоксидативност пре ГИД (узорци VA K и VL K), већу код VL у односу на VA. Након дигестија, екстракти гљива показују одличан антиоксидативни капацитет (узорци DVA и DVL), значајно већи од полазног, вероватно због продуката ензимске хидролизе. Екстракти гљива садрже висок проценат протеина, па је претпоставка да и овде пептиди фигурирају у повећању ABTS вредности, а познато је и да се дигестијом повећава укупна антиоксидативна активност екстракта гљива због наставка разлагања компонената са активношћу против слободних радикала, као што су полисахариди (Ng & Rosman, 2019). Пошто

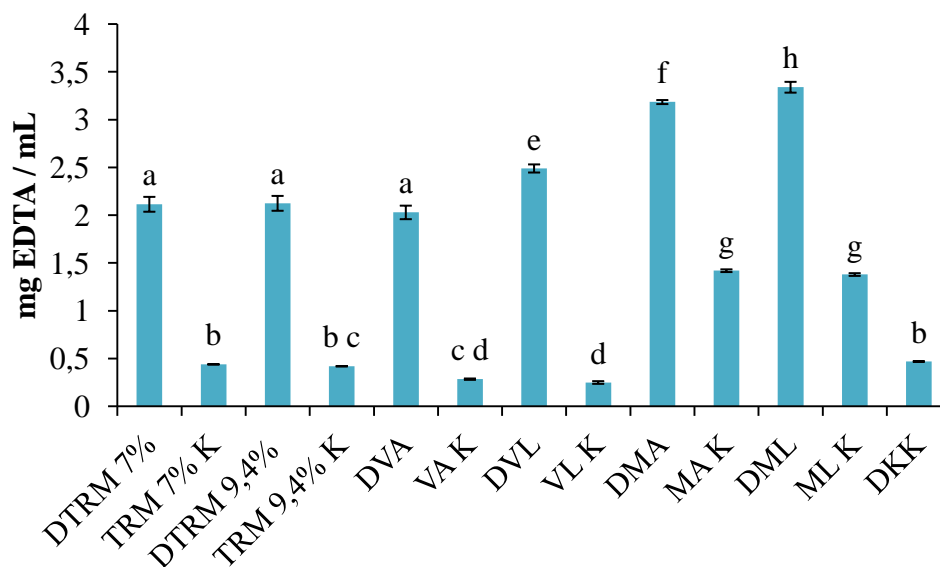
екстракт VL садржи више укупних протеина у односу на VA (≈ 34 g/100g у односу на ≈ 56 g/100g, респективно), јасно је да узорак DVL испољава већи укупан антиоксидативни капацитет на рачун пептида. Могуће је и да се дигестијом ослобађа део компонената гљива које су везане за протеине (Tu et al., 2021).

Након ГИД, адитиви показују веома висок укупан антиоксидативни капацитет. Код DMA у односу на DVA види се статистички значајно повећање (за $\approx 40\%$), док између DML и DVL нема статистички значајног повећања. Интересантно је да је раст укупног антиоксидативног капацитета адитива након ГИД био мањи код МА (МАК \rightarrow DMA; $\approx 32\%$), у односу на ML (MLK \rightarrow DML; $\approx 78\%$). Ово је вероватно последица описаних интеракција код МА, тј. доступнијих антиоксидативних супстанци код ML. Антиоксидативност адитива МА пре дигестија (узорак МАК) је висока, значајно виша у односу на узорак MLK, вероватно због производа ензимског разлагања пореклом од ензима *A.blazei*. Wang et al. (2020) наводе три пута већи укупни антиоксидативни капацитет нудла са додатком *Lentinus edodes* након дигестија, уз закључак да се дигестијом ослобађају многи везани или конјуговани антиоксиданти пореклом из гљива. Генерално посматрано, на основу оваквих резултата може се претпоставити функционална улога адитива у људском организму након варења. Формулација оваквих адитива је оправдана имајући у виду одличан антиоксидативни капацитет адитива након дигестија. Такође, када се анализирају сви дигестовани узорци, мора се узети у обзир и допринос дигестивног коктела (узорак K), чији ензими и слободни јони доприносе неутралисању ABTS^{•+} и утичу на повећање антиоксидативних вредности (Kostić et al., 2021).

На слици 4.56. приказане су средње вредности мерења капацитета хелирања FCC тестом пре и после симулације ГИД, као и капацитет хелирања дигестивног коктела. Узорци млека пре дигестија имају веома низак капацитет хелирања у односу на узорке након дигестија, а ови резултати потичу од дигестивног коктела. Слични резултати FCC теста могу се видети и код Milinčić (2023), где је дигестивни коктел показао већи капацитет хелирања од недигестованог термички третираног козјег млека, док код дигестованог млека постоји велики скок у капацитету хелирања. Ово указује на то да су се током дигестија млека ослободили пептиди са одличним капацитетом хелирања, што је у складу са литературним подацима (Milinčić et al., 2022; Power et al., 2013). Млеко са различитим антиоксидативним механизмима, посебно козје због биоактивности својих пептида представља добру базу за формулацију вишеструко функционалних адитива (Elias et al., 2008; Stobiecka et al., 2022).

Интересантно је да су водени екстракти гљива показали лош капацитет хелирања, што је у складу са резултатима из експерименталног дизајна, али не и у складу са литературом везаном за ове две гљиве (Gonzaga et al., 2020; Klaus et al., 2013; Wu et al., 2014), која указује на добре резултате другачијих типова екстраката, углавном високо пречишћених полисахарида или полисахарида добијених екстракцијом у алкалним условима. Зависно од типа гликозидних веза у полисахаридима, конфигурације, углава, типа, степена гранања итд. зависи и антиоксидативност (Klaus et al., 2013). Са графика се може видети драстичан скок у капацитету хелирања водених екстраката гљива након ГИД. Liu et al. (2020) наводе умерена хелирајућа својства након дигестија *Craterellus cornucopioides* подвргнуте различитим кулинарским третманима. Претпоставка је да у њиховом случају због дигестије полисахарида долази до добрих антиоксидативних резултата (Liu et al., 2020). Иако недигестовани екстракти гљива имају сличан капацитет хелирања (низак), на графику се може приметити да је капацитет хелирања након ГИД значајно већи код DVL у односу на DVA. Осим

литературних објашњења која се углавном могу приписати полисахаридној фракцији екстракта гљива, овде се мора узети у обзир и велики удео протеина у екстрактима гљива. Хетерогеност полисахаридне фракције екстракта VL сигурно доприноси порасту капацитета хелирања, али одлични резултати FCC теста, као и код млека након дигестија, потичу од продуката разлагања протеина гљива, на првом месту од пептида. Већи удео протеина код *L. sulphureus* је главни узрок већих вредности FCC теста за DVL у поређењу са DVA.



Слика 4.56. Способност хелирања јона Fe^{2+} (FCC тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената. Резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: DTRM 7% - дигестовано 7% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 7% K – разблажено 7% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DTRM 9,4% - дигестовано 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 9,4% K – разблажено 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DVA – дигестовани водени екстракт *A. blazei*; VA K – разблажени водени екстракт *A. blazei* (контрола); DVL – дигестовани водени екстракт *L. sulphureus*; VL K – разблажени водени екстракт *L. sulphureus* (контрола); DMA – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; MA K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу (контрола); DML – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; ML K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу (контрола); DKK – контрола дигестивног коктела; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина.

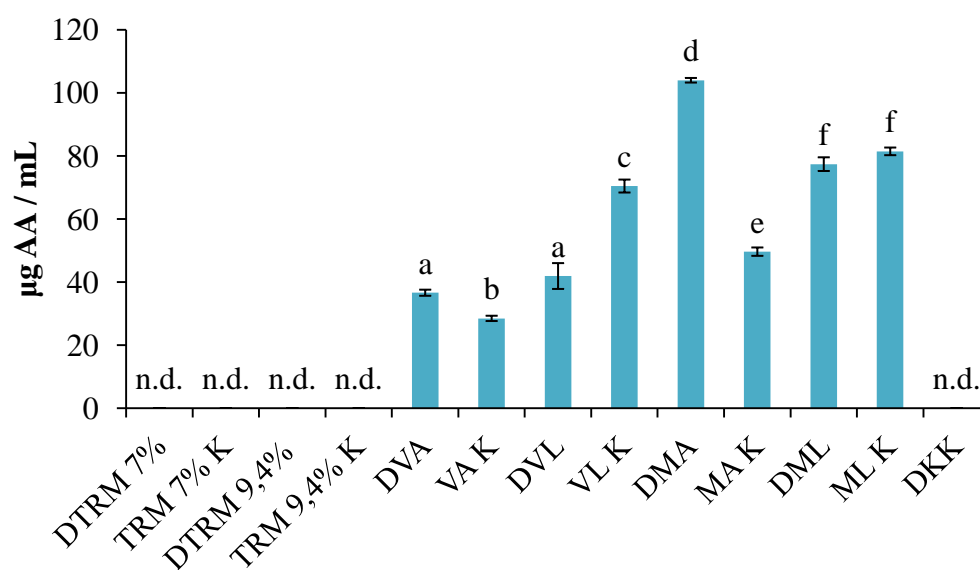
Оптимизовани адитиви имају одличан капацитет хелирања, који се додатно повећава након ГИД, где се вредности FCC теста приближно дуплирају, што указује на потенцијалну функционалност и апликативност. Капацитет хелирања адитива након дигестија значајно је већи у односу на дигестоване узорке гљива и млека. Битно је и запазити да је капацитет хелирања недигестованих адитива далеко већи у односу на полазна млека и екстракте гљива и чак већа у односу на њихов збир, па се овде вероватно ради о синергистичким интеракцијама између компонената са добрим капацитетом хелирања (Cömert & Gökmen, 2017). Литературни подаци везани за

капацитете хелирања екстраката гљива су оскудни, посебно када су у питању хелирајућа својства након симулације ГИД. Висок капацитет хелирања адитива након дигестија DVL дугује пептидима који се јављају као продукт разлагања протеина *L. sulphureus*, пептидима пореклом из млека, као и свом разноликом полисахаридном саставу. DVA поседује висок капацитет хелирања такође захваљујући пептидима насталим разлагањем протеина *A. blazei* (у мањем проценту него код *L. sulphureus*), пептидима насталим дигестијом протеина млека, мањим делом од полисахарида, а делимично можда и од ослобођених фенолних једињења. Као што је већ дискутовано, могуће је да се у комплексе протеина млека и полисахарида *A. blazei* могу инкорпорирати фенолне киселине (нпр. кофеинска киселина), које доприносе унакрсном повезивању (Schefer et al., 2021). Фенолна једињења се могу ослободити дигестијама, интераговати са ензимима и тиме утицати на успоравање хидролизе протеина, чиме се хидролиза зауставља на пептидима, уместо на аминокиселинама, па и хелирајућа активност расте (Stanisavljević et al., 2015).

На слици 4.57. приказане су средње вредности мерења редукујуће моћи узорак FRP тестом. Редукујућу моћ узорак млека пре и после дигестије није било могуће детектовати овом методом, као ни узорак контроле дигестивног коктела. Milinčić et al. (2022) добили су врло ниске, али мерљиве вредности редукујуће моћи дигестивног коктела и млека (до $\approx 15 \mu\text{g AA/mL}$). У другом раду козје млеко и термички третирано млеко ни у једној испитиваној концентрацији такође не показују мерљиве FRP вредности (Milinčić et al., 2021). Умерена редукујућа својства показују серум протеини, али су они код термички третираног козјег млека у саставу WP/CN комплекса, па не могу да редукују Fe^{3+} -ферицијанид комплекс (Chen et al., 2003; Pesic et al., 2012).

Водени екстракт *A. blazei* показује благи скок у редукујућој моћи након дигестије, док екстракт *L. sulphureus* показује пад редукујуће моћи након дигестије, па оба дигестована узорка екстраката гљива након варења показују сличан ниво редукујуће моћи. У фази експерименталног дизајна, као и у истраживањима након добијања оптимизованих адитива, видљиво је да је ABTS тест погодан за одређивање антиоксидативног капацитета обе врсте конституената (млека и екстраката гљива). Друга два теста су показала другачији модел – узорци који су се одликовали високим вредностима FCC теста имали су мању редукујућу моћ и обрнуто, па не чуди да млека која имају одлична хелирајућа својства не редукују, док одлична хелирајућа својства VL након дигестија нису могла да покажу и одлична редукујућа својства, већ се одликују благим падом након дигестија. Такође, протеини се одликују slabим редукујућим својствима, а концентрације протеина су далеко веће код VL ($\approx 56 \text{ g/100g}$) у односу на VA ($\approx 34 \text{ g/100g}$) (Milinčić et al., 2021). Капацитет хелирања DVA је био значајно мањи од DVL, а код FRP теста резултати су приближно исти. Добра редукујућа својства гљива приписују се њиховим полисахаридима или фенолним једињењима, док протеини не фигуришу у овој методи (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2012; Petrović et al., 2014b; Shah & Modi, 2020; Wei et al., 2020). Дакле, за повећање редукујуће моћи VA након дигестија у односу на VL кључне су разлике у њиховом уделу протеина, али и присуство фенолних киселина код *A. blazei*, разлике у полисахаридном саставу и биодоступности антиоксидативних компонената. You et al. (2014) су пронашли највише FRAP вредности у полисахаридној фракцији гљиве *Tricholoma mongolicum* Imai која је имала најхетерогенији полисахаридни састав, односно мањи удео глукозе, а већи арабинозе и рамнозе у полисахаридима. Узимајући у обзир полисахаридни састав *L. sulphureus*, могуће је да због њега екстракт има вишу редукујућу моћ пре ГИД, док продукти разлагања губе редукујућу моћ.

Оптимизовани адитиви без обзира на недетектовану редукујућу моћ млека имају значајно већу редукујућу моћ пре и након дигестије у односу на полазне компоненте. У случају адитива МА, вредности редукујуће моћи су приближно дуплиране након ГИД, што указује на одличну функционалност. Вредности редукујуће моћи адитива МЛ приближно су исте без обзира на симулирану ГИД, што ипак представља добар резултат, јер је за разлику од пада антиоксидативне вредности VL након дигестије млеко овде имало протективну улогу кроз ГИТ, па је мешање са млеком дало добар резултат са аспекта искоришћења редукујућих компонената *L. sulphureus* након дигестије.

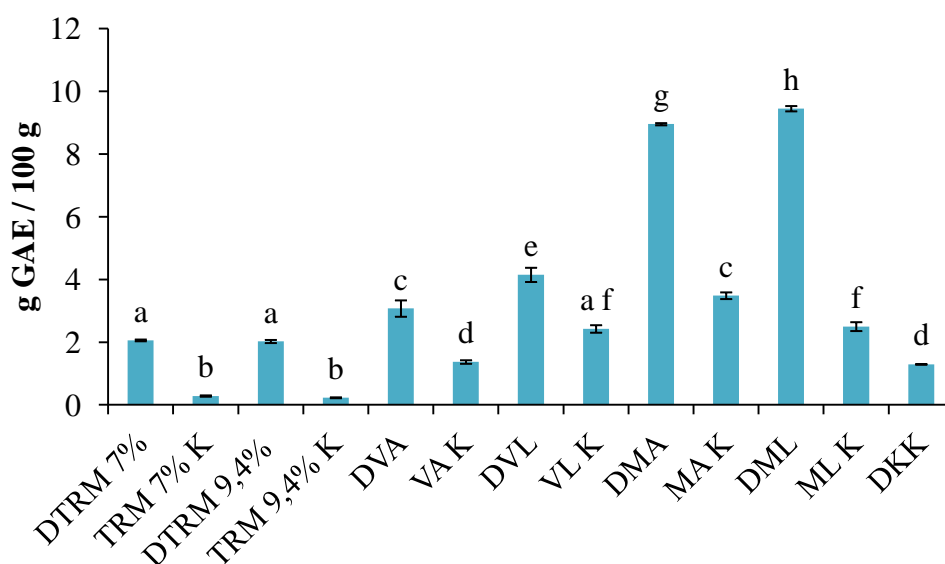


Слика 4.57. Способност редуције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ; FRP тест) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената. Резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: DTRM 7% - дигестовано 7% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 7% K – разблажено 7% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DTRM 9,4% - дигестовано 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 9,4% K – разблажено 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DVA – дигестовани водени екстракт *A. blazei*; VA K – разблажени водени екстракт *A. blazei* (контрола); DVL – дигестовани водени екстракт *L. sulphureus*; VL K – разблажени водени екстракт *L. sulphureus* (контрола); DMA – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; MA K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу (контрола); DML – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; ML K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу (контрола); DKK – контрола дигестивног коктела; AA – еквиваленти аксорбинске киселине.

Литературни подаци који се тичу дигестија гљива или мешавина гљива углавном се односе на прехранбене производе где је део састојака замењен прахом гљива или испитивање утицаја кувања и других техника на доступност биоактивних материја након симулираног варења. У свим случајевима наводи се скок у редукујућој моћи;

нпр. екстракти макрогљива подвргнути ГИД након кувања показују раст редукујуће моћи од 80 до чак 1350%, FRAP вредности свих узорака нудли обогаћених са *Lentinus edodes* након ГИД показују пораст редукујуће моћи у односу на контроле (Ng & Rosman, 2019; Wang et al., 2020). Бисквити обогаћени са три различите врсте гљива показали су скоро три пута већу редукујућу моћ мерену FRAP тестом након ГИД, што се дешава због ензимске хидролизе интер- и интра-молекулских веза и отпуштања нутријената и антиоксиданата (Tu et al., 2021).

Са слике 4.58. могу се видети вредности укупног антиоксидативног редукујућег капацитета узорака пре и после ГИД. Сваки узорак показао је статистички значајан скок ТРС вредности након симулације ГИД. У контексту посматрања ове методе као анализе антиоксидативности, до овог скока вероватно је дошло услед разлагања протеина и полисахарида на компоненте мање молекулске масе, присуства лактозе из млека, осталих шећера пореклом из екстраката гљива, ензима, пептида, аминокиселина, који такође реагују са Фолин-Чиколтеовим реагенсом (Everette et al., 2010), а не треба занемарити ни фенолна једињења која се ослобађају варењем, па утичу на скок вредности узорака млека и адитива (Milinčić et al., 2022). Дигестивни коктел такође у великој мери доприноси овим повећаним резултатима услед својих компонената (поглавље 3.17.).



Слика 4.58. Укупни антиоксидативни редукујући капацитет (TPC) дигестованих и недигестованих (разблажених) оптимизованих адитива и њихових почетних конституената. Резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према Tukey тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: DTRM 7% - дигестовано 7% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 7% K – разблажено 7% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DTRM 9,4% - дигестовано 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко; TRM 9,4% K – разблажено 9,4% термички третирано обезмашћено козје млеко (контрола); DVA – дигестовани водени екстракт *A. blazei*; VA K– разблажени водени екстракт *A. blazei* (контрола); DVL – дигестовани водени екстракт *L. sulphureus*; VL K – разблажени водени екстракт *L. sulphureus* (контрола); DMA – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу; MA K – разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei* у оптималном односу (контрола); DML – дигестовани оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу; ML K –

разблажени оптимизовани адитив - мешавина термички третираног обезмасљеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus* у оптималном односу (контрола); DKK – контрола дигестивног коктела; GAE – еквиваленти галне киселине.

Оба екстракта гљива показују статистички значајно веће TPC вредности након ГИД, из истог разлога као и код млека – разлагањем полисахарида и протеина јављају се компоненте мање молекулске масе које су реактивније према Фолин-Чиколтеовом реагенсу од недигестованих супстанци. Као што је и очекивано, VL К показује већи укупни антиоксидативни редукујући капацитет од VA К због већег удела протеина, што такође резултује већом концентрацијом продуката разградње након ГИД и већим TPC вредностима DVL у односу на DVA. Ово не чуди узимајући у обзир да је коришћена метода првобитно била осмишљена за анализу протеина, а не фенолних једињења (Kostić et al., 2021). Након дигестије екстракта, TPC вредност се повећала за чак $\approx 124\%$ код DVA у односу на VA К, док је код DVL у односу на VL К пораст након дигестија износио $\approx 71\%$. Већу стопу раста након ГИД екстракт VA делимично дугује и присуству фенолних киселина. Битан податак је и да адитиви показују велики скок TPC вредности након дигестија, и то $\approx 2,6$ пута код DMA у односу на MA К и $\approx 3,8$ пута код DML у односу на ML К. Овакав пораст TPC вредности је чест када се производи на бази млека обогаћују различитим састојцима (Gad & El-Salam, 2010; Milinčić et al., 2021), као и када се у прехранбене производе (углавном на бази ратарских производа) додаје одређен удео гљива, као што је нпр. *Lentinus edodes* (Tu et al., 2021; Wang et al., 2020). Корелациона анализа (табела 4.26.) показала је добру позитивну корелацију укупног антиоксидативног редукујућег капацитета са FCC и FRP тестом, што се може наћи у литератури. Klaus et al. (2013) су пронашли корелацију између TPC и редукујуће моћи за екстракте *L. sulphureus*, док је студија Mayakrishnan et al. (2013) пронашла корелацију између TPC и капацитета хелирања за екстракте *Schizophyllum commune*. Генерално посматрано, осим FRP теста где нема статистички значајне разлике између дигестованог и недигестованог ML, целокупна анализа антиоксидативног капацитета свим методама показује значајан пораст антиоксидативности оба адитива након дигестија, као и добре вредности капацитета недигестованих мешавина, што указује на потенцијалну функционалност. Осим анализе редукује моћи, дигестовани адитив на бази *L. sulphureus* (DML) показао је више вредности на свим осталим тестовима, у највећој мери захваљујући свом уделу протеина, хетерогености полисахаридног састава, као и биодоступности компонената, тј. мањем степену интеракција са казеинском мицелом у односу на адитив MA. Треба напоменути и да након дигестија остају недигестоване материје, као што је β -глюкан, које затим завршавају у дебелом цреву где подлежу ферментацији од стране интестиналних микроорганизама и испољавају своју позитивну биолошку улогу (Tu et al., 2021).

Табела 4.26. Статистички значајне корелације између антиоксидативних тестова коришћеним у истраживањима на оптимизованим адитивима и њиховим почетним конституентима

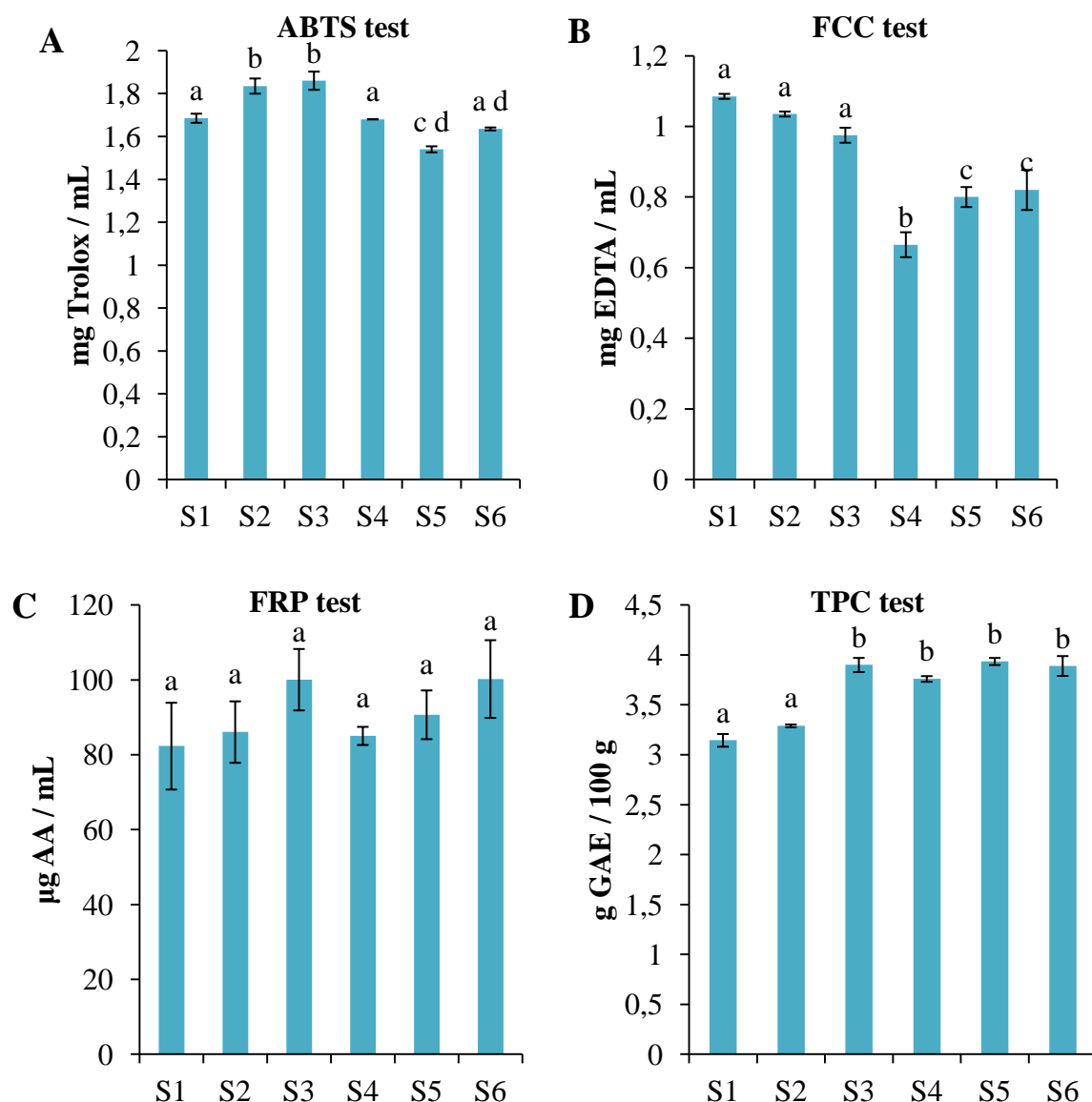
	ABTS	FCC	FRP	TPC
ABTS	/			
FCC		/		0,835**
FRP			/	0,762**
TPC				/

Приказани корелациони коефицијенти се односе само на значајне корелације на нивоу $p < 0,01$ (приказано са **). Скраћенице: ABTS - ABTS тест (укупан антиоксидативни капацитет); FCC - FCC тест (способност хелирања јона Fe^{2+}); FRP - FRP тест (способност редукације јона Fe^{3+} , редукујућа моћ); TPC – укупни антиоксидативни редукујући капацитет.

4.8.5. Антиоксидативна својства дехидрисаних супа са додатком оптимизованих адитива

На слици 4.59. приказани су резултати мерења антиоксидативних својстава дехидрисаних супа са додатком оптимизованих адитива МА и МL, као и без додатка, ради поређења. Дехидрисане супе су одабране као модел производ због тога што се протеини млека у различитим облицима додају у ове производе, па би додаток протеина млека обogaћених функционалним компонентама пореклом из гљива био начин за унапређење овог и других производа. Такође, функционалне супе су један од најчешћих типова функционалне хране на тржишту и сматрају се здравом и укусном храном припремљеном уз минимално процесуирање (Sugumar & Guha, 2020), а редован унос супа због негативне корелације са индексом телесне масе и уносом масти може смањити ризик од гојазности (Nadaroglu & Onem, 2019). Тврди се и да унос супа од поврћа утиче на смањење ризика од високог крвног притиска, дијабетеса и рака (Kalsoom et al., 2021). Ради бољег тумачења резултата, један тип дехидрисаних супа (S1 – S3) је направљен према Sugumar & Guha (2020), а додатно је искоришћена и комерцијална супа ради поређења (S4 – S6).

Мерења укупног антиоксидативног капацитета АВТS тестом (слика 4.59.А) показала су сличне вредности прављене и комерцијалне супе без додатка адитива (S1 и S4; $\approx 1,68$ mg Trolox/ mL узорка). Додатак оптимизованих адитива значајно је утицао на повећање укупног антиоксидативног капацитета (узорци S2 и S3), што представља битан податак везано за потенцијалну функционалност и апликативност производа. Висок укупни антиоксидативни капацитет адитива, као и вероватно синергија са постојећим антиоксидативним супстанцама из састојака супе утицали су на овакве резултате (Cömert & Gökmen, 2017). Martínez-Tomé et al. (2015) указују на добру способност неутралисања АВТS^{•+} супстанци пореклом из дехидрисане супе од поврћа сличног састава, али изражене помоћу ТЕАС вредности. Састојци који су заједнички за супе из ове дисертације и студију Martínez-Tomé et al. (2015), а носиоци су укупног антиоксидативног капацитета су дехидрисани бели лук, црни лук, протеини (разлика – хидролизати биљних протеина), палимино уље, со (NaCl) и скроб (разлика – модификовани), поређани по опадајућем укупном антиоксидативном капацитету. Високе вредности АВТS теста могу се пронаћи за екстракте црног лука, док су супстанце пореклом из бибера и белог лука корисне за борбу против других слободних радикала (Banerjee et al., 2003; Gülçin, 2005; Santas et al., 2008; 2010). Код комерцијалних супа, додаток адитива резултовао је благим падом у антиоксидативности (узорци S5 и S6), мада се овај податак мора узети са резервом, јер се поставља питање да ли би резултати били овакви да су адитиви инкорпорирани у производ током његове производње, што би можда резултовало другачијим интеракцијама, уместо накнадно у готов производ. Такође, комерцијална супа има преко 20 састојака, па су потребне детаљније студије које би испитале интеракције у овако сложеном систему. Без обзира на благи пад, резултати и даље указују на високу способност супстанци дехидрисаних супа да сакупе слободне радикале. Kalsoom et al. (2021) показују пораст вредности АВТS теста током 96 h складиштења супе са додатком *Lentinula edodes*; питање је након ког времена ове вредности крећу да опадају.



Слика 4.59. Антиоксидативна својства дехидрисаних супа без и са додатком оптимизованих адитива; А - укупан антиоксидативни капацитет (ABTS тест); В - способност хелирања јона Fe^{2+} (FCC тест); С - способност редукције јона Fe^{3+} (редукујућа моћ; FRP тест); D – укупни антиоксидативни редукуюћи капацитет (TPC). У оквиру сваке методе, резултати изнад којих стоје различита мала латинична слова се статистички разликују према *Tukey* тесту ($p < 0,05$). Скраћенице: S1 – дехидрисана супа са додатком термички третираног обезмашћеног козјег млека; S2 – дехидрисана супа са додатком оптимизованог адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; S3 – дехидрисана супа са додатком оптимизованог адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; S4 – комерцијална дехидрисана супа; S5 – комерцијална дехидрисана супа са додатком оптимизованог адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; S6 - комерцијална дехидрисана супа са додатком оптимизованог адитива на бази термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *L. sulphureus*; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине; GAE – еквиваленти галне киселине.

Испитивања капацитета хелирања узорака (слика 4.59.В) показала су мало другачије резултате. Сви узорци прављених супа (S1, S2, S3) показали су одлична својства. Са статистичке тачке гледишта додаток адитива није утицао на капацитет хелирања. Код

комерцијалних супа, додаток оптимизованих адитива утицао је на значајан раст капацитета хелирања. Мора се узети у обзир и то да су прва три узорка супа направљене и испитиване у року од неколико дана, док су комерцијалне супе купљене након неког временског периода у оквиру рока трајања. У литератури се може наћи да се током складиштења Мајлардовим реакцијама могу јавити супстанце као нпр. меланоидини пореклом из белог и црног лука и да оне у присуству хелатора металних јона могу повећавати антиоксидативну активност синергистичким деловањем са другим антиоксидативним компонентама (Gamboa et al., 2012; Martínez-Tomé et al., 2015). Могуће је да је додаток адитива на бази протеина млека, који имају одличан капацитет хелирања (Kostić et al., 2021; Milinčić et al., 2021, 2022) утицао на значајан скок капацитета хелирања комерцијалних супа, које имају другачији састав и чија су се својства мењала током рока трајања. Такође, висок капацитет хелирања може се приписати и појединачним компонентама супа. На пример, водени и етанолни екстракти црног бибера показују већи капацитет хелирања од бутилхидроксианизола, бутилхидрокситолуена и α -токоферола, што указује на могућност замене синтетских антиоксиданата природним екстрактима (Gülçin, 2005).

Редукујућа моћ узорка супа се статистички не разликује (слика 4.59.C). Сви узорци су испољили високе вредности FRP теста, док додаток адитива није статистички значајно утицао на вредности. Ово указује на редукујућу моћ других састојака супе, као што су нпр. црни лук и бибер (Benzie & Choi, 2014; Gülçin, 2005; Santas et al., 2008; Slimestad et al., 2007). Анализом 1113 намирница или састојака намирница у САД, у 50 са најбољим редокс-активним супстанцама убројан је црни бибер (Halvorsen et al., 2006). Rekha et al. (2010) пријављују веома изражен пораст редукујуће моћи након додатка листова *Anethum sowa* L. у мешавине супа, али је овакав пораст корелисан са порастом концентрације фенолних једињења. Супе припремљене са додатком гљиве *Lactarius piperatus* показале су добру редукујућу моћ, зависно од концентрације (Nadaroglu & Onem, 2019).

Укупни антиоксидативни редукујући капацитет свих узорка је висок (слика 4.59.D). ТРС вредност узорка S1 није значајно повећана додатком адитива МА. Такође, нема значајне разлике у ТРС вредностима комерцијалних супа са и без додатка оба адитива (узорци S4 – S6). Ово указује да укупни антиоксидативни редукујући капацитет узорка првенствено зависи од других састојака супа који показују одличне резултате на овом тесту. Црни лук представља одличан извор фенолних једињења (Santas et al., 2010), као и бибер, за који је интересантно да показује већи принос фенолних једињења у воденом екстракту у поређењу са етанолним (Gülçin, 2005). Једино статистички значајано повећање ТРС вредности остварено је додатком адитива ML (узорак S3 у односу на S1), што се може приписати великом уделу протеина у екстракту *L. sulphureus*. ТРС вредности инстант-супа са додатком 25% и 22,5% макрогљива биле су ниже од овде приказаних и кретале су се $\approx 0,7 - 1,2$ g GAE/100g, а након четири месеца складиштења опале су на вредности $\approx 0,6 - 0,9$ g GAE/100g (Mohamed et al., 2020). Ове вредности могу бити још ниже, зависно од рецептуре супе (Kalsoom et al., 2021). Sugumar & Guha (2020) пријављују више ТРС вредности супа ($\approx 24 - 34$ mg GAE/g), али ове супе садрже и листове биљке *Solanum nigrum* која се наводи као одличан извор фенолних једињења; додаток листова ове биљке значајно утиче на ТРС вредности. Слично је и са додатком листова *Anethum sowa* L. у мешавине супа, где се повећава укупан садржај фенолних једињења на рачун фенолних једињења ове биљке (Rekha et al., 2010). Укупни садржај фенолних једињења расте након све четири испитиване методе припреме супа са додатком гљиве *Hypsizygus marmoreus* (Sun et al., 2019).

Између резултата четири приказана антиоксидативна теста код узорака дехидрисаних супа нису пронађене статистички значајне корелације при $p < 0,05$.

Аутори наглашавају да протеини млека због своје потенцијалне улоге „носача“ биоактивних једињења имају велики потенцијал за формулацију прехранбених адитива (Haratifar & Guri, 2017). Протеини млека, тј. WP/CN комплекси настали након дејства високе температуре представљају саставни део адитива, који уз биоактивне компоненте испитиваних гљива могу послужити за формулацију функционалних адитива који заменом постојећих адитива базираних на протеинима млека, њиховим концентратима или изолатима подижу ниво функционалности и омогућавају потенцијално здравију исхрану људи. Анализом антиоксидативних својстава помоћу четири различита теста утврђено је да се протеини млека могу заменити оптимизованим адитивима, јер доприносе повећању или очувању антиоксидативности (осим једног случаја снижавања; ABTS тест, S4→S5), што представља значајан податак. Даља истраживања могла би да укажу на друга потенцијално функционална својства, као што су нпр. антиинфламаторна својства, као и друга корисна биолошка својства, затим искоришћење ових својстава у дигестивном тракту у присуству сложених матрикса, као и убацивање адитива у различите типове прехранбених производа према њиховим технофункционалним својствима – МА према еулгујућим, МЛ према пенивим својствима.

5. Закључци

На основу резултата ове докторске дисертације могу се донети следећи закључци:

- Анализиране су мешавине термички третираног и нетретираног обезмашћеног козјег млека и казеина и водених и полисахаридних екстраката гљива *A. blazei* и *L. sulphureus* ради потенцијалне примене као адитива у прехранбеним производима. 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 (\approx од -61 до -41 mV). Добре вредности показале су и вредности ζ-потенцијала узорака млека и мешавина са *L. sulphureus*, са мало нижим апсолутним вредностима (\approx од -54 до -35 mV). **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 *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 екстраката *L. sulphureus* није значајно утицао на величину мицела RM и TRM. Претпоставка је да аналогних интеракција нема или су врло слабог интензитета и да једињења PL и VL коегзистирају у раствору са једињењима млека. Ово може бити последица присуства већег броја честица – хетерогенијег састава полисахарида и већег удела протеина *L. sulphureus*. Код узорака казеина и мешавина на бази казеина, резултати мерења нису довољно репродуктивни, осим код TCN и TCNVL.
- На основу смањеног интензитета трака β -CN и α ₂-CN, присуства великог броја трака са молекулском масом мањом од 30 kDa, укључујући и новодетектоване полипептидне траке, уз траке слабог интензитета молекулских маса од 45 до 66 kDa (на **SDS-R-PAGE** електрофореграмима) искључиво код мешавина са VA које указују на присуство протеаза пореклом из *A. blazei* може се закључити да су код ових мешавина активни фунгални ензими и да разлажу поменуте казеине на нове полипептиде, чиме могу потенцијално допринети повећању функционалне вредности адитива. На **SDS-NR-PAGE** електрофореграмима је поново потврђено присуство продуката протеолитичке активности ензима из VA, а видљиве су и разлике између термички третираних и нетретираних узорака. Јасно је и да 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, видљивих само у нативним условима; ове интеракције могу бити електростатичке интеракције полисахарида и протеина (κ-CN) или нпр. водоничне везе. Електрофореза у нативним условима такође потврђује присуство поменутих специфичних

полипептида, као и траке нискомолекулских полипептида на узорцима TRMPL, TRMVL и TCNVL, што може допринети функционалности.

- **FTIR анализе мешавина**, као и **РСА 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. Ове анализе указују на промене протеинске структуре у амидним регионима, као и у угљенохидратном региону због присуства α - и β -аномера глукана и других полисахарида. 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 гликозилованог дела κ -CN и полисахарида. Поделе и класификација су мање јасни код мешавина на бази екстракта *L. sulphureus*. Додатне анализе спектра мешавина на бази RM и TRM показале су хетерогеност узорака, односно одсуство груписања услед присуства разних једињења, као што је велики удео протеина *L. sulphureus*, разноликог састава полисахарида гљиве, итд. Најјаснија раздвајања узорака у овом случају су на бази TRM.
- **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, где казеини имају несређенију и порознију структуру као последицу процедуре изоловања казеина и рехидрације мицеле. Разлике између додатка екстракта две различите гљиве, као ни два различита типа екстракта нису видљива овом методом. На основу резултата биохемијске карактеризације, DLS мерења, електрофоретских и FTIR анализа 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. На основу свега изнетог, истраживање је настављено на термички третираном млеку и воденим екстрактима гљива.
- Употребом **FFD**, једне од метода **експерименталног дизајна** извршен је скрининг система и од пет фактора одабрана су два која највише утичу на антиоксидативна својства мешавина. Утврђено је да на антиоксидативна својства мерена помоћу ABTS, FCC и FRP теста највећи утицај имају **концентрације екстракта гљива и термички третираног млека**. Најадекватније утврђивање антиоксидативности извршено је помоћу ABTS теста, где као носиоци антиоксидативности фигуришу једињења млека и екстракта гљива, док хелирајући капацитет углавном зависи од једињења млека, а редукујућа моћ у највећој мери од једињења гљива. Остали параметри (pH, 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**, делом **методологије одговора површина**, даље је испитан утицај концентрације екстракта гљива и млека на испитивана **биолошка и техно-функционална својства мешавина**. Осим анализе антиоксидативности, утврђен је утицај на пенива и емулгујућа својства, тј. 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 додавати у различите прехранбене производе, зависно од циља који треба постићи додатком адитива.

- На крају експерименталног дизајна, **применом функције пожељности** добијен је по један **оптимизован адитив дефинисаног односа** за сваку гљиву (МА: w(МЕ) 0,62%; w(MPP) 7% и ML: w(МЕ) 0,79%; w(MPP) 9,4%).
- У даљем току дисертације истражена су биолошка и техно-функционална својства оптимизованих адитива. **Анализе антиоксидативних својстава** адитива и њихових конституената указале су на одличан укупан антиоксидативни капацитет свих узорака, одличан капацитет хелирања млека и адитива, затим умерену редукујућу моћ адитива, већу у случају ML због одличне редукујуће моћи VL и релативно низак укупан антиоксидативни редукујући капацитет узорака, осим високог капацитета екстраката гљива. Адитиви су показали **добар антиоксидативни потенцијал** који их кандидује за функционалне компоненте хране, а примена различитих антиоксидативних тестова показала је да једињења пореклом из млека, као и из гљива различитим механизмима делују антиоксидативно. У појединим случајевима антиоксидативност адитива превазилази антиоксидативност полазних компонената, што може указивати на синергистичке реакције компонената адитива.
- Адитиви су показали добар **капацитет пене** и одређену стабилност, а све то при ниској концентрацији, што није случај са млеком и екстрактима гљива, који се одликују лошим пенивим својствима. ML у односу на МА има боља **пенива својства**, вероватно због већег удела протеина. Млеко и адитив МА су показали **добра емулгујућа својства**. МА 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 дејство адитива** је било слабо до умерено, уз мало већу бактерицидну и бактериостатску моћ ка *E.coli*; **антифунгална активност** је такође била слаба до умерена, уз одличне вредности ка *Penicillium verrucosum* var. *cusclorium* (изолат из хране), боље у односу на комерцијални адитив E211. Уз друге факторе, **антимикробни потенцијал** који имају додати адитиви може утицати на побољшање функционалности прехранбених производа.
- Укупни антиоксидативни капацитет адитива значајно је порастао након **симулација in vitro дигестија**, услед продуката разлагања протеина и полисахарида, пре свега на рачун пептида. Слично је и са капацитетом хелирања адитива, који се приближно дуплира из истих разлога. Редукујућа моћ адитива је била висока, значајно се повећала након ГИД у случају МА, док се није мењала код ML. Скок ТРС вредности био је највише изражен – након ГИД адитива повећао се $\approx 2,6 - 3,8$ пута. Захваљујући свом биохемијском саставу, пре свега макромолекуларном, адитиви доприносе очувању и побољшању антиоксидативности проласком кроз симулирани дигестивни тракт.
- На крају истраживања, **додатак оптимизованих адитива у модел прехранбеног производа** (две врсте дехидрисаних супа) указао је на одлична антиоксидативна својства оваквих производа (очувана или повећана у већини случајева) односно на функционалност и у сложеном матриксу, тј. храни.

Овим истраживањем установљено је да мешавине термички третираног и нетретираног обезмашћеног козјег млека и казеина и екстраката гљива *A.blazei* и *L. sulphureus* могу послужити за формулацију функционалних прехранбених адитива. Биохемијски састав полазних конституената, интеракције једињења млека и екстраката *A.blazei*, присуство пептида услед протеолитичког дејства протеаза пореклом из *A.blazei*, висок проценат укупних протеина у воденим екстрактима гљива, посебно *L. sulphureus* су одговорни за

функционалност ових мешавина. Термички третирано обезмашћено млеко и водени екстракти су одабрани као најподеснији за формулацију адитива. Експерименталним дизајном установљен је утицај најзначајнијих фактора, као и оптималан однос конституената са становишта најбољих антиоксидативних и техно-функционалних својстава. Оптимизовани адитиви су у различитој мери показали антиоксидативна, техно-функционална и антимикуробна својства, а указано је и на високу антиоксидативност након симулираних *in vitro* ГИД. Антиоксидативна својства су очувана или побољшана и након додавања адитива у прехранбени производ (модел производ – дехидрисане супе). На основу свега изнетог, заокружен је поступак испитивања од почетних истраживања и карактеризације до додатка адитива у конкретан производ. Формулација адитива на бази козјег млека и екстракта гљива потенцијално може имати позитиван утицај на људско здравље убацивањем у прехранбене производе који се могу третирати као функционални.

6. Литература

- Abdelshafy, A. M., Belwal, T., Liang, Z., Wang, L., Li, D., Luo, Z., & Li, L. (2022). A comprehensive review on phenolic compounds from edible mushrooms: Occurrence, biological activity, application and future prospective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6204–6224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1898335>
- Acharya, D. P., Sanguansri, L., & Augustin, M. A. (2013). Binding of resveratrol with sodium caseinate in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 141(2), 1050–1054. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.037>
- Acharya, K., Ghosh, S., Khatua, S., & Mitra, P. (2016). Pharmacognostic standardization and antioxidant capacity of an edible mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 11(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00003-015-0977-1>
- Agafonova, S. V., Olenikov, D. N., Borovskii, G. B., & Penzina, T. A. (2007). Chemical composition of fruiting bodies from two strains of *Laetiporus sulphureus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(6), 687–688. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0229-4>
- Agaricus Blazei Murrill (Subrufescens): Health Benefits & Identification*, преузето 14.05.2024. ca <https://healing-mushrooms.net/Agaricus-Blazei>
- Aguiar, L. M., Geraldi, M. V., Betim Cazarin, C. B., & Maróstica Junior, M. R. (2019). *Chapter 11 - Functional Food Consumption and Its Physiological Effects* (M. R. S. B. T.-B. C. Campos (ed.); pp. 205–225). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00011-6>
- Ahmad, K., & Singh, N. (2016). Evaluation of nutritional quality of developed functional bread fortified with Mushroom and dates. *The Clarion- International Multidisciplinary Journal*, 5(1), 23. <https://doi.org/10.5958/2277-937x.2016.00004.6>
- Ahmed, A. S., El-Bassiony, T., Elmalt, L. M., & Ibrahim, H. R. (2015). Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins. *Food Research International*, 74, 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.04.032>
- Ahn, W.-S., Kim, D.-J., Chae, G.-T., Lee, J.-M., Bae, S.-M., Sin, J.-I., Kim, Y.-W., Namkoong, S.-E., & Lee, I. P. (2004). Natural killer cell activity and quality of life were improved by consumption of a mushroom extract, *Agaricus blazei* Murill Kyowa, in gynecological cancer patients undergoing chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 14(4), 589–594. <https://doi.org/10.1111/j.1048-891X.2004.14403.x>
- Aljewicz, M., Mulet-Cabero, A.-I., & Wilde, P. (2020). A comparative study of the influence of the content and source of β -glucan on the rheological, microstructural properties and stability of milk gel during acidification. *Food Hydrocolloids*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106486>
- ALKaisy, Q. H., Al-Saadi, J. S., AL-Rikabi, A. K. J., Altemimi, A. B., Hesarinejad, M. A., & Abdelmaksoud, T. G. (2023). Exploring the health benefits and functional properties of goat milk proteins. *Food Science & Nutrition*, 11(10), 5641–5656. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fsn3.3531>
- Alkhatib, A. (2020). Antiviral Functional Foods and Exercise Lifestyle Prevention of Coronavirus. *Nutrients*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/nu12092633>
- Almaas, H., Cases, A.-L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., Aadnoey, T., &

Vegarud, G. E. (2006). In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16(9), 961–968. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.029>

Almeida, D., Cardoso, R. V. C., Pereira, C., Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Zied, D. C., Junior, W. G. V., Caitano, C. E. C., Fernandes, Â., & Barros, L. (2022). Biochemical Approaches on Commercial Strains of *Agaricus subrufescens* Growing under Two Environmental Cultivation Conditions. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/jof8060616>

Alongi, M., & Anese, M. (2021). Re-thinking functional food development through a holistic approach. *Journal of Functional Foods*, 81, 104466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104466>

Alquini, G., Carbonero, E. R., Rosado, F. R., Cosentino, C., & Iacomini, M. (2004). Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00853-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00853-X)

Alves, M J, Ferreira, I. C. F. R., Lourenço, I., Castro, A., Pereira, L., Martins, A., & Pintado, M. (2014a). Wild mushroom extracts potentiate the action of standard antibiotics against multiresistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 116(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/jam.12348>

Alves, Maria José, Ferreira, I. C. F. R., Lourenço, I., Costa, E., Martins, A., & Pintado, M. (2014b). Wild mushroom extracts as inhibitors of bacterial biofilm formation. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(3), 667–679. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030667>

Andrade, J., Pereira, C. G., Almeida Junior, J. C. de, Viana, C. C. R., Neves, L. N. de O., Silva, P. H. F. da, Bell, M. J. V., & Anjos, V. de C. dos. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT*, 99, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079>

Anema, S. G., & Klostermeyer, H. (1996). ζ -Potentials of casein micelles from reconstituted skim milk heated at 120 °C. *International Dairy Journal*, 6(7), 673–687. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00070-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00070-4)

Anema, S. G., Lowe, E. K., & Lee, S. K. (2004). Effect of pH at heating on the acid-induced aggregation of casein micelles in reconstituted skim milk. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 779–787. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.003>

Anema, S. G., & Stanley, D. J. (1998). Heat-induced, pH-Dependent Behaviour of Protein in Caprine Milk. *International Dairy Journal*, 8(10–11), 917–923. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00015-1)

Anuar, M. N. N., Ibrahim, M., Kharsa, B. E., Mat Alewi, N. A., Azwani, A., & Lokman, I. (2019). Response surface optimisation of high antioxidant jelly from *Musa paradisiaca* and *Trigona* sp. honey using central composite design as a convenient functional food. *International Food Research Journal*.

Anusuya, S., & Sathiyabama, M. (2014). Preparation of β -D-glucan nanoparticles and its antifungal activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 440–443. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.011>

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)

- Arora, B., Kamal, S., & Sharma, V. P. (2017). Sensory, nutritional and quality attributes of sponge cake supplemented with mushroom () powder. *Nutrition & Food Science*, 47(4), 578–590. <https://doi.org/10.1108/NFS-12-2016-0187>
- Arsiccio, A., Sparavigna, A. C., Pisano, R., & Barresi, A. A. (2019). Measuring and predicting pore size distribution of freeze-dried solutions. *Drying Technology*, 37(4), 435–447. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1430042>
- Ashraf Khan, A., Gani, A., Masoodi, F. A., Mushtaq, U., & Silotry Naik, A. (2017). Structural, rheological, antioxidant, and functional properties of β -glucan extracted from edible mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus attrimentarius*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 11, 67–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.07.006>
- Ashraf, Z. ul, Shah, A., Gani, A., Gani, A., Masoodi, F. A., & Noor, N. (2021). Nanoreduction as a technology to exploit β -Glucan from cereal and fungal sources for enhancing its nutraceutical potential. *Carbohydrate Polymers*, 258, 117664. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117664>
- Assemie, A., & Abaya, G. (2022). The Effect of Edible Mushroom on Health and Their Biochemistry. *International Journal of Microbiology*, 2022, 8744788. <https://doi.org/10.1155/2022/8744788>
- Association of Official Analytical Chemists., P. (1995). *Official methods of analysis of AOAC international*. Association of Official Analytical Chemists.
- Atanasova, J., & Ivanova, I. (2010). Antibacterial Peptides from Goat and Sheep Milk Proteins. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2), 1799–1803. <https://doi.org/10.2478/V10133-010-0049-8>
- Ayala-Hernandez, I., Goff, H. D., & Corredig, M. (2008). Interactions between milk proteins and exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* observed by scanning electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2583–2590. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0876>
- Ayaz, F., Torun, H., Özel, A., Col, M., Duran, C., Sesli, E., & Çolak, A. (2011). Nutritional value of some wild edible mushrooms from Black Sea Region (Turkey). *Turkish Journal of Biochemistry*, 36, 385–393.
- Azeez, L. A., Adedokun, S. O., Adeoti, A. O., & Babalola, J. O. (2018). Quality Characteristics of Fortified Bread Produced from Cassava and Mushroom Flours. *Journal of Food Processing & Technology*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000724>
- Azhar, Mohd Akmal, & Salim, Norshafiq. (2017). Isolation and Molecular Characterization of Local Goat Milk Casein for Nutraceutical Value. *MATEC Web Conf.*, 97, 1084. <https://doi.org/10.1051/mateconf/20179701084>
- Azhar, M., Haris, M. S., Mohamad, I., Ismadi, M., Yazid, A., Rahman, S., & Azlan, N. (2021). Optimisation of alginate-pectin bead formulation using central composite design guided electrospray technique. *International Food Research Journal*, 28, 860–870. <https://doi.org/10.47836/ifrj.28.4.22>
- Badora, A., Bawolska, K., Kozłowska-Strawska, J., & Domańska, J. (2019). Food Additives in Food Products: A Case Study. In G. Mózsik & M. Figler (Eds.), *Nutrition in Health and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85723>
- Bahri, A., Martin, M., Gergely, C., Pugnère, M., Chevalier-Lucia, D., & Marchesseau, S. (2017). Atomic Force Microscopy Study of the Topography and Nanomechanics of Casein Micelles Captured by an Antibody. *Langmuir*, 33(19), 4720–4728.

<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00311>

Banerjee, S. K., Mukherjee, P. K., & Maulik, S. K. (2003). Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. *Phytotherapy Research : PTR*, 17(2), 97–106. <https://doi.org/10.1002/ptr.1281>

Barac, M. B., Pesic, M. B., Stanojevic, S. P., Kostic, A. Z., & Bivolarevic, V. (2015). Comparative study of the functional properties of three legume seed isolates: adzuki, pea and soy bean. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2779–2787. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1298-6>

Barać, M., Cabrilo, S., Pešić, M., Stanojević, S., Pavličević, M., Maćej, O., & Ristić, N. (2011). Functional properties of pea (*Pisum sativum*, L.) protein isolates modified with chymosin. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 8372–8387. <https://doi.org/10.3390/ijms12128372>

Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., & Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 4973–4990. <https://doi.org/10.3390/ijms11124973>

Barbisan, L. F., Miyamoto, M., Scolastici, C., Salvadori, D. M. F., Ribeiro, L. R., Eira, A. F., & de Camargo, J. L. V. (2002). Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. *Journal of Ethnopharmacology*, 83(1–2), 25–32. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00171-x](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00171-x)

Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836–845. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>

Bauer Petrovska, B. (2001). Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212(4), 469–472. <https://doi.org/10.1007/s002170000285>

Bauland, J., Bouchoux, A., Croguennec, T., Famelart, M.-H., & Guyomarc'h, F. (2022). Atomic force microscopy to assess the mechanical properties of individual casein micelles. *Food Hydrocolloids*, 128, 107577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107577>

Benmoussa, A., & Provost, P. (2019). Milk MicroRNAs in Health and Disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 703–722. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12424>

Benzie, I. F. F., & Choi, S.-W. (2014). *Chapter One - Antioxidants in Food: Content, Measurement, Significance, Action, Cautions, Caveats, and Research Needs* (J. Henry (ed.); Vol. 71, pp. 1–53). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>

Bernardshaw, S., Johnson, E., & Hetland, G. (2005). An extract of the mushroom *Agaricus blazei* Murill administered orally protects against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 62(4), 393–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01667.x>

Bertollo, A. G., Mingoti, M. E. D., Plissari, M. E., Betti, G., Roman Junior, W. A., Luzardo, A. R., & Ignácio, Z. M. (2022). *Agaricus blazei* Murrill mushroom: A review on the prevention and treatment of cancer. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 2, 100032. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2021.100032>

Berven, L., Karppinen, P., Hetland, G., & Samuelsen, A. B. C. (2015). The polar high molecular weight fraction of the *Agaricus blazei* Murill extract, AndoSan™, reduces the activity of the tumor-associated protease, legumain, in RAW 264.7 cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(4),

429–438. <https://doi.org/10.1089/jmf.2014.0018>

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

Biedroń, R., Tangen, J.-M., Maresz, K., & Hetland, G. (2012). Agaricus blazei Murill - immunomodulatory properties and health benefits. *Funct Foods Health Dis*, 2, 428–447. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v2i11.72>

Braaksma, A., & Schaap, D. J. (1996). Protein analysis of the common mushroom Agaricus bisporus. *Postharvest Biology and Technology*, 7(1), 119–127. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00034-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00034-8)

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brennan, M. A., Derbyshire, E., Tiwari, B. K., & Brennan, C. S. (2013). Integration of β -glucan fibre rich fractions from barley and mushrooms to form healthy extruded snacks. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 68(1), 78–82. <https://doi.org/10.1007/s11130-012-0330-0>

Broyard, C., & Gaucheron, F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 831–862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>

Bruggemann, R., Orlandi, J., Benati, F., Galhardi, L., Mantovani, M., Nozawa, C., & Linhares, R. (2006). Antiviral activity of Agaricus blazei Murrill ss. Heinem extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. *Brazilian Journal of Microbiology - BRAZ J MICROBIOL*, 37. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000400029>

Bruno Siewe, F., Kudre, T. G., & Narayan, B. (2021). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction conditions of umami compounds from fish by-products using the combination of fractional factorial design and central composite design. *Food Chemistry*, 334, 127498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127498>

Bulam, S., Üstün, N., & Peksen, A. (2019). *Nutraceutical and Food Preserving Importance of Laetiporus sulphureus*. 7, 94–100. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.94-100.2729>

Buratti, C., Barbanera, M., Lascaro, E., & Cotana, F. (2018). Optimization of torrefaction conditions of coffee industry residues using desirability function approach. *Waste Management (New York, N.Y.)*, 73, 523–534. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.012>

Cais-Sokolińska, D., Stachowiak, B., Kaczyński, Ł. K., Bierzuńska, P., & Górna, B. (2018). The stability of the casein-gluconate matrix in reduced-lactose kefir with soluble fraction polysaccharides containing β -glucan from Pleurotus ostreatus. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 122–130. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12429>

Çam, M., & İçyer, N. C. (2015). Phenolics of pomegranate peels: extraction optimization by central composite design and alpha glucosidase inhibition potentials. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1489–1497. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1148-y>

Camelini, C. M., Maraschin, M., de Mendonça, M. M., Zucco, C., Ferreira, A. G., & Tavares, L. A. (2005). Structural Characterization of β -glucans of Agaricus brasiliensis in Different Stages of Fruiting Body Maturity and their Use in Nutraceutical Products. *Biotechnology Letters*, 27(17), 1295–1299. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-0222-6>

- Carneiro, A. A. J., Ferreira, I. C. F. R., Dueñas, M., Barros, L., da Silva, R., Gomes, E., & Santos-Buelga, C. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, *138*(4), 2168–2173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.12.036>
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 284–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Carvajal, A. E. S. S., Koehnlein, E. A., Soares, A. A., Eler, G. J., Nakashima, A. T. A., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2012). Bioactives of fruiting bodies and submerged culture mycelia of *Agaricus brasiliensis* (A. *blazei*) and their antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(2), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.018>
- Çekiç, S. D., Demir, A., Başkan, K. S., Tütem, E., & Apak, R. (2015). Determination of total antioxidant capacity of milk by CUPRAC and ABTS methods with separate characterisation of milk protein fractions. *The Journal of Dairy Research*, *82*(2), 177–184. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000114>
- Cerón-Guevara, M. I., Rangel-Vargas, E., Lorenzo, J. M., Bermúdez, R., Pateiro, M., Rodríguez, J. A., Sanchez-Ortega, I., & Santos, E. M. (2020). Effect of the addition of edible mushroom flours (*Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*) on physicochemical and sensory properties of cold-stored beef patties. *Journal of Food Processing and Preservation*, *44*(3), e14351. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpp.14351>
- Chan, Y., Chang, T., Chan, C. H., Yeh, Y. C., Chen, C. W., Shieh, B., & Li, C. (2007). Immunomodulatory effects of *Agaricus blazei* Murill in Balb/cByJ mice. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, *40*(3), 201–208.
- Chang, S. T., & Buswell, J. A. (1996). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *12*(5), 473–476. <https://doi.org/10.1007/BF00419460>
- Chanphai, P., Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2018). Review on the loading efficacy of dietary tea polyphenols with milk proteins. *Food Hydrocolloids*, *77*, 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.10.008>
- Chauhan, S., Powar, P., & Mehra, R. (2021). A review on nutritional advantages and nutraceutical properties of cow and goat milk. *International Journal of Applied Research*, *7*, 101–105. <https://doi.org/10.22271/allresearch.2021.v7.i10b.9025>
- Chávez-Servín, J. L., Andrade-Montemayor, H. M., Velázquez Vázquez, C., Aguilera Barreyro, A., García-Gasca, T., Ferríz Martínez, R. A., Olvera Ramírez, A. M., & de la Torre-Carbot, K. (2018). Effects of feeding system, heat treatment and season on phenolic compounds and antioxidant capacity in goat milk, whey and cheese. *Small Ruminant Research*, *160*, 54–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.01.011>
- Chazelas, E., Deschasaux, M., Srour, B., Kesse-Guyot, E., Julia, C., Alles, B., Druesne-Pecollo, N., Galan, P., Herberg, S., Latino-Martel, P., Esseddik, Y., Szabo, F., Slamich, P., Gigandet, S., & Touvier, M. (2020). Food additives: distribution and co-occurrence in 126,000 food products of the French market. *Scientific Reports*, *10*(1), 3980. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60948-w>
- Cheema, M., Mohan, M. S., Campagna, S. R., Jurat-Fuentes, J. L., & Harte, F. M. (2015). The association of low-molecular-weight hydrophobic compounds with native casein micelles in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, *98*(8), 5155–5163. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9461>
- Chen, J., Lindmark-Månsson, H., Gorton, L., & Åkesson, B. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy*

Journal, 13(12), 927–935. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00139-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00139-0)

Cheng, M., Qi, J.-R., Feng, J.-L., Cao, J., Wang, J.-M., & Yang, X.-Q. (2018). Pea soluble polysaccharides obtained from two enzyme-assisted extraction methods and their application as acidified milk drinks stabilizers. *Food Research International*, 109, 544–551. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.056>

Cho, S.-M., Jang, K.-Y., Park, H. J., & Park, J.-S. (2008). Analysis of the Chemical Constituents of *Agaricus brasiliensis*. *Mycobiology*, 36(1), 50–54. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2008.36.1.050>

Choe, J., Lee, J., Jo, K., Jo, C., Song, M., & Jung, S. (2018). Application of winter mushroom powder as an alternative to phosphates in emulsion-type sausages. *Meat Science*, 143, 114–118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.038>

Clark, S., & Mora García, M. B. (2017). A 100-Year Review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10026–10044. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13287>

Cömert, E. D., & Gökmen, V. (2017). Antioxidants Bound to an Insoluble Food Matrix: Their Analysis, Regeneration Behavior, and Physiological Importance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(3), 382–399. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12263>

Conesa, C., Sánchez, L., Rota, C., Pérez, M.-D., Calvo, M., Farnaud, S., & Evans, R. W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 131–139. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.005>

Corrêa, R. C. G., Barros, L., Fernandes, Â., Sokovic, M., Bracht, A., Peralta, R. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). A natural food ingredient based on ergosterol: optimization of the extraction from *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. *Food & Function*, 9(3), 1465–1474. <https://doi.org/10.1039/c7fo02007d>

Corzo, O., & Gomez, E. R. (2004). Optimization of osmotic dehydration of cantaloupe using desired function methodology. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 213–219. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.09.035>

Coscueta, E. R., Batista, P., Gomes, J. E. G., da Silva, R., & Pintado, M. M. (2022). Screening of Novel Bioactive Peptides from Goat Casein: In Silico to In Vitro Validation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052439>

Costa, N. R., Lourenço, J., & Pereira, Z. L. (2011). Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107(2), 234–244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2011.04.004>

Crowley, S. V., Desautel, B., Gazi, I., Kelly, A. L., Huppertz, T., & O'Mahony, J. A. (2015). Rehydration characteristics of milk protein concentrate powders. *Journal of Food Engineering*, 149, 105–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.033>

da Silva Campelo, M., Neto, J. F. C., Lima, A. B. N., das Chagas Neto, F. C., da Costa Gonzaga, M. L., de Aguiar Soares, S., Leal, L. K. A. M., Ribeiro, M. E. N. P., & Ricardo, N. M. P. S. (2021). Polysaccharides and extracts from *Agaricus brasiliensis* Murill – A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1697–1714. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.112>

Dalgleish, D. G. (2006). Food emulsions—their structures and structure-forming properties. *Food Hydrocolloids*, 20(4), 415–422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.10.009>

Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible

improvements. *Soft Matter*, 7(6), 2265–2272. <https://doi.org/10.1039/C0SM00806K>

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 449–467. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214>

Dalgleish, D. G., Spagnuolo, P. A., & Douglas Goff, H. (2004). A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14(12), 1025–1031. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.008>

Das, A. K., Nanda, P. K., Dandapat, P., Bandyopadhyay, S., Gullón, P., Sivaraman, G. K., McClements, D. J., Gullón, B., & Lorenzo, J. M. (2021). Edible Mushrooms as Functional Ingredients for Development of Healthier and More Sustainable Muscle Foods: A Flexitarian Approach. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092463>

Davis, B. J. (1964). DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404–427. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>

Davoli, P., Mucci, A., Schenetti, L., & Weber, R. W. S. (2005). Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Phytochemistry*, 66(7), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.023>

de Kruif, C G. (2003). Chapter VI Caseins. In W. Y. Aalbersberg, R. J. Hamer, P. Jasperse, H. H. J. de Jongh, C. G. de Kruif, P. Walstra, & F. A. de Wolf (Eds.), *Industrial Proteins in Perspective* (Vol. 23, pp. 219–269). Elsevier. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(03\)80006-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0921-0423(03)80006-0)

de Kruif, Cornelis G, Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171–172, 36–52. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>

de Miranda, A. M. (2022). *Agaricus brasiliensis* (Sun mushroom) and its therapeutic potential: A review. *Archives of Food and Nutritional Science*, 6, 6–15. <https://doi.org/10.29328/journal.afns.1001032>

de Miranda, A. M., Rossoni Júnior, J. V., Souza E Silva, L., Dos Santos, R. C., Silva, M. E., & Pedrosa, M. L. (2017). *Agaricus brasiliensis* (sun mushroom) affects the expression of genes related to cholesterol homeostasis. *European Journal of Nutrition*, 56(4), 1707–1717. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1217-x>

de Oliveira, A. H., Mata, M. E. R. M. C., Fortes, M., Duarte, M. E. M., Pasquali, M., & Lisboa, H. M. (2021). Influence of spray drying conditions on the properties of whole goat milk. *Drying Technology*, 39(6), 726–737. <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1714647>

de Oliveira, F. M., Mokochinski, J. B., Reyes Torres, Y., Dalla Santa, H. S., & González-Borrero, P. P. (2018). Photoacoustic spectroscopy applied to the direct detection of bioactive compounds in *Agaricus brasiliensis* mycelium. *Journal of Biological Physics*, 44(1), 93–100. <https://doi.org/10.1007/s10867-017-9478-z>

de Oliveira Gorgulho Silva, C., Raisa Barbosa Cunha, J., Almeida Conceição, A., Gonzaga Almeida, E., Cunha Zied, D., Gonçalves Vieira Junior, W., Souza Dias, E., Isikhuemhen, O. S., Verardi Abdelnur, P., & Gonçalves de Siqueira, F. (2022). Outdoor versus indoor cultivation: Effects on the metabolite profile of *Agaricus subrufescens* strains analyzed by untargeted metabolomics. *Food Chemistry*, 374, 131740. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131740>

de Sousa Cardozo, F. T. G., Camelini, C. M., Mascarello, A., José Rossi, M., José Nunes, R., Monte Barardi, C. R., de Mendonça, M. M., & Simões, C. M. O. (2011). Antitherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. *Antiviral Research*, 92(1), 108–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.009>

Delmanto, R. D., de Lima, P. L., Sugui, M. M., da Eira, A. F., Salvadori, D. M., Speit, G., & Ribeiro, L. R. (2001). Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutation Research*, 496(1–2), 15–21. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00228-5](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00228-5)

Derringer, G., & Suich, R. (1980). Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214–219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

Deshwal, G. K., Singh, A. K., Kumar, D., & Sharma, H. (2020). Effect of spray and freeze drying on physico-chemical, functional, moisture sorption and morphological characteristics of camel milk powder. *LWT*, 134, 110117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110117>

Deswal, A., Deora, N. S., & Mishra, H. N. (2014). Optimization of Enzymatic Production Process of Oat Milk Using Response Surface Methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 610–618. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1144-2>

Dhasmana, S., Das, S., & Shrivastava, S. (2022). Potential nutraceuticals from the casein fraction of goat's milk. *Journal of Food Biochemistry*, 46(6), e13982. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13982>

Dias, E., Abe, C., & Schwan, R. (2004). Truths and myths about the mushroom *Agaricus blazei*. *Scientia Agricola*, 61. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000500014>

Dias, E. S., Zied, D. C., Alm, G., & Rinker, D. L. (2014). Supplementation of Compost for *Agaricus subrufescens* Cultivation. *Industrial Biotechnology*, 10(2), 130–132. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0040>

Dias, G., Marapana, R., Rathnayaka, U., Gayathri, S., Anuradha, N., Kananke, T., Rathnayaka, R. M. K., Perera, N., Sabaragamuwa, R., & Wickramaratne, M. (2023). Consumers' Knowledge, Attitudes, and Behavior Regarding Functional Food Products-A Survey from Selected Areas of Sri Lanka. *Journal of Agricultural Sciences – Sri Lanka*, 18, 140. <https://doi.org/10.4038/jas.v18i1.10104>

Diemer, S. K., Svensson, B., Babol, L. N., Cockburn, D., Grijpstra, P., Dijkhuizen, L., Folkenberg, D. M., Garrigues, C., & Ipsen, R. H. (2012). Binding Interactions Between α -glucans from *Lactobacillus reuteri* and Milk Proteins Characterised by Surface Plasmon Resonance. *Food Biophysics*, 7(3), 220–226. <https://doi.org/10.1007/s11483-012-9260-5>

Domínguez Díaz, L., Fernández-Ruiz, V., & Cámara, M. (2020). An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. *Journal of Functional Foods*, 68, 103896. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103896>

Dong, Q., Yao, J., Yang, X., & Fang, J. (2002). Structural characterization of a water-soluble β -d-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research*, 337(15), 1417–1421. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00166-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00166-0)

Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Mo, L., Bai, X., & Wang, H. (2022). pH-shifting formation of goat milk casein nanoparticles from insoluble peptide aggregates and encapsulation of curcumin for enhanced dispersibility and bioactivity. *LWT*, 154, 112753. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112753>

Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X., & Wang, H. (2022). Characterization of

structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT*, 159, 113257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113257>

Ebina, T., & Fujimiya, Y. (1998). Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy (Dordrecht, Netherlands)*, 11(4), 259–265. <https://doi.org/10.1023/a:1008054111445>

Eguchi, N., Fujino, K., Thanasut, K., Taharaguchi, M., Motoi, M., Motoi, A., Oonaka, K., & Taharaguchi, S. (2017). In vitro Anti-Influenza Virus Activity of *Agaricus brasiliensis* KA21. *Biocontrol Science*, 22(3), 171–174. <https://doi.org/10.4265/bio.22.171>

Eira, A., Kaneno, R., Filho, E., Barbisan, L. F., Pascholati, S., Piero, R., Salvadori, D., Lima, P., & Ribeiro, L. (2005). Farming Technology, Biochemistry Characterization, and Protective Effects of Culinary–Medicinal Mushrooms *Agaricus brasiliensis* S.Wasser et al. and *Lentinus edodes* (Berk.) Singer: Five Years of Research in Brazil. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7, 281–299. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v7.i12.260>

Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>

Ellertsen, L. K., & Hetland, G. (2009). An extract of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill can protect against allergy. *Clinical and Molecular Allergy: CMA*, 7, 6. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-7-6>

Ericsson, D. C. B., & Ivonne, J. N. R. (2009). Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), 193–196. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9301-6>

Espinel-Ingroff, A. (2001). Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1360–1367. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1360-1367.2001>

Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139–8144. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>

Faccin, L. C., Benati, F., Rincão, V. P., Mantovani, M. S., Soares, S. A., Gonzaga, M. L., Nozawa, C., & Carvalho Linhares, R. E. (2007). Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of an isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1), 24–28. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02153.x>

Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A., & Ricardo Soccol, C. (2007). Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT - Food Science and Technology*, 40(1), 30–35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.006>

Fan, Q.-Y., Yin, X., Li, Z.-H., Li, Y., Liu, J.-K., Feng, T., & Zhao, B.-H. (2014). Mycophenolic acid derivatives from cultures of the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(9), 685–688. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60104-7](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60104-7)

Farrell, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M., & Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2–3), 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.005>

- Farzana, T., & Mohajan, S. (2015). Effect of incorporation of soy flour to wheat flour on nutritional and sensory quality of biscuits fortified with mushroom. *Food Science & Nutrition*, 3(5), 363–369. <https://doi.org/10.1002/fsn3.228>
- Fathi, M., Donsi, F., & McClements, D. J. (2018). Protein-Based Delivery Systems for the Nanoencapsulation of Food Ingredients. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 920–936. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12360>
- Faustino, M., Veiga, M., Sousa, P., Costa, E. M., Silva, S., & Pintado, M. (2019). Agro-Food Byproducts as a New Source of Natural Food Additives. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061056>
- Ferraro, V., Madureira, A. R., Sarmento, B., Gomes, A., & Pintado, M. E. (2015). Study of the interactions between rosmarinic acid and bovine milk whey protein α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and Lactoferrin. *Food Research International*, 77, 450–459. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.024>
- Fidler, G., Popa, G., Butu, A., Rodino, S., & Cornea, C. P. (2013). IN VITRO CULTIVATION OF LAETIPORUS SULPHUREUS AND EVALUATION OF ITS ANTIMICROBIAL PROPERTIES. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, XVII, 11–15.
- Firenzuoli, F., Gori, L., & Lombardo, G. (2008). The Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murrill: Review of Literature and Pharmaco-Toxicological Problems. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 5(1), 3–15. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem007>
- Fling, S. P., & Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry*, 155(1), 83–88. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90228-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90228-9)
- Francisco, C. R. L., Heleno, S. A., Fernandes, I. P. M., Barreira, J. C. M., Calhelha, R. C., Barros, L., Gonçalves, O. H., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2018). Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food Chemistry*, 245, 845–853. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.098>
- Friedman, M. (2015). Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3805–3822. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00778>
- Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Oshiman, K., Kobori, H., Moriguchi, K., Nakashima, H., Matumoto, Y., Takahara, S., Ebina, T., & Katakura, R. (1998). Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 46(3), 147–159. <https://doi.org/10.1007/s002620050473>
- Gad, A. S., & El-Salam, M. H. A. B. D. (2010). The antioxidant properties of skim milk supplemented with rosemary and green tea extracts in response to pasteurisation, homogenisation and the addition of salts. *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 349–355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00585.x>
- Gallier, S., Tolenaars, L., & Prosser, C. (2020). Whole Goat Milk as a Source of Fat and Milk Fat Globule Membrane in Infant Formula. *Nutrients*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/nu12113486>
- Gallo, M., Vinci, G., Graziani, G., De Simone, C., & Ferranti, P. (2013). The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic techniques. *Food Research International*, 54(1), 406–415. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.011>

- Gamboa, J., Soria, A., Corzo-Martínez, M., Montilla, A., & Villamiel, M. (2012). Effect of storage on quality of industrially dehydrated onion, garlic, potato and carrot. *Journal of Food and Nutrition Research*, *51*, 132–144.
- Gan, C. H., Amira, B., & Asmah, R. (2013). Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis*). *International Food Research Journal*, *20*, 1095–1102.
- Gao, L., Sun, Y., Chen, C., Xi, Y., Wang, J., & Wang, Z. (2007). Primary mechanism of apoptosis induction in a leukemia cell line by fraction FA-2-b-ss prepared from the mushroom *Agaricus blazei* Murill. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas*, *40*(11), 1545–1555. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007001100015>
- Garcia, C., Faria, C. M. D. R., Stutz Dalla Santa, H., Vasconcelos Botelho, R., & Maia, A. J. (2018). Antimicrobial activity of *Agaricus brasiliensis* on *Plasmopara viticola* and its effect on the induction of resistance to the control of downy mildew on 'Isabel Precoce.' *Arquivos Do Instituto Biológico*.
- García, V., Rovira, S., Boutoial, K., & López, M. B. (2014). Improvements in goat milk quality: A review. *Small Ruminant Research*, *121*(1), 51–57. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.12.034>
- Gašić, U., Natić, M., Mišić, D., Vukic Lusic, D., Milojković-Opsenica, D., Tesic, Z., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, *44*, 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.08.008>
- Geösel, A., Sipos, L., Stefanovits-Bányai, É., Kókai, Z., & Györfi, J. (2011). Antioxidant, polyphenol and sensory analysis of *Agaricus bisporus* and *Agaricus subrufescens* cultivars. *Acta Alimentaria*, *40*, 33–40. <https://doi.org/10.1556/aalim.40.2011.suppl.4>
- Ghasemi, E., Raofie, F., & Najafi, N. M. (2011). Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, *126*(3), 1449–1453. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.135>
- Ghasemi, S., & Abbasi, S. (2014). Formation of natural casein micelle nanocapsule by means of pH changes and ultrasound. *Food Hydrocolloids*, *42*, 42–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.028>
- Ghayour, N., Hosseini, S. M. H., Eskandari, M. H., Esteghlal, S., Nekoei, A.-R., Hashemi Gahruie, H., Tatar, M., & Naghibalhossaini, F. (2019). Nanoencapsulation of quercetin and curcumin in casein-based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, *87*, 394–403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.031>
- Ghorai, S., Banik, S. P., Verma, D., Chowdhury, S., Mukherjee, S., & Khowala, S. (2011). Fungal Biotechnology in Food and Feed Processing. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 603–615). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00543-2>
- Giavasis, I. (2014). Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, *26*, 162–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.010>
- Gong, H., Gao, J., Wang, Y., Luo, Q. W., Guo, K. R., Ren, F. Z., & Mao, X. Y. (2020). Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells. *Journal of Dairy Science*, *103*(6), 4907–4918. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2019-17513>

Gonzaga, M., Campelo, M., Saraiva, K., Santos, A., Leal, L., Ricardo, N., Soares, S., & Ribeiro, M. E. (2020). Chitosan and *Agaricus brasiliensis* Polysaccharides Films: A Preliminary Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 31, 990–998. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190264>

Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M. F., de Souza, J. R. R., Ricardo, N. M. P. S., & Soares, S. de A. (2013). Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.005>

Gonzaga, M. L. C., Ricardo, N. M. P. S., Heatley, F., & Soares, S. de A. (2005). Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. *Carbohydrate Polymers*, 60(1), 43–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.11.022>

González-Díaz, C., Gil-González, D., & Álvarez-Dardet, C. (2018). Scientific Evidence on Functional Food and Its Commercial Communication: A Review of Legislation in Europe and the USA. *Journal of Food Science*, 83(11), 2710–2717. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14359>

González-Morelo, K. J., Vega-Sagardía, M., & Garrido, D. (2020). Molecular Insights Into O-Linked Glycan Utilization by Gut Microbes. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.591568>

González, A., Cruz, M., Losoya, C., Nobre, C., Loredó, A., Rodríguez, R., Contreras, J., & Belmares, R. (2020). Edible mushrooms as a novel protein source for functional foods. *Food Funct.*, 11(9), 7400–7414. <https://doi.org/10.1039/D0FO01746A>

Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., Stojanovska, L., & Vasiljevic, T. (2017). Fourier transform infrared spectroscopy analysis of physicochemical changes in UHT milk during accelerated storage. *International Dairy Journal*, 66, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.11.014>

Grewal, M. K., Chandrapala, J., Donkor, O., Apostolopoulos, V., & Vasiljevic, T. (2017). Predicting sediment formation in ultra high temperature-treated whole and skim milk using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 74, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.01.004>

Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., & Rollinger, J. M. (2014). European medicinal polypores – A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 564–583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.030>

Guerrero, P., Kerry, J. P., & de la Caba, K. (2014). FTIR characterization of protein–polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.005>

Guha, S., Sharma, H., Deshwal, G. K., & Rao, P. S. (2021). A comprehensive review on bioactive peptides derived from milk and milk products of minor dairy species. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00045-7>

Gülçin, I. (2005). The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56(7), 491–499. <https://doi.org/10.1080/09637480500450248>

Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>

Gultekin, F., Oner, M. E., Savas, H. B., & Dogan, B. (2020). Food additives and microbiota. *Northern Clinics of Istanbul*, 7(2), 192–200. <https://doi.org/10.14744/nci.2019.92499>

Gupta, S., Summuna, B., Gupta, M., & Annapu, S. K. (2018). Edible Mushrooms: Cultivation, Bioactive Molecules, and Health Benefits. In J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1–33). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_86-1

Györfi, J., Geösel, A., & Vetter, J. (2010). Mineral composition of different strains of edible medicinal mushroom *Agaricus subrufescens* Peck. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1510–1514. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0244>

Habtegebriel, H., Edward, D., Wawire, M., Sila, D., & Seifu, E. (2018). Effect of operating parameters on the surface and physico-chemical properties of spray-dried camel milk powders. *Food and Bioprocess Processing*, 112, 137–149. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.09.010>

Haham, M., Ish-Shalom, S., Nodelman, M., Duek, I., Segal, E., Kustanovich, M., & Livney, Y. D. (2012). Stability and bioavailability of vitamin D nanoencapsulated in casein micelles. *Food & Function*, 3(7), 737–744. <https://doi.org/10.1039/c2fo10249h>

Halim, N. A. A., Abidin, Z. Z., Siajam, S. I., Hean, C. G., & Harun, M. R. (2020). Screening of factors influencing the yield of *Citrus hystrix* leaves essential oil extracted via pressurized hot water extraction based on resolution V fractional factorial design. *Journal of Food Process Engineering*, 43(11), e13531. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfpe.13531>

Halvorsen, B. L., Carlsen, M. H., Phillips, K. M., Bøhn, S. K., Holte, K., Jacobs, D. R. J., & Blomhoff, R. (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 95–135. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.95>

Hamid, & Thakur, A. (2021). Role of functional food components in COVID-19 pandemic: A review. *Annals of Phytomedicine-an International Journal*, 10.

Hammam, A. R. A., Salman, S. M. Y., Elfaruk, M. S., & Alsaleem, K. A. (2021). Goat Milk: Compositional, Technological, Nutritional, and Therapeutic Aspects. *Asian Journal of Dairy and Food Research*.

Han, B., & Hoang, B. X. (2020). Opinions on the current pandemic of COVID-19: Use functional food to boost our immune functions. *Journal of Infection and Public Health*, 13(12), 1811–1817. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.08.014>

Hänel, H., & Raether, W. (1988). A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*, 31(3), 148–154. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1988.tb03718.x>

Haque, M. K., & Roos, Y. H. (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 62–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.12.004>

Haratifar, S., & Corredig, M. (2014). Interactions between tea catechins and casein micelles and their impact on renneting functionality. *Food Chemistry*, 143, 27–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.092>

Haratifar, S., & Guri, A. (2017). *5 - Nanocapsule formation by caseins* (S. M. B. T.-N. T. for the F. and N. I. Jafari (ed.); pp. 140–164). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00005-7>

Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 126(2), 630–639.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.087>

Hassan, K., Matio Kemkuignou, B., & Stadler, M. (2021). Two New Triterpenes from Basidiomata of the Medicinal and Edible Mushroom, *Laetiporus sulphureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237090>

He, J.-B., Tao, J., Miao, X.-S., Bu, W., Zhang, S., Dong, Z.-J., Li, Z.-H., Feng, T., & Liu, J.-K. (2015). Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Laetiporus sulphureus*. *Fitoterapia*, 102, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.01.022>

He, J.-B., Tao, J., Miao, X.-S., Feng, Y.-P., Bu, W., Dong, Z.-J., Li, Z.-H., Feng, T., & Liu, J.-K. (2015). Two new illudin type sesquiterpenoids from cultures of *Phellinus tuberculatus* and *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17(11), 1054–1058. <https://doi.org/10.1080/10286020.2015.1040774>

Henriques, G. S., Helm, C. V., Busato, A. P., & Simeone, M. L. F. (2016). Lipid profile and glycemic response of rats fed on a semi-purified diet supplemented with *Agaricus brasiliensis* mushroom. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, 38(1), 71–79. <https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v38i1.29185>

Hetland, G., Johnson, E., Lyberg, T., Bernardshaw, S., Tryggestad, A. M. A., & Grinde, B. (2008). Effects of the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill on immunity, infection and cancer. *Scandinavian Journal of Immunology*, 68(4), 363–370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02156.x>

Hodek, O., Křížek, T., Coufal, P., & Ryšlavá, H. (2017). Design of experiments for amino acid extraction from tobacco leaves and their subsequent determination by capillary zone electrophoresis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(9), 2383–2391. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0184-2>

Hodgkinson, A. J., Wallace, O. A. M., Boggs, I., Broadhurst, M., & Prosser, C. G. (2018). Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child in vitro digestion conditions. *Food Chemistry*, 245, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.028>

Hojjati, M., & Beirami-Serizkani, F. (2020). Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel water soluble polysaccharide from *Cordia myxa* fruits. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3417–3425. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00586-y>

Holland, J. W., & Boland, M. J. (2014). Chapter 5 - Post-translational Modifications of Caseins. In H. Singh, M. Boland, & A. B. T.-M. P. (Second E. Thompson (Eds.), *Food Science and Technology* (pp. 141–168). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00005-2>

Holt, C., Carver, J. A., Ecroyd, H., & Thorn, D. C. (2013). Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods1. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6127–6146. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>

Holt, C., de Kruif, C. G., Tuinier, R., & Timmins, P. A. (2003). Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 213(2), 275–284. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00520-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00520-4)

Hong, M.-R., Kim, Y.-S., Joo, A.-R., Lee, J.-K., Kim, Y.-S., & Oh, D.-K. (2009). Purification and characterization of a thermostable beta-1,3-1,4-glucanase from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(8), 818–822.

Horne, D. S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2), 148–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>

Horne, D. S. (2020). *Chapter 6 - Casein micelle structure and stability* (M. Boland & H. B. T.-M. P. (Third E. Singh (eds.); pp. 213–250). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00006-2>

Hovjecki, M., Miloradovic, Z., Rac, V., Pudja, P., & Miocinovic, J. (2020). Influence of heat treatment of goat milk on casein micelle size, rheological and textural properties of acid gels and set type yoghurts. *Journal of Texture Studies*, 51(4), 680–687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jtxs.12524>

Hozova, B., Kuniak, E., & Kelemenova, B. (2004). Application of beta-D-glucans isolated from mushrooms *Pleurotus ostreatus* (Pleuron) and *Lentinus edodes* (Lentinan) for increasing the bioactivity of yoghurts. *Czech Journal of Food Sciences*, 22, 204–214. <https://doi.org/10.17221/3425-CJFS>

Hu, J., Zhao, T., Li, S., Wang, Z., Wen, C., Wang, H., Yu, C., & Ji, C. (2019). Stability, microstructure, and digestibility of whey protein isolate – *Tremella fuciformis* polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids*, 89, 379–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.005>

Hu, Z., Yao, Y., Lv, M., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Y., & Yue, T. (2021). Isolation and identification of three water-soluble selenoproteins in Se-enriched *Agaricus blazei* Murrill. *Food Chemistry*, 344, 128691. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128691>

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Huang, S.-J., & Mau, J.-L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agaricus blazei* with various doses of γ -irradiation. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), 707–716. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.06.001>

Huppertz, T. (2010). Foaming properties of milk: A review of the influence of composition and processing. *International Journal of Dairy Technology*, 63(4), 477–488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00629.x>

Hwang, H. S., Lee, S. H., Baek, Y. M., Kim, S. W., Jeong, Y. K., & Yun, J. W. (2008). Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), 419–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1329-6>

Hwang, H. S., & Yun, J. W. (2010). Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 173–181. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0160-6>

Iglesias-Figueroa, B. F., Espinoza-Sánchez, E. A., Siqueiros-Cendón, T. S., & Rascón-Cruz, Q. (2019). Lactoferrin as a nutraceutical protein from milk, an overview. *International Dairy Journal*, 89, 37–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.09.004>

Ishara, J., Sila, D., Kenji, G., & Buzera, A. (2018). Nutritional and Functional Properties of Mushroom (*Agaricus bisporus* & *Pleurotus ostreatus*) and Their Blends with Maize Flour. *American Journal of Food Science and Technology*, 6, 33–41. <https://doi.org/10.12691/ajfst-6-1-6>

Ishii, P. L., Prado, C. K., Mauro, M. de O., Carreira, C. M., Mantovani, M. S., Ribeiro, L. R., Dichi, J. B., & Oliveira, R. J. (2011). Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic,

anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP*, 59(3), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.01.004>

Iskandar, M. M., Lands, L. C., Sabally, K., Azadi, B., Meehan, B., Mawji, N., Skinner, C. D., & Kubow, S. (2015). High Hydrostatic Pressure Pretreatment of Whey Protein Isolates Improves Their Digestibility and Antioxidant Capacity. *Foods (Basel, Switzerland)*, 4(2), 184–207. <https://doi.org/10.3390/foods4020184>

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.013>

Jansen, T., Claassen, L., van Kamp, I., & Timmermans, D. R. M. (2020). ‘All chemical substances are harmful.’ public appraisal of uncertain risks of food additives and contaminants. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 110959. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110959>

Jeong, S.-E., Park, J.-K., Kim, J.-D., Chang, I.-J., Hong, S.-J., Kang, S.-H., & Lee, C.-G. (2008). Statistical optimization of the growth factors for *Chaetoceros neogracile* using fractional factorial design and central composite design. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(12), 1919–1926.

Jia, J., Gao, X., Hao, M., & Tang, L. (2017). Comparison of binding interaction between β -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods. *Food Chemistry*, 228, 143–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.131>

Jia, S., Li, F., Liu, Y., Ren, H., Gong, G., Wang, Y., & Wu, S. (2013). Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62, 66–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.031>

Jumes, F. M. D., Lugarini, D., Pereira, A. L. B., de Oliveira, A., Christoff, A. de O., Linde, G. A., do Valle, J. S., Colauto, N. B., & Acco, A. (2010). Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(1), 21–27. <https://doi.org/10.1139/Y09-111>

Jung, D. Y., Lee, H. J., Shin, D.-J., Kim, C. H., & Jo, C. (2022). Mechanism of improving emulsion stability of emulsion-type sausage with oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder as a phosphate replacement. *Meat Science*, 194, 108993. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108993>

Kalkan, O., Topkafa, M., & Kara, H. (2021). Determination of effect of some parameters on formation of 2-monochloropropanediol, 3-monochloropropanediol and glycidyl esters in the frying process with sunflower oil, by using central composite design. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103681. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103681>

Kalsoon, K., Hamayun, M., Aaqil Khan, M., Park, Y.-S., Kim, I.-D., Shin, D.-H., & Iqbal, A. (2021). Physicochemical Properties and Antioxidant Potential of Tateishi Kazu Vegetable Soup. *Journal of Food Quality*, v. 2021, 2021 v.2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8194219>

Kalyan, S., Meena, S., Kapila, S., Sowmya, K., & Kumar, R. (2018). Evaluation of goat milk fat and goat milk casein fraction for anti-hypercholesterolaemic and antioxidative properties in hypercholesterolaemic rats. *International Dairy Journal*, 84, 23–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.03.012>

Kamankesh, M., Nematollahi, A., Mohammadi, A., & Ferdowsi, R. (2021). Investigation of Composition, Temperature, and Heating Time in the Formation of Acrylamide in Snack: Central Composite Design Optimization and Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass

Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 14(1), 44–53. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01849-6>

Kamigaki, T. (2020). Microstructural Observation of Dairy Products Using High-pressure Freezing in Combination with Cryo-scanning Electron Microscopy. *Food Science and Technology Research*, 26(6), 743–747. <https://doi.org/10.3136/fstr.26.743>

Kang, C. Y., Lee, C. O., Chung, K. S., Choi, E. C., & Kim, B. K. (1982). An antitumor component of *Laetiporus sulphureus* and its immunostimulating activity. *Archives of Pharmacal Research*, 5(2), 39–43. <https://doi.org/10.1007/BF02856406>

Karaman, M., Jovin, E., Malbasa, R., Matavuly, M., & Popović, M. (2010). Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research : PTR*, 24(10), 1473–1481. <https://doi.org/10.1002/ptr.2969>

Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., & Nakamura, T. (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, 186(2), 267–273. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(89\)84040-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84040-6)

Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., Hagiwara, T., & Nakamura, T. (1990). Formolysis of a potent antitumor (1 → 6)- β -d-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, 12(4), 393–403. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-8617\(90\)90089-B](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0144-8617(90)90089-B)

Kawagishi, Hirokazu, Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T., & Nakamura, T. (1988). Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 27(9), 2777–2779. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80662-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80662-9)

Ker, Y.-B., Chen, K.-C., Chyau, C.-C., Chen, C.-C., Guo, J.-H., Hsieh, C.-L., Wang, H.-E., Peng, C.-C., Chang, C.-H., & Peng, R. Y. (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* mycelia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7052–7058. <https://doi.org/10.1021/jf0510034>

Kerrigan, R. W. (2005). *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, 97(1), 12–24. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.12>

Khalesi, M., & FitzGerald, R. J. (2022). Impact of total calcium in milk protein concentrate on its interaction with the aqueous phase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 635, 128068. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.128068>

Khalilov, Q., Numonov, S., Sukhrovov, P., Bobakulov, K., Sharopov, F., Habasi, M., Zhao, J., Yuan, T., & Aisa, H. A. (2022). New Triterpenoids from the Fruiting Bodies of *Laetiporus sulphureus* and Their Anti-Inflammatory Activity. *ACS Omega*, 7(31), 27272–27277. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c02165>

Khan, A. A., Gani, A., Khanday, F. A., & Masoodi, F. A. (2018). Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2017.12.002>

Khan, I. T., Bule, M., Ullah, R., Nadeem, M., Asif, S., & Niaz, K. (2019). The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food. *Veterinary World*, 12(1), 12–33. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.12-33>

Khatua, S., Ghosh, S., & Acharya, K. (2017). *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. as Food as Medicine. *Pharmacognosy Journal*, 9, s1–s15. <https://doi.org/10.5530/pj.2017.6s.151>

- Khider, M., Seoudi, O., & Abdelaliem, Y. F. (2017). Functional Processed Cheese Spreads with High Nutritional Value as Supplemented with Fresh and Dried Mushrooms. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 6(1), 45. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20170601.18>
- Kim, C.-F., Jiang, J.-J., Leung, K.-N., Fung, K.-P., & Lau, C. B.-S. (2009). Inhibitory effects of *Agaricus blazei* extracts on human myeloid leukemia cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.12.025>
- Kim, G.-Y., Lee, M.-Y., Lee, H.-J., Moon, D.-O., Lee, C.-M., Jin, C.-Y., Choi, Y. H., Jeong, Y.-K., Chung, K. T., Lee, J.-Y., Choi, I.-H., & Park, Y.-M. (2005). Effect of water-soluble proteoglycan isolated from *Agaricus blazei* on the maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology*, 5(10), 1523–1532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.02.018>
- Kim, Y.-E., Kim, J. W., Cheon, S., Nam, M. S., & Kim, K. K. (2019). Alpha-Casein and Beta-Lactoglobulin from Cow Milk Exhibit Antioxidant Activity: A Plausible Link to Antiaging Effects. *Journal of Food Science*, 84(11), 3083–3090. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14812>
- Kim, Y.-W., Kim, K.-H., Choi, H.-J., & Lee, D.-S. (2005). Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnology Letters*, 27(7), 483–487. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-2225-8>
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Stefanoska, I., & Van Griensven, L. J. L. D. (2013). The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(5), 599–610. <https://doi.org/10.3109/09637486.2012.759190>
- Kobayashi, H., & Kim, H. (2003). Characterization of Aspartic Proteinase from Basidiomycete, *Laetiporus sulphureus*. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 30–34. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.30>
- Kolundzic, M., Grozdanić, N., Stanojkovic, T., Milenkovic, M., Dinic, M., Golić, N., Kojic, M., & Kundaković, T. (2016). Antimicrobial and cytotoxic activities of the sulphur shelf medicinal mushroom *laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes) from Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18, 469–476. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i6.10>
- Komes, D., Bušić, A., Belščak-Cvitanović, A., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Vojvodić, A., & Dujmić, F. (2017). Novel Approach to the Development of Functional Goat's Milk-Based Beverages Using Medicinal Plant Extracts in Combination with High Intensity Ultrasound Treatment. *Food Technology and Biotechnology*, 55(4), 484–495. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5123>
- Komura, D. L., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Baggio, C. H., Freitas, C. S., Marcon, R., Santos, A. R. S., Gorin, P. A. J., & Iacomini, M. (2010). Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties. *Bioresource Technology*, 101(15), 6192–6199. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.142>
- Konska, G., Guillot, J., Dusser, M., Damez, M., & Botton, B. (1994). Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. *Journal of Biochemistry*, 116(3), 519–523. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124555>
- Kostić, A. Ž., Milinčić, D. D., Stanisavljević, N. S., Gašić, U. M., Lević, S., Kojić, M. O., Lj. Tešić, Ž., Nedović, V., Barać, M. B., & Pešić, M. B. (2021). Polyphenol bioaccessibility and antioxidant properties of in vitro digested spray-dried thermally-treated skimmed goat milk enriched with pollen. *Food Chemistry*, 351, 129310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129310>

Kovács, D., & Vetter, J. (2015). Chemical composition of the mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill. *Acta Alimentaria*, 44(1), 104–110. <https://doi.org/10.1556/aalim.44.2015.1.10>

Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Niksic, M., Vrvic, M. M., & van Griensven, L. J. L. D. (2014). Dietary polysaccharide extracts of *Agaricus brasiliensis* fruiting bodies: chemical characterization and bioactivities at different levels of purification. *Food Research International*, 64, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.075>

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. F. G., & Van Griensven, L. J. L. D. (2011). Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, 129(4), 1667–1675. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.029>

Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., & Van Griensven, L. J. L. D. (2012). Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26(1), 144–153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>

Krings, U., Grimrath, A., Schindler, S., & Berger, R. G. (2011). Volatiles responsible for the seasoning-like flavour of cell cultures of *Laetiporus sulphureus*. *Flavour and Fragrance Journal*, 26(3), 174–179. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ffj.2040>

Kumar, N., Singh, A., Sharma, D. K., & Kishore, K. (2019). *Chapter 3 - Toxicity of Food Additives* (R. L. Singh & S. B. T.-F. S. and H. H. Mondal (eds.); pp. 67–98). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00003-5>

Laetiporus sulphureus, преузето 14.05.2024. са <https://www.inaturalist.org/taxa/53713-Laetiporus-sulphureus>

Lamothe, S., Guérette, C., Dion, F., Sabik, H., & Britten, M. (2019). Antioxidant activity of milk and polyphenol-rich beverages during simulated gastrointestinal digestion of linseed oil emulsions. *Food Research International*, 122, 149–156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.068>

Lara-Castellanos, M. J., Azuara, E., Jimenez-Fernandez, V. M., Luna-Solano, G., & Jimenez, M. (2021). Effect of casein replacement by modified casein on physicochemical, textural, sensorial properties and microbiological stability of fresh cheese. *International Dairy Journal*, 112, 104864. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104864>

Largeteau, M. L., Llarena-Hernández, R. C., Regnault-Roger, C., & Savoie, J.-M. (2011). The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 897–907. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3630-7>

Lavitschka, R., Oliveira, C., Mascara, D., Faria, P., Bincoletto, C., & Esposito, E. (2007). In vitro cytotoxicity and antioxidant activity of *Agaricus subrufescens* extracts. *African Journal of Biotechnology* (ISSN: 1684-5315) Vol 6 Num 9, 6.

Lazli, W., & Hellal, A. (2020). Biosorption of phenol by modified dead leaves of *Posidonia oceanica* immobilized in calcium alginate beads: Optimal experimental parameters using central composite design. *Water SA*, 46. <https://doi.org/10.17159//wsa/2020.v46.i2.8248>

Lee, J.-W., Park, J.-Y., Kwon, M., & Choi, I.-G. (2009). Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(1), 33–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.09.006>

- Lee, Y.-T., & Kim, Y.-S. (2005). Water-solubility of β -Glucans in Various Edible Mushrooms - Research Note -. *Preventive Nutrition and Food Science*, 10. <https://doi.org/10.3746/jfn.2005.10.3.294>
- Li, X. Y., Cheng, M., Li, J., Zhao, X., Qin, Y. S., Chen, D., Wang, J. M., & Wang, C. F. (2020). Change in the structural and functional properties of goat milk protein due to pH and heat. *Journal of Dairy Science*, 103(2), 1337–1351. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16862>
- Li, Y., Sheng, Y., Lu, X., Guo, X., Xu, G., Han, X., An, L., & Du, P. (2020). Isolation and purification of acidic polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and evaluation of their lipid-lowering mechanism. *International Journal of Biological Macromolecules*, 157, 276–287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.190>
- Lima, Cristiane U J O, Gris, E. F., & Karnikowski, M. G. O. (2016). Antimicrobial properties of the mushroom *Agaricus blazei* – integrative review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(6), 780–786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.013>
- Lima, Cristiane Urcina Joanna Oliveira, Cordova, C. O. de A., Nóbrega, O. de T., Funghetto, S. S., & Karnikowski, M. G. de O. (2011). Does the *Agaricus blazei* Murill mushroom have properties that affect the immune system? An integrative review. *Journal of Medicinal Food*, 14(1–2), 2–8. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0017>
- Lima, L. F. O., Habu, S., Gern, J. C., Nascimento, B. M., Parada, J.-L., Nosedá, M. D., Gonçalves, A. G., Nisha, V. R., Pandey, A., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2008). Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2–3), 283–294. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8187-2>
- Lin, J.-H., & Yang, S.-S. (2006). Mycelium and polysaccharide production of *Agaricus blazei* Murrill by submerged fermentation. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 39(2), 98–108.
- Lisiecka, J., Sobieralski, K., Siwulski, M., & Jasińska, A. (2013). Almond mushroom *Agaricus Brasiliensis* (Wasser et al.) - properties and culture conditions. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus = Ogródnictwo*, 12, 27–40.
- Liu, D. Z., Dunstan, D. E., & Martin, G. J. O. (2012). Evaporative concentration of skimmed milk: Effect on casein micelle hydration, composition, and size. *Food Chemistry*, 134(3), 1446–1452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.053>
- Liu, G.-Q., & Wang, X.-L. (2007). Optimization of critical medium components using response surface methodology for biomass and extracellular polysaccharide production by *Agaricus blazei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 78–83. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0661-6>
- Liu, J., Miao, S., Wen, X., & Sun, Y. (2009). Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill using response surface methodology (RSM). *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 704–709. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.003>
- Liu, J., Zhang, C., Wang, Y., Yu, H., Liu, H., Wang, L., Yang, X., Liu, Z., Wen, X., Sun, Y., Yu, C., & Liu, L. (2011). Structural elucidation of a heteroglycan from the fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4), 716–720. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.07.003>
- Liu, X., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., & Le Bourvellec, C. (2021). Revisiting the contribution of ATR-FTIR spectroscopy to characterize plant cell wall polysaccharides. *Carbohydrate*

Polymers, 262, 117935. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117935>

Liu, Yan, & Guo, R. (2008). pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 136(2), 67–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpc.2008.03.012>

Liu, Yuntao, Duan, X., Zhang, M., Li, C., Zhang, Z., Liu, A., Hu, B., He, J., Wu, D., Chen, H., & Wu, W. (2020). Cooking methods effect on the nutrients, bioaccessibility and antioxidant activity of *Craterellus cornucopioides*. *LWT*, 131, 109768. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109768>

Lo, T. C.-T., Chang, C. A., Chiu, K.-H., Tsay, P.-K., & Jen, J.-F. (2011). Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers*, 86(1), 320–327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.04.056>

López-Varela, S., González-Gross, M., & Marcos, A. (2002). Functional foods and the immune system: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 Suppl 3, S29-33. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601481>

Lovy, A., Knowles, B., Labbe, R., & Nolan, L. (2000). Activity of Edible Mushrooms Against the Growth of Human T4 Leukemic Cancer Cells, HeLa Cervical Cancer Cells, and Plasmodium falciparum. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 6(4), 49–57. https://doi.org/10.1300/J044v06n04_06

Lu, X., Brennan, M. A., Narciso, J., Guan, W., Zhang, J., Yuan, L., Serventi, L., & Brennan, C. S. (2020). Correlations between the phenolic and fibre composition of mushrooms and the glycaemic and textural characteristics of mushroom enriched extruded products. *LWT*, 118, 108730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108730>

Lu, X., Brennan, M. A., Serventi, L., Liu, J., Guan, W., & Brennan, C. S. (2018). Addition of mushroom powder to pasta enhances the antioxidant content and modulates the predictive glycaemic response of pasta. *Food Chemistry*, 264, 199–209. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.130>

Luangharn, T., Karunarathna, S. C., Hyde, K. D., & Chukeatirote, E. (2014). Optimal conditions of mycelia growth of *Laetiporus sulphureus sensu lato*. *Mycology*, 5(4), 221–227. <https://doi.org/10.1080/21501203.2014.957361>

Lučić, M. (2022). *Uticaj ultrazvučnog i toplotnog predtretmana na tehnološka i funkcionalna svojstva sušene konzumne i začinske paprike*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet.

Lung, M.-Y., & Huang, W.-Z. (2012). Antioxidant properties of polysaccharides from *Laetiporus sulphureus* in submerged cultures. *African Journal of Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1668>

Luo, J., Wang, Z. W., Wang, F., Zhang, H., Lu, J., Guo, H. Y., & Ren, F. Z. (2014). Cryo-SEM images of native milk fat globule indicate small casein micelles are constituents of the membrane. *RSC Adv.*, 4(90), 48963–48966. <https://doi.org/10.1039/C4RA06171C>

Lysakowska, P., Sobota, A., & Wirkijowska, A. (2023). Medicinal Mushrooms: Their Bioactive Components, Nutritional Value and Application in Functional Food Production—A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(14). <https://doi.org/10.3390/molecules28145393>

Ma, G., Yang, W., Zhao, L., Pei, F., Fang, D., & Hu, Q. (2018). A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Science and Human Wellness*, 7(2), 125–133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.05.002>

Maćej, O., Jovanović, S., Barać, M. (2007): Proteini mleka. Monografija. Poljoprivredni fakultet, Beograd

Madoumier, M., Trystram, G., Sébastien, P., & Collignan, A. (2019). Towards a holistic approach for multi-objective optimization of food processes: A critical review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.002>

Mahdi, C., Padaga, M., & J. Raharjo, S. (2018). The characterization of bioactive peptides of goat milk fermented to activities as anti-hypercholerolemia. *International Food Research Journal*, 25.

Mąka, Ł., & Popowska, M. (2016). Antimicrobial resistance of Salmonella spp. isolated from food. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 67(4), 343–358.

Mancheño, J. M., Tatenó, H., Sher, D., & Goldstein, I. J. (2010). Laetiporus sulphureus lectin and aerolysin protein family. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 677, 67–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6327-7_6

Mang, D. Y., Abdou, A. B., Njintang, N. Y., Djiogue, E. J. M., Loura, B. B., & Mbofung, M. C. (2015). Application of desirability-function and RSM to optimize antioxidant properties of mucuna milk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 9(4), 495–507. <https://doi.org/10.1007/s11694-015-9258-z>

Marchetti, L., Andrés, S. C., & Califano, A. N. (2014). Low-fat meat sausages with fish oil: Optimization of milk proteins and carrageenan contents using response surface methodology. *Meat Science*, 96(3), 1297–1303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.11.004>

Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K., & Vasiljevic, T. (2019a). Structural changes of milk proteins during heating of concentrated skim milk determined using FTIR. *International Dairy Journal*, 89, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.08.010>

Markoska, T., Huppertz, T., Grewal, M. K., & Vasiljevic, T. (2019b). FTIR analysis of physicochemical changes in raw skim milk upon concentration. *LWT*, 102, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.011>

Martin, A. H., Douglas Goff, H., Smith, A., & Dalgleish, D. G. (2006). Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). *Food Hydrocolloids*, 20(6), 817–824. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.08.004>

Martínez-Padilla, L. P., García-Mena, V., Casas-Alencáster, N. B., & Sosa-Herrera, M. G. (2014). Foaming properties of skim milk powder fortified with milk proteins. *International Dairy Journal*, 36(1), 21–28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.011>

Martínez-Tomé, M., Murcia, M. A., Mariscal, M., Lorenzo, M. L., Gómez-Murcia, V., Bibiloni, M., & Jiménez-Monreal, A. M. (2015). Evaluation of antioxidant activity and nutritional composition of flavoured dehydrated soups packaged in different formats. Reducing the sodium content. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7850–7860. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1940-y>

Martinez, M., Torrez Alvarez, S., Campi, M. G., Bravo, J. A., & Vila, J. L. (2015). Ergosterol from the mushroom laetiporus sp.; isolation and structural characterization. *Revista Boliviana de Químico-Mica*, 32, 90–94. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602015000400004&nrm=iso

Martins, P. R., de Campos Soares, Â. M. V., da Silva Pinto Domeneghini, A. V., Golim, M. A., & Kaneno, R. (2017). Agaricus brasiliensis polysaccharides stimulate human monocytes to capture Candida albicans, express toll-like receptors 2 and 4, and produce pro-inflammatory cytokines.

The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 23, 17. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0102-2>

Matsushita, Y., Furutani, Y., Matsuoka, R., & Furukawa, T. (2018). Hot water extract of *Agaricus blazei* Murrill specifically inhibits growth and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2385-4>

Mayakrishnan, V., Abdullah, N., & Hamdi, M. (2013). Investigation of the antioxidative potential of various solvent fractions from fruiting bodies of *Schizophyllum commune* (Fr.) mushrooms and characterization of phytoconstituents. *Journal of Agricultural Science*, 5, 58–68.

Mazzara, E., Scortichini, S., Fiorini, D., Maggi, F., Petrelli, R., Cappellacci, L., Morgese, G., Morshedloo, M. R., Palmieri, G. F., & Cespi, M. (2021). A Design of Experiment (DoE) Approach to Model the Yield and Chemical Composition of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) Essential Oil Obtained by Microwave-Assisted Extraction. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ph14080816>

Mazzutti, S., Ferreira, S. R. S., Riehl, C. A. S., Smania, A., Smania, F. A., & Martínez, J. (2012). Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. *The Journal of Supercritical Fluids*, 70, 48–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.06.010>

McMahon, D J., & Oommen, B. S. (2013). Casein Micelle Structure, Functions, and Interactions. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects, 4th Edition* (pp. 185–209). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_6

McMahon, Donald J., & McManus, W. R. (1998). Rethinking Casein Micelle Structure Using Electron Microscopy1. *Journal of Dairy Science*, 81(11), 2985–2993. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75862-X](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75862-X)

Medeiros, G. K. V. V., Queiroga, R. C. R. E., Costa, W. K. A., Gadelha, C. A. A., e Lacerda, R. R., Lacerda, J. T. J. G., Pinto, L. S., Braganhol, E., Teixeira, F. C., de S. Barbosa, P. P., Campos, M. I. F., Gonçalves, G. F., Pessôa, H. L. F., & Gadelha, T. S. (2018). Proteomic of goat milk whey and its bacteriostatic and antitumour potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 116–123. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.200>

Medouni-Adrar, S., Boulekbache-Makhlouf, L., Cadot, Y., Medouni-Haroune, L., Dahmoune, F., Makhoukhe, A., & Madani, K. (2015). Optimization of the recovery of phenolic compounds from Algerian grape by-products. *Industrial Crops and Products*, 77, 123–132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.039>

Menéndez-Aguirre, O., Stuetz, W., Grune, T., Kessler, A., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2011). High pressure-assisted encapsulation of vitamin D 2 in reassembled casein micelles. *High Pressure Research*, 31(1), 265–274. <https://doi.org/10.1080/08957959.2011.565057>

Menéndez-Aguirre, Orquídea, Kessler, A., Stuetz, W., Grune, T., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2014). Increased loading of vitamin D 2 in reassembled casein micelles with temperature-modulated high pressure treatment. *Food Research International*, 64, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.06.010>

Milinić, D. (2023). *Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet.

Milinić, D. D., Kostić, A. Ž., Gašić, U. M., Lević, S., Stanojević, S. P., Barać, M. B., Tešić, Ž.

- L., Nedović, V., & Pešić, M. B. (2021). Skimmed Goat's Milk Powder Enriched with Grape Pomace Seed Extract: Phenolics and Protein Characterization and Antioxidant Properties. *Biomolecules*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/biom11070965>
- Milinčić, D. D., Popović, D. A., Lević, S. M., Kostić, A. Ž., Tešić, Ž. L., Nedović, V. A., & Pešić, M. B. (2019). Application of Polyphenol-Loaded Nanoparticles in Food Industry. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/nano9111629>
- 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). <https://doi.org/10.3390/antiox11112164>
- Millqvist-Fureby, A., Malmsten, M., & Bergenståhl, B. (1999). Surface characterisation of freeze-dried protein/carbohydrate mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, *191*(2), 103–114. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00285-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00285-9)
- Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J., & Bhandari, B. R. (2010). Rehydration of high-protein-containing dairy powder: Slow- and fast-dissolving components and storage effects. *Dairy Science & Technology*, *90*(2), 335–344. <https://doi.org/10.1051/dst/2010002>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mingyi, Y., Belwal, T., Devkota, H. P., Li, L., & Luo, Z. (2019). Trends of utilizing mushroom polysaccharides (MPs) as potent nutraceutical components in food and medicine: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *92*, 94–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.009>
- Mizuno, M., Minato, K., Ito, H., Kawade, M., Terai, H., & Tsuchida, H. (1999). Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochemistry and Molecular Biology International*, *47*(4), 707–714. <https://doi.org/10.1080/15216549900201773>
- Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K., & Tsuchida, H. (1998). Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *62*(3), 434–437. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.434>
- Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., & Asakura, A. (1990). Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from "Himematsutake," the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural and Biological Chemistry*, *54*(11), 2889–2896. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870406>
- Mlinarić, A., Kac, J., & Pohleven, F. (2005). Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, *55*(1), 69–79.
- Moeller, H., Martin, D., Schrader, K., Hoffmann, W., & Lorenzen, P. C. (2017). Native casein micelles as nanocarriers for β -carotene: pH- and temperature-induced opening of the micellar structure. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(5), 1122–1130. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13387>
- Mohaček-Grošev, V., Božac, R., & Puppels, G. J. (2001). Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *57*(14), 2815–2829. <https://doi.org/10.1016/S1386->

1425(01)00584-4

Mohamed, R. S., Abozed, S. S., El-Damhougy, S., Salama, M. F., & Hussein, M. M. (2020). Efficiency of newly formulated functional instant soup mixtures as dietary supplements for elderly. *Heliyon*, 6(1), e03197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03197>

Mohammadzadeh-Aghdash, H., Sohrabi, Y., Mohammadi, A., Shanehbandi, D., Dehghan, P., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2018). Safety assessment of sodium acetate, sodium diacetate and potassium sorbate food additives. *Food Chemistry*, 257, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.020>

Mokochinski, J. B., López, B. G. C., Sovrani, V., Dalla Santa, H. S., González-Borrero, P. P., Sawaya, A. C. H. F., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., & Torres, Y. R. (2015). Production of *Agaricus brasiliensis* mycelium from food industry residues as a source of antioxidants and essential fatty acids. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(9), 2052–2058. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.12861>

Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>

Moreno-Montoro, M., Jauregi, P., Navarro-Alarcón, M., Olalla-Herrera, M., Giménez-Martínez, R., Amigo, L., & Miralles, B. (2018). Bioaccessible peptides released by in vitro gastrointestinal digestion of fermented goat milks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(15), 3597–3606. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0983-0>

Morgan, F., Jacquet, F., Micault, S., Bonnin, V., & Jaubert, A. (2000). Study on the compositional factors involved in the variable sensitivity of caprine milk to high-temperature processing. *International Dairy Journal*, 10(1), 113–117. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00015-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00015-7)

Mourão, F., Harue Umeo, S., Seiko Takemura, O., Andrea Linde, G., & Barros Colauto, N. (2011). Antioxidant Activity of *Agaricus brasiliensis* Basidiocarps on Different Maturation Phases. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(1), 197–202. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100024>

Mukai, H., Watanabe, T., Ando, M., & Katsumata, N. (2006). An alternative medicine, *Agaricus blazei*, may have induced severe hepatic dysfunction in cancer patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 36(12), 808–810. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyl108>

Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Barba, F. J., Dominguéz, R., Gagaoua, M., & Lorenzo, J. M. (2020). Development of new food and pharmaceutical products: Nutraceuticals and food additives. *Advances in Food and Nutrition Research*, 92, 53–96. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.12.001>

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Naagar, S., & Kanawjia, S. K. (2019). Recent advancements in the functionality of the components from goat milk and its products. *Indian Journal of Dairy Science*, 72, 453–461. <https://doi.org/10.33785/IJDS.2019.v72i05.001>

Nadaroglu, H., & Onem, H. (2019). Formulation and Nutritional Evaluation of A Healthy New Diet Soup Powder Supplemented with Pinar Melkior (*Lactarius piperatus*) Mushroom. *Journal of Applied Biological Sciences*, 12(2 SE-Articles), 19–24. <https://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/414>

- Nakajima, A., Ishida, T., Koga, M., Takeuchi, T., Mazda, O., & Takeuchi, M. (2002). Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *International Immunopharmacology*, 2(8), 1205–1211. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00056-5)
- Nakamura, A., Fujii, N., Tobe, J., Adachi, N., & Hirotsuka, M. (2012). Characterization and functional properties of soybean high-molecular-mass polysaccharide complex. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.018>
- Nakamura, M., Iketani, A., & Shioi, Y. (2011). A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. *Mycoscience*, 52(4), 253–259. <https://doi.org/10.1007/S10267-010-0094-Z>
- Nayik, G., & Nanda, V. (2016). Application of Response Surface Methodology to Study the Combined Effect of Temperature, Time and pH on Antioxidant Activity of Cherry (*Prunus avium*) Honey. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0055>
- Nematollahi, A., Kamankesh, M., Hosseini, H., Hadian, Z., Ghasemi, J., & Mohammadi, A. (2020). Investigation and determination of acrylamide in 24 types of roasted nuts and seeds using microextraction method coupled with gas chromatography–mass spectrometry: central composite design. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1249–1260. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00373-9>
- Ng, Z. X., & Rosman, N. F. (2019). In vitro digestion and domestic cooking improved the total antioxidant activity and carbohydrate-digestive enzymes inhibitory potential of selected edible mushrooms. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 865–877. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3547-6>
- Niego, A. G. T., Lambert, C., Mortimer, P., Thongklang, N., Rapior, S., Grosse, M., Schrey, H., Charria-Girón, E., Walker, A., Hyde, K. D., & Stadler, M. (2023). The contribution of fungi to the global economy. *Fungal Diversity*, 121(1), 95–137. <https://doi.org/10.1007/s13225-023-00520-9>
- Nikonenko, N. A., Buslov, D. K., Sushko, N. I., & Zhbakov, R. G. (2000). Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution. *Biopolymers*, 57(4), 257–262. [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3)
- Nunes, L., & Tavares, G. M. (2019). Thermal treatments and emerging technologies: Impacts on the structure and techno-functional properties of milk proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 90, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.004>
- Ogura, T., & Okada, T. (2017). Nanoscale observation of the natural structure of milk-fat globules and casein micelles in the liquid condition using a scanning electron assisted dielectric microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(4), 1021–1025. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.004>
- Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N. N., Adachi, Y., Motoi, M., & Yadomae, T. (2001). Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(7), 820–828. <https://doi.org/10.1248/bpb.24.820>
- Ohno, S., Sumiyoshi, Y., Hashine, K., Shirato, A., Kyo, S., & Inoue, M. (2011). Phase I Clinical Study of the Dietary Supplement, *Agaricus blazei* Murill, in Cancer Patients in Remission. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2011, 192381. <https://doi.org/10.1155/2011/192381>
- Olawuyi, I. F., & Lee, W. Y. (2019). Quality and antioxidant properties of functional rice muffins

enriched with shiitake mushroom and carrot pomace. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2321–2328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.14155>

Oleennikov, D. N., Agafonova, S. V., Borovskii, G. B., Penzina, T. A., & Rokhin, A. V. (2009a). [Alkali-soluble polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr fruit bodies]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*, 45(6), 693–697.

Oleennikov, D. N., Agafonova, S. V., Borovskii, G. B., Penzina, T. A., & Rokhin, A. V. (2009b). Water-soluble endopolysaccharides from the fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murr. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45(5), 536–543. <https://doi.org/10.1134/S0003683809050147>

Oleennikov, D. N., Agafonova, S. V., Nazarova, A. V., Borovskii, G. B., & Penzina, T. A. (2008). Organic acids and carbohydrates from *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(6), 762–763. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9180-x>

Oleennikov, D. N., Agafonova, S. V., Stolbikova, A. V., & Rokhin, A. V. (2010). Minor glucans from *Laetiporus sulphureus* basidiocarps. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(3), 444–445. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9637-y>

Oleennikov, D. N., Agafonova, S. V., Stolbikova, A. V., & Rokhin, A. V. (2011). Melanin of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr sterile form. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(3), 298–303. <https://doi.org/10.1134/S0003683811030094>

Oleennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., & Agafonova, S. V. (2011). Antioxidant components of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. fruit bodies. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47(4), 419–425. <https://doi.org/10.1134/S0003683811040107>

Omidi, N., Barzegar, F., Abedi, A.-S., Kamankesh, M., Ghanati, K., & Mohammadi, A. (2021). Response Surface Methodology of Quantitative of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Fish Using Efficient Microextraction Method Coupled with High-Performance Liquid Chromatography: Central Composite Design. *Journal of Chromatographic Science*, 59(5), 473–481. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa137>

Omrane Benmradi, M., Mechri, S., Zraï Jaouadi, N., Ben Elhouli, M., Rekik, H., Sayadi, S., Bejar, S., Kechaou, N., & Jaouadi, B. (2019). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnology*, 19(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0536-4>

Oreopoulou, V., Psimouli, V., Tsimogiannis, D., Anh, T. K., Tu, N. M., Uygun, U., Koxsel, H., Gokmen, V., Crews, C., Tomoskozi, S., Domotor, L., Balazs, G., Zhang, L., Liu, H., Cui, Y., Liu, B., Wenping, D., Xingguo, W., Weining, H., ... El-Nawawy, M. (2009). Assessing food additives: the good, the bad and the ugly. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 1(2), 101–110. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2009.00012.x>

Ouanezar, M., Guyomarc'h, F., & Bouchoux, A. (2012). AFM Imaging of Milk Casein Micelles: Evidence for Structural Rearrangement upon Acidification. *Langmuir*, 28(11), 4915–4919. <https://doi.org/10.1021/la3001448>

Oyetayo, V., & Oyedeji, R. (2017). Proximate and Mineral Composition of Bread Fortified with Mushroom (*Pleurotus ostreatus* and *Calocybe indica*). *Microbiology Research Journal International*, 19, 1–9. <https://doi.org/10.9734/MRJI/2017/32133>

Pal, M., Dudhrejiya, P., & Pinto, S. (2017). *Goat Milk Products and their significance*. 44, 21–25.

Palazzolo, E., Gargano, M. L., & Venturella, G. (2012). The nutritional composition of selected wild edible mushrooms from Sicily (southern Italy). *International Journal of Food Sciences and*

Nutrition, 63(1), 79–83. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.598850>

Pan, K., Luo, Y., Gan, Y., Baek, S. J., & Zhong, Q. (2014). pH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity. *Soft Matter*, 10(35), 6820–6830. <https://doi.org/10.1039/c4sm00239c>

Pan, K., Zhong, Q., & Baek, S. J. (2013). Enhanced Dispersibility and Bioactivity of Curcumin by Encapsulation in Casein Nanocapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(25), 6036–6043. <https://doi.org/10.1021/jf400752a>

Pappa, E., Kondyli, E., MacNaughtan, W., Kakouri, A., Nesseris, K., & Israilides, C. (2018). Quality and Sensory Properties of Reduced Fat Yoghurt Made with Addition of β -Glucans. *Food and Nutrition Sciences*, 09, 390–402. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.94031>

Park, Y.W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1–2), 88–113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>

Park, Young W. (2017). Goat Milk – Chemistry and Nutrition. In *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals* (pp. 42–83). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119110316.ch2.2>

Pasban, A., Mohebbi, M., Pourazarang, H., & Varidi, M. (2014). Effects of endemic hydrocolloids and xanthan gum on foaming properties of white button mushroom puree studied by cluster analysis: A comparative study. *Journal of Taibah University for Science*, 8(1), 31–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.09.004>

Pavic, A., Ilic-Tomic, T., & Glamočlija, J. (2021). Unravelling Anti-Melanogenic Potency of Edible Mushrooms *Laetiporus sulphureus* and *Agaricus silvaticus* In Vivo Using the Zebrafish Model. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/jof7100834>

Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>

Pérez-Bassart, Z., Méndez, D. A., Martínez-Abad, A., López-Rubio, A., & Fabra, M. J. (2024). Emulsifying properties of β -glucan-rich extracts obtained from *Pleurotus ostreatus* whole mushroom and stipes. *Food Hydrocolloids*, 153, 109961. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109961>

Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., Bonazza, F., Palmieri, G. F., Pucciarelli, S., Polzonetti, V., Attarian, L., Polidori, P., & Vincenzetti, S. (2019). A comparison among β -caseins purified from milk of different species: Self-assembling behaviour and immunogenicity potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 173, 210–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.079>

Pešić, M. B. (2011). *Biohemijske karakteristike i tehnološka funkcionalna svojstva termički i enzimski tretiranih mleka različitog porekla*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.

Pesic, M. B., Barac, M. B., Stanojevic, S. P., Ristic, N. M., Macej, O. D., & Vrvic, M. M. (2012). Heat induced casein–whey protein interactions at natural pH of milk: A comparison between caprine and bovine milk. *Small Ruminant Research*, 108(1–3), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.06.013>

Pesic, M. B., Barac, M. B., Vrvic, M. M., Ristic, N. M., Macej, O. D., Stanojevic, S. P., & Kostic, A. Z. (2011a). The distributions of major whey proteins in acid wheys obtained from

caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal*, 21(10), 831–838. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.002>

Pešić, M. B., Milinčić, D. D., Kostić, A. Ž., Stanislavljević, N. S., Vukotić, G. N., Kojić, M. O., Gašić, U. M., Barac, M. B., Stanojević, S. P., Popović, D. A., Banjac, N. R., & Tešić, Ž. L. (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*, 284, 28–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.107>

Pešić, M., Barac, M., Stanojevic, S., & Vrvic, M. (2014). Effect of pH on heat-induced casein-whey protein interactions: A comparison between caprine milk and bovine milk. *International Dairy Journal*, 39, 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.06.006>

Pešić, M., Barac, M., Stanojevic, S., & Vrvic, M. (2016). Heat-Induced Casein–Whey Protein Interactions in Caprine Milk: Whether Are Similar to Bovine Milk? In *Food Engineering Series* (pp. 163–175). https://doi.org/10.1007/978-3-319-24040-4_9

Pesic, M., Barac, M., Vrvic, M., Ristic, N., Macej, O., & Stanojevic, S. (2011b). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125(4), 1443–1449. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.10.045>

Pessato, T. B., de Moraes, F. P. R., de Carvalho, N. C., Figueira, A. C. M., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. de L., & Netto, F. M. (2018). Protein structure modification and allergenic properties of whey proteins upon interaction with tea and coffee phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 51, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.019>

Peter-Valence, F., Llarena-Hernandez, C., Largeteau, M., Savoie, J. M., Ruaudel, F., Ziarelli, F., Ferré, E., & Farnet, A. M. (2011). Chemical Characterization of the Biomass of an Edible Medicinal Mushroom, *Agaricus subrufescens*, via Solid-State ¹³C NMR. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(16), 8939–8943. <https://doi.org/10.1021/jf2017622>

Petrović, J. D. (2018). *Biološki potencijal i analiza metabolita jestivih i lekovitih gljiva iz rodova Agrocybe, Laetiporus, Pleurotus i Polyporus sa teritorije Srbije*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet.

Petrović, J., Glamočlija, J., Ilić-Tomić, T., Soković, M., Robajac, D., Nedić, O., & Pavić, A. (2020). Lectin from *Laetiporus sulphureus* effectively inhibits angiogenesis and tumor development in the zebrafish xenograft models of colorectal carcinoma and melanoma. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.033>

Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D. S., Ćirić, A., Nikolić, M., Bukvički, D., Guerzoni, M. E., & Soković, M. D. (2013). *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 59, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.021>

Petrović, J., Papandreou, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Baskakis, C., Proestos, C., Lamari, F., Zoumpoulakis, P., & Soković, M. (2014). Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food & Function*, 5(11), 2948–2960. <https://doi.org/10.1039/c4fo00727a>

Petrovic, J., Stojković, D., Nikolic, M., Glamočlija, J., Soković, M., & Ćiric, A. (2011). Antimicrobial activity of aqueous extract of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 2011, 299–305. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1120299S>

- Petrović, J., Stojković, D., Reis, F. S., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Ferreira, I. C. F. R., & Soković, M. (2014). Study on chemical, bioactive and food preserving properties of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *Food & Function*, 5(7), 1441–1451. <https://doi.org/10.1039/c4fo00113c>
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N. K., & Mathe, E. (2018). An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 922–935. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
- Pleszczyńska, M., Wiater, A., Siwulski, M., & Szczodrak, J. (2013). Successful large-scale production of fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill on an artificial substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 29(4), 753–758. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1230-z>
- Popa, G., Cornea, C. P., Luta, G., Gherghina, E., Israel-Roming, F., Corina, B., & Toma, R. (2016). ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Agriculture for Life, Life for Agriculture, AgroLife S*, 168–173.
- 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. *Heinem* extracts: Electrophoretic, FTIR, DLS and microstructure characterization. *Food Chemistry*, 402, 134299. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134299>
- Pormohammad, A., Nasiri, M. J., & Azimi, T. (2019). Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1181–1197. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201324>
- Post, A. E., Arnold, B., Weiss, J., & Hinrichs, J. (2012). Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of α S- and β -casein. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1603–1616. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2011-4641>
- Power, O., Jakeman, P., & FitzGerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797–820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>
- Prasantha, B. D. R., & Wimalasiri, K. M. S. (2019). Effect of HTST Thermal Treatments on End-Use Quality Characteristics of Goat Milk. *International Journal of Food Science*, 2019, 1801724. <https://doi.org/10.1155/2019/1801724>
- Pravilnik o kvalitetu supa, sosova, dodataka jelima i srodnih proizvoda.* (n.d.). Službeni List SRJ, 41/93 i Službeni List SCG, 56/2003 i 4/2004. http://demo.paragraf.rs/demo/combined/Old/t/t2004_02/t02_0010.htm
- Pravilnik o prehranbenim aditivima. (n.d.). *Službeni Glasnik RS*, 53/2018.
- Prosser, C. G. (2021). Compositional and functional characteristics of goat milk and relevance as a base for infant formula. *Journal of Food Science*, 86(2), 257–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.15574>
- Pukalski, J., & Latowski, D. (2022). Secrets of Flavonoid Synthesis in Mushroom Cells. *Cells*, 11(19). <https://doi.org/10.3390/cells11193052>
- Qin, Y. S., Jiang, H., Wang, C. F., Cheng, M., Wang, L. L., Huang, M. Y., Zhao, Q. X., & Jiang, H. H. (2021). Physicochemical and functional properties of goat milk whey protein and casein obtained during different lactation stages. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 3936–3946.

<https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2020-19454>

Radic, N., Injac, R., & Štrukelj, B. (2009). Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Aphylophoromycetideae): Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *11*, 103–116. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v11.i2.10>

Rai, D., Rathaur, A., Yadav, A., & Shradha. (2022). *Nutritional and nutraceutical properties of goat milk for human health: A review*. *75*, 1–10. <https://doi.org/10.33785/IJDS.2022.v75i01.001>

Rajković, M., Popović Minić, D., Milinčić, D., & Zdravković, M. (2020). Circular economy in food industry. *Zastita Materijala*, *61*, 229–250. <https://doi.org/10.5937/zasmat2003229R6>

Ranadheera, C S, Evans, C. A., Baines, S. K., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Pimentel, T. C., Wittwer, A. E., Naumovski, N., Graça, J. S., Sant'Ana, A. S., Ajlouni, S., & Vasiljevic, T. (2019). Probiotics in Goat Milk Products: Delivery Capacity and Ability to Improve Sensory Attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*(4), 867–882. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12447>

Ranadheera, C S, Liyanaarachchi, W. S., Chandrapala, J., Dissanayake, M., & Vasiljevic, T. (2016). Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, *57*, 178–187. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.005>

Ranadheera, Chaminda Senaka, Naumovski, N., & Ajlouni, S. (2018). Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: recent developments and innovations. *Current Opinion in Food Science*, *22*, 109–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.010>

Rapior, S., Kanska, G., Guillot, J., Andary, C., & Bessiere, J.-M. (2000). Volatile composition of *Laetiporus sulphureus*. *Cryptogamie Mycologie*, *21*(1), 67–72. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0181-1584\(00\)00109-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0181-1584(00)00109-3)

Rathore, H., Sehwal, S., Prasad, S., & Sharma, S. (2019). Technological, nutritional, functional and sensorial attributes of the cookies fortified with *Calocybe indica* mushroom. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *13*(2), 976–987. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-0012-1>

Raut, J. K., & Adhikari, M. (2021). *Chapter 8 Mushroom: A True Super Food* (pp. 201–234).

Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, *79*(1), 57–72. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>

Raynal-Ljutovac, K., Park, Y. W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007). Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, *68*(1), 207–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.006>

Raynal, K., & Remeuf, F. (1998). The Effect of Heating on Physicochemical and Renneting Properties of Milk: A Comparison between Caprine, Ovine and Bovine Milk. *International Dairy Journal*, *8*(8), 695–706. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00112-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00112-5)

Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, *66*, 48–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.010>

Rekha, M. N., Yadav, A. R., Dharmesh, S., Chauhan, A. S., & Ramteke, R. S. (2010). Evaluation of Antioxidant Properties of Dry Soup Mix Extracts Containing Dill (*Anethum sowa* L.) Leaf. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(3), 441–449. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0123-5>

- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, L., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, *188*, 612–618. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061>
- Ríos, J.-L., Andújar, I., Recio, M.-C., & Giner, R.-M. (2012). Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds. *Journal of Natural Products*, *75*(11), 2016–2044. <https://doi.org/10.1021/np300412h>
- Rojas-Candelas, L. E., Chanona-Pérez, J. J., Méndez Méndez, J. V., Resendiz-Mora, C. A., Calderón-Benavides, H. A., & Cervantes-Sodi, F. (2019). Microstructural Characterization of Casein by Microscopy and Spectroscopy Techniques. *Microscopy and Microanalysis*, *25*(S2), 490–491. <https://doi.org/DOI: 10.1017/S1431927619003180>
- Romano, D., Varetto, M., & Vicario, G. (2004). Multiresponse Robust Design: A General Framework Based on Combined Array. *Journal of Quality Technology*, *36*(1), 27–37. <https://doi.org/10.1080/00224065.2004.11980250>
- Roncero-Ramos, I., Mendiola-Lanao, M., Pérez-Clavijo, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Effect of different cooking methods on nutritional value and antioxidant activity of cultivated mushrooms. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *68*(3), 287–297. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1244662>
- Rózsa, S., Măniuțiu, D.-N., Poșta, G., Gocan, T.-M., Andreica, I., Bogdan, I., Rózsa, M., & Laza, V. (2019). Influence of the Culture Substrate on the *Agaricus blazei* Murrill Mushrooms Vitamins Content. *Plants (Basel, Switzerland)*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090316>
- Rudke, A. R., Heleno, S. A., Fernandes, I. P., Prieto, M. A., Gonçalves, O. H., Rodrigues, A. E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2019). Microencapsulation of ergosterol and *Agaricus bisporus* L. extracts by complex coacervation using whey protein and chitosan: Optimization study using response surface methodology. *LWT*, *103*, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.018>
- Saha, P., Bajaj, R., Mann, B., Sharma, R., & Mandal, S. (2022). Isolation and characterisation of micellar casein from buffalo milk using microfiltration technique with modified buffer composition. *International Journal of Dairy Technology*, *75*(2), 308–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1471-0307.12844>
- Saiki, P., Kawano, Y., Van Griensven, L. J. L. D., & Miyazaki, K. (2017). The anti-inflammatory effect of *Agaricus brasiliensis* is partly due to its linoleic acid content. *Food Funct.*, *8*(11), 4150–4158. <https://doi.org/10.1039/C7FO01172E>
- Saikia, D., Hassani, M. I., & Walia, A. (2022). Review: Goat milk and its nutraceutical properties. *International Journal of Applied Research*, *8*(4), 119–122.
- Sáiz-Abajo, M.-J., González-Ferrero, C., Moreno-Ruiz, A., Romo-Hualde, A., & González-Navarro, C. J. (2013). Thermal protection of β -carotene in re-assembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. *Food Chemistry*, *138*(2), 1581–1587. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.016>
- Sansi, M. S., Iram, D., Zanab, S., Vij, S., Puniya, A. K., Singh, A., Ashutosh, & Meena, S. (2022). Antimicrobial bioactive peptides from goat Milk proteins: In silico prediction and analysis. *Journal of Food Biochemistry*, e14311. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14311>
- Santas, J., Carbó, R., Gordon, M. H., & Almajano, M. P. (2008). Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food Chemistry*, *107*(3), 1210–1216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.056>

- Santas, Jonathan, Almajano, M. P., & Carbó, R. (2010). Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(2), 403–409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02169.x>
- Santipanichwong, R., & Suphantharika, M. (2009). Influence of different β -glucans on the physical and rheological properties of egg yolk stabilized oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1279–1287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.10.006>
- Sarantis, S., Eren, N., Kowalczyk, B., Jiménez-Flores, R., & Alvarez, V. (2021). Thermodynamic Interactions of Micellar Casein and Oat β -Glucan in a Model Food System. *Food Hydrocolloids*, 115, 106559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106559>
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J. I., & Hambitzer, R. (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry*, 216, 45–51. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.010>
- Sayuti, N. H., Kamarudin, A. A., Saad, N., Razak, N. A. A., & Esa, N. M. (2021). Optimized green extraction conditions of matcha green tea (*Camellia sinensis*) using central composite design for maximal polyphenol and antioxidant contents. *BioResources*, 16(2), 3255–3271. <https://doi.org/10.15376/biores.16.2.3255-3271>
- Schaich, K. M., Tian, X., & Xie, J. (2015). Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*, 14, 111–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>
- Schefer, S., Oest, M., & Rohn, S. (2021). Interactions between Phenolic Acids, Proteins, and Carbohydrates—Influence on Dough and Bread Properties. *Foods*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/foods10112798>
- Selvaggi, M., Laudadio, V., Dario, C., & Tufarelli, V. (2014). Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability. *Molecular Biology Reports*, 41(2), 1035–1048. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2949-9>
- Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), 2569–2576. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2569-2576.2003>
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D., & Livney, Y. D. (2007). Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocolloids*, 21(5), 936–942. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.09.006>
- Seo, M. J., Kang, B. W., Park, J. U., Kim, M. J., Lee, H. H., Choi, Y. H., & Jeong, Y. K. (2011). Biochemical characterization of the exopolysaccharide purified from *Laetiporus sulphureus* mycelia. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(12), 1287–1293. <https://doi.org/10.4014/jmb.1106.06046>
- Sepe, L., & Argüello, A. (2019). Recent advances in dairy goat products. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(8), 1306–1320. <https://doi.org/10.5713/ajas.19.0487>
- Shah, P., & Modi, H. A. (2020). *Comparative Study of DPPH, ABTS and FRAP Assays for Determination of Antioxidant Activity*.
- Shaheen, T. I., Hussien, G. M. A., Mekawey, A. A., Ghalia, H. H. A., youssry, A. A., & El Mokadem, M. T. (2022). Facile extraction of nanosized β -glucans from edible mushrooms and their antitumor activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 111, 104607.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104607>

Shahidi, F., & Dissanayaka, C. S. (2023). Phenolic-protein interactions: insight from in-silico analyses – a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s43014-022-00121-0>

Shao, P., Xuan, S., Wu, W., & Qu, L. (2019). Encapsulation efficiency and controlled release of *Ganoderma lucidum* polysaccharide microcapsules by spray drying using different combinations of wall materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.153>

Sharma, H., Singh, A. K., Deshwal, G. K., Rao, P. S., & Kumar, M. D. (2021). Functional *Tinospora cordifolia* (giloy) based pasteurized goat milk beverage: Impact of milk protein-polyphenol interaction on bioactive compounds, anti-oxidant activity and microstructure. *Food Bioscience*, 42, 101101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101101>

Shegelman, I. R., Kirilina, V. M., Vasilev, A. S., Blazhevich, L. E., & Smirnova, O. E. (2020). Supply Chain Management Application in Functional Food Industry. *International Journal of Supply Chain Management*, 9(3), 537–549.

Shen, R., Liu, X., Dong, J., Si, J., & Li, H. (2015). The gel properties and microstructure of the mixture of oat β -glucan/soy protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 47, 108–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.017>

Shukla, A., Narayanan, T., & Zanchi, D. (2009). Structure of casein micelles and their complexation with tannins. *Soft Matter*, 5(15), 2884–2888. <https://doi.org/10.1039/B903103K>

Silva, C. E. L., Hudson, E. A., Agudelo, Á. J. P., da Silva, L. H. M., Pinto, M. S., do Carmo Hespagnol, M., Barros, F. A. R., & dos Santos Pires, A. C. (2018). β -Carotene and Milk Protein Complexation: a Thermodynamic Approach and a Photo Stabilization Study. *Food and Bioprocess Technology*, 11(3), 610–620. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2028-7>

Silva, M., & Lidon, F. (2016). Food preservatives – Food preservatives – An overview on applications and side effects. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26, 366–373. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-04-351>

Simić, V. (2018). *Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije (Aronia melanocarpa L.)*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu - Tehnološki fakultet u Leskovcu.

Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., Heropoulos, G., Proestos, C., Ćirić, A., Petrovic, J., Glamoclija, J., & Sokovic, M. (2015). Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3264–3272. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1377-8>

Singh, S., Ghosh, S., & Patil, G. R. (2003). Development of a mushroom-whey soup powder. *International Journal of Food Science and Technology*, 38(2), 217–224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00661.x>

Siu, K.-C., Chen, X., & Wu, J.-Y. (2014). Constituents actually responsible for the antioxidant activities of crude polysaccharides isolated from mushrooms. *Journal of Functional Foods*, 11, 548–556. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.012>

Slimestad, R., Fossen, T., & Vågen, I. M. (2007). Onions: a source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10067–10080. <https://doi.org/10.1021/jf0712503>

Smiderle, F. R., Alquini, G., Tadra-Sfeir, M. Z., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven,

L. J. L. D. (2013). Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis (1→6)-β-D-glucans show immunostimulatory activity on human THP-1 derived macrophages. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.12.073>

Smiderle, F. R., Ruthes, A. C., van Arkel, J., Chanput, W., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Van Griensven, L. J. L. D. (2011). Polysaccharides from Agaricus bisporus and Agaricus brasiliensis show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 58. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-58>

Soares, A. A., de Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., da Costa, S. M. G., & Peralta, R. M. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Agaricus brasiliensis (Agaricus blazei Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry*, 112(4), 775–781. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.117>

Soković, M., Ćirić, A., Glamočlija, J., Nikolić, M., & van Griensven, L. J. L. D. (2014). Agaricus blazei hot water extract shows anti quorum sensing activity in the nosocomial human pathogen Pseudomonas aeruginosa. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(4), 4189–4199. <https://doi.org/10.3390/molecules19044189>

Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Petrović, J., & Stojković, D. (2018). Chapter 5 - Mushrooms as Sources of Therapeutic Foods. In A. M. Holban & A. M. Grumezescu (Eds.), *Therapeutic Foods* (pp. 141–178). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811517-6.00005-2>

Song, W., Helsper, J., & Van Griensven, L. (2008). Phenolic Compounds Present in Medicinal Mushroom Extracts Generate Reactive Oxygen Species in Human Cells In Vitro. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10 (2008) 1, 10. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v10.i1.20>

Sonu, K. S., & Basavaprabhu, H. N. (2020). Compositional and therapeutic signatures of goat milk: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 1013–1019.

Speranza, B., Racioppo, A., Sinigaglia, M., Corbo, M. R., & Bevilacqua, A. (2015). Use of central composite design in food microbiology: a case study on the effects of secondary phenols on lactic acid bacteria from olives. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5), 520–525. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1064866>

Sredović Ignjatović, I. D. (2015). *Razvoj metoda za analizu halogenih elemenata u čvrstim uzorcima u atmosferi kiseonika*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu - Tehnološko-metalurški fakultet.

Stanisavljević, N., Samardžić, J., Janković, T., Šavikin, K., Mojsin, M., Topalović, V., & Stevanović, M. (2015). Antioxidant and antiproliferative activity of chokeberry juice phenolics during in vitro simulated digestion in the presence of food matrix. *Food Chemistry*, 175, 516–522. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.009>

Stobiecka, M., Król, J., & Brodziak, A. (2022). Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030245>

Stojković, D., Reis, F. S., Glamočlija, J., Ćirić, A., Barros, L., Van Griensven, L. J. L. D., Ferreira, I. C. F. R., & Soković, M. (2014). Cultivated strains of Agaricus bisporus and A. brasiliensis: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product – natural preservatives in yoghurt. *Food Funct.*, 5(7), 1602–1612. <https://doi.org/10.1039/C4FO00054D>

Stojkovic, D., Smiljkovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., Van Griensven, L., Ferreira, I. C. F. R., &

- Sokovic, M. (2019). An insight into antidiabetic properties of six medicinal and edible mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase linked to type-2 diabetes. *South African Journal of Botany*, 120, 100–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.01.007>
- Sugumar, J. K., & Guha, P. (2020). Study on the formulation and optimization of functional soup mix of *Solanum nigrum* leaves. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 20, 100208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100208>
- Sumaedi, S., & Sumardjo. (2021). A model of traditional functional food consumption behaviour. *British Food Journal*, 123(1), 13–30. <https://doi.org/10.1108/BFJ-01-2020-0019>
- Sun, T., & Tanumihardjo, S. A. (2007). An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, 72(9), R159-65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00552.x>
- Sun, W., He, H., Wang, J. Z., Wu, L.-J., Cheng, F., & Deng, Z. (2014). The Main Components Analysis of *Laetiporus sulphureu* Crude Extract and its Hepatoprotective Effect on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Fibrosis in Rats. *Applied Mechanics and Materials*, 568–570, 1934–1939.
- Sun, Y., Lv, F., Tian, J., Ye, X. Q., Chen, J., & Sun, P. (2019). Domestic cooking methods affect nutrient, phytochemicals, and flavor content in mushroom soup. *Food Science & Nutrition*, 7(6), 1969–1975. <https://doi.org/10.1002/fsn3.996>
- Tagliazucchi, D., Martini, S., Shamsia, S., Helal, A., & Conte, A. (2018). Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk. *International Dairy Journal*, 81, 19–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.014>
- Takahashi, J. A., Barbosa, B. V. R., Martins, B. de A., P Guirlanda, C., & A F Moura, M. (2020). Use of the Versatility of Fungal Metabolism to Meet Modern Demands for Healthy Aging, Functional Foods, and Sustainability. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040223>
- Takaku, T., Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1409–1413. <https://doi.org/10.1093/jn/131.5.1409>
- Talorete, T. P. N., Isoda, H., & Maekawa, T. (2002). *Agaricus blazei* (class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-Jun protein in MCF7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5162–5166. <https://doi.org/10.1021/jf011566p>
- Tan, M. C., Chin, N. L., & Yusof, Y. A. (2012). A Box–Behnken Design for Determining the Optimum Experimental Condition of Cake Batter Mixing. *Food and Bioprocess Technology*, 5(3), 972–982. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0394-5>
- Taofiq, O., Corrêa, R. C. G., Barros, L., Prieto, M. A., Bracht, A., Peralta, R. M., González-Paramás, A. M., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). A comparative study between conventional and non-conventional extraction techniques for the recovery of ergosterol from *Agaricus blazei* Murrill. *Food Research International*, 125, 108541. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108541>
- Taofiq, O., Rodrigues, F., Barros, L., Peralta, R. M., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C. F. R., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). *Agaricus blazei* Murrill from Brazil: an ingredient for nutraceutical and cosmeceutical applications. *Food Funct.*, 10(2), 565–572. <https://doi.org/10.1039/C8FO02461H>
- Tavakoli, N., Divsalar, A., Haertlé, T., Sawyer, L., Saboury, A. A., & Muronetz, V. (2021). Milk

protein-based nanodelivery systems for the cancer treatment. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 11(4), 483–500. <https://doi.org/10.1007/s40097-021-00399-5>

The Fungal Cell Wall, преузето 14.05.2024. са <https://www.pathelective.com/micromeded/the-fungal-cell-wall>

Thongkaew, C., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2014). Polyphenol interactions with whey protein isolate and whey protein isolate–pectin coacervates. *Food Hydrocolloids*, 41, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.006>

Thongklang, N., Karbowy-Thongbai, B., Chamyuang, S., Callac, P., Chukeatirote, E., Hyde, K., Wittstein, K., & Stadler, M. (2017). Blazeispirol A, a chemotaxonomic marker from mycelia of the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. *Chiang Mai Journal of Science*, 44, 298–308.

Tirado Kulieva, V. A., Sanchez Chero, M., Yarlequé, M., Aguilar, G., Carrión, G., Cruz, A., & Sánchez-Chero, J. (2021). An Overview on the Use of Response Surface Methodology to Model and Optimize Extraction Processes in the Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 9, 745–754. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.9.3.03>

Tolano-Villaverde, I., Brauer, J., Ocaño-Higuera, V., Torres, W., Ramirez-Wong, B., Herrera-Urbina, R., & Marquez Rios, E. (2016). Effect of pH and chitosan concentration on gelation of protein concentrate from giant squid mantle (*Dosidicus gigas*). *International Journal of Food Science & Technology*, 51, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13095>

Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), 1392–1402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.10.001>

Tsai, S.-Y., Tsai, H.-L., & Mau, J.-L. (2008). Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea* and *Boletus edulis*. *Food Chemistry*, 107(3), 977–983. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.080>

Tu, J., Brennan, M. A., Wu, G., Bai, W., Cheng, P., Tian, B., & Brennan, C. S. (2021). Delivery of Phenolic Compounds, Peptides and β -Glucan to the Gastrointestinal Tract by Incorporating Dietary Fibre-Rich Mushrooms into Sorghum Biscuits. In *Foods* (Vol. 10, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/foods10081812>

Turkmen, N. (2017). Chapter 35 - The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. In R. R. Watson, R. J. Collier, & V. R. Preedy (Eds.), *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease* (pp. 441–449). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809762-5.00035-8>

Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.025>

Ueda, J. M., Pedrosa, M. C., Heleno, S. A., Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2022). Food Additives from Fruit and Vegetable By-Products and Bio-Residues: A Comprehensive Review Focused on Sustainability. *Sustainability*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/su14095212>

Ueguchi, Y., Matsunami, K., Otsuka, H., & Kondo, K. (2011). Constituents of cultivated *Agaricus blazei*. *Journal of Natural Medicines*, 65(2), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s11418-010-0495-5>

Umaña, M., Turchiuli, C., Eim, V., Rosselló, C., & Simal, S. (2021). Stabilization of oil-in-water emulsions with a mushroom (*Agaricus bisporus*) by-product. *Journal of Food Engineering*, 307,

110667. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110667>

Üstün, N., Bulam, S., & Peksen, A. (2018). The Use of Mushrooms and Their Extracts and Compounds in Functional Foods and Nutraceuticals. In *1. International Technology Sciences and Design Symposium (ITESDES), Proceeding Book*, pp. 1205-1222, ISBN: 978-975-2481-10-7

Uyanoglu, M., Canbek, M., van Griensven, L. J. L. D., Yamac, M., Senturk, H., Kartkaya, K., Oglakci, A., Turgak, O., & Kanbak, G. (2014). Effects of polysaccharide from fruiting bodies of *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, and *Phellinus linteus* on alcoholic liver injury. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(4), 482–488. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.869796>

Valadares, D. G., Duarte, M. C., Oliveira, J. S., Chávez-Fumagalli, M. A., Martins, V. T., Costa, L. E., Leite, J. P. V., Santoro, M. M., Régis, W. C. B., Tavares, C. A. P., & Coelho, E. A. F. (2011). Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitology International*, 60(4), 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.001>

Vallée, M., Lu, X., Narciso, J. O., Li, W., Qin, Y., Brennan, M. A., & Brennan, C. S. (2017). Physical, Predictive Glycaemic Response and Antioxidative Properties of Black Ear Mushroom (*Auricularia auricula*) Extrudates. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 72(3), 301–307. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0621-6>

Vamanu, E., & Nita, S. (2013). Antioxidant Capacity and the Correlation with Major Phenolic Compounds, Anthocyanin, and Tocopherol Content in Various Extracts from the Wild Edible *Boletus edulis* Mushroom. *BioMed Research International*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/313905>

van Leeuwen, S. S., Te Poele, E. M., Chatziioannou, A. C., Benjamins, E., Haandrikman, A., & Dijkhuizen, L. (2020). Goat Milk Oligosaccharides: Their Diversity, Quantity, and Functional Properties in Comparison to Human Milk Oligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(47), 13469–13485. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03766>

Vanegas-Azuero, A.-M., & Gutiérrez, L.-F. (2018). Physicochemical and sensory properties of yogurts containing sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and β -glucans from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1020–1033. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13235>

Vera Candiotti, L., De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>

Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E. S. (2019). Functionality of the components from goat's milk, recent advances for functional dairy products development and its implications on human health. *Journal of Functional Foods*, 52, 243–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017>

Vincent, M., Philippe, E., Everard, A., Kassis, N., Rouch, C., Denom, J., Takeda, Y., Uchiyama, S., Delzenne, N. M., Cani, P. D., Migrenne, S., & Magnan, C. (2013). Dietary supplementation with *Agaricus blazei* murill extract prevents diet-induced obesity and insulin resistance in rats. *Obesity*, 21(3), 553–561. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/oby.20276>

Vital, A. C. P., Croge, C., Gomes-da-Costa, S. M., & Matumoto-Pintro, P. T. (2017). Effect of addition of *Agaricus blazei* mushroom residue to milk enriched with Omega-3 on the prevention of lipid oxidation and bioavailability of bioactive compounds after in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 1483–1490. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13413>

- Walker, R. B., & Everette, J. D. (2009). Comparative reaction rates of various antioxidants with ABTS radical cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1156–1161. <https://doi.org/10.1021/jf8026765>
- Walstra, P. (1999). Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9(3), 189–192. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X)
- Wan, M. L. Y., Ling, K. H., El-Nezami, H., & Wang, M. F. (2019). Influence of functional food components on gut health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1927–1936. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1433629>
- Wang, H.-T., Yang, L.-C., Yu, H.-C., Chen, M.-L., Wang, H.-J., & Lu, T.-J. (2018). Characteristics of fucose-containing polysaccharides from submerged fermentation of *Agaricus blazei* Murill. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 678–687. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.006>
- Wang, H., Fu, Z., & Han, C. (2013). The Medicinal Values of Culinary-Medicinal Royal Sun Mushroom (*Agaricus blazei* Murrill). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, 2013, 842619. <https://doi.org/10.1155/2013/842619>
- Wang, J. T., Wang, Q., & Han, J. R. (2013). Yield, polysaccharides content and antioxidant properties of the mushroom *Agaricus subrufescens* produced on different substrates based on selected agricultural wastes. *Scientia Horticulturae*, 157, 84–89. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.006>
- Wang, J., Zhang, P., He, H., Se, X., Sun, W., Chen, B., Zhang, L., Yan, X., & Zou, K. (2017). Eburicoic acid from *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill attenuates inflammatory responses through inhibiting LPS-induced activation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B pathways in RAW264.7 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(8), 845–856. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1382-3>
- Wang, L., Zhao, H., Brennan, M., Guan, W., Liu, J., Wang, M., Wen, X., He, J., & Brennan, C. (2020). In vitro gastric digestion antioxidant and cellular radical scavenging activities of wheat-shiitake noodles. *Food Chemistry*, 330, 127214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127214>
- Wang, Y., Wu, B., Shao, J., Jia, J., Tian, Y., Shu, X., Ren, X., & Guan, Y. (2018). Extraction, purification and physicochemical properties of a novel lectin from *Laetiporus sulphureus* mushroom. *LWT*, 91, 151–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.032>
- Wang, Z., Jiang, S., Ma, C., Huo, D., Qiannan, P., Shao, Y., & Zhang, J.-C. (2018). Evaluation of Nutrition and Function of the Cow and Goat Milk Based on Intestinal Microbiota by Metagenomic-wide analysis. *Food & Function*, 9. <https://doi.org/10.1039/C7FO01780D>
- Weber, R. W. S., Mucci, A., & Davoli, P. (2004). Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Tetrahedron Letters*, 45(5), 1075–1078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2003.11.073>
- Wei, Q., Zhan, Y., Chen, B., Xie, B., Fang, T., Ravishankar, S., & Jiang, Y. (2020). Assessment of antioxidant and antidiabetic properties of *Agaricus blazei* Murill extracts. *Food Science & Nutrition*, 8(1), 332–339. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1310>
- Wiater, A., Paduch, R., Pleszczyńska, M., Próchniak, K., Choma, A., Kandefer-Szerszeń, M., & Szczodrak, J. (2011). α -(1 \rightarrow 3)-D-glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. *Biotechnology Letters*, 33(4), 787–795. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0502-7>

- Wisitrassameewong, K., Karunarathna, S. C., Thongklang, N., Zhao, R., Callac, P., Moukha, S., Férandon, C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). *Agaricus subrufescens*: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 131–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.01.003>
- Witkamp, R. F., & van Norren, K. (2018). Let thy food be thy medicine...when possible. *European Journal of Pharmacology*, 836, 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.06.026>
- Wu, L., Zhang, C., Long, Y., Chen, Q., Zhang, W., & Liu, G. (2022). Food additives: From functions to analytical methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(30), 8497–8517. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1929823>
- Wu, Shaozong, Fitzpatrick, J., Cronin, K., & Miao, S. (2019). The effect of pH on the wetting and dissolution of milk protein isolate powder. *Journal of Food Engineering*, 240, 114–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.022>
- Wu, Sinong, Li, G., Xue, Y., Ashokkumar, M., Zhao, H., Liu, D., Zhou, P., Sun, Y., & Hemar, Y. (2020). Solubilisation of micellar casein powders by high-power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 67, 105131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105131>
- Wu, Songhai, Li, F., Jia, S., Ren, H., Gong, G., Wang, Y., Lv, Z., & Liu, Y. (2014). Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill. *Carbohydrate Polymers*, 103, 414–417. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.075>
- Wu, Y., & Wang, X. (2017). Binding, stability, and antioxidant activity of curcumin with self-assembled casein–dextran conjugate micelles. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3295–3307. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1286505>
- Xu, B., Yuan, J., Wang, L., Lu, F., Wei, B., Azam, R. S. M., Ren, X., Zhou, C., Ma, H., & Bhandari, B. (2020). Effect of multi-frequency power ultrasound (MFPU) treatment on enzyme hydrolysis of casein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104930. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104930>
- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29(6), 667–674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.003>
- Yadav, D., & Negi, P. S. (2021). Bioactive components of mushrooms: Processing effects and health benefits. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 148, 110599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110599>
- Yamanaka, D., Motoi, M., Motoi, A., & Ohno, N. (2014). Differences in antioxidant activities of outdoor- and indoor-cultivated *Agaricus brasiliensis*, and protective effects against carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 454. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-454>
- Yamanaka, D., Tada, R., Adachi, Y., Ishibashi, K., Motoi, M., Iwakura, Y., & Ohno, N. (2012). *Agaricus brasiliensis*-derived β -glucans exert immunoenhancing effects via a dectin-1-dependent pathway. *International Immunopharmacology*, 14(3), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.07.017>
- Yang, N., Li, D.-F., Feng, L., Xiang, Y., Liu, W., Sun, H., & Wang, D.-C. (2009). Structural basis for the tumor cell apoptosis-inducing activity of an antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Molecular Biology*, 387(3), 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.002>
- Ye, A., Cui, J., Carpenter, E., Prosser, C., & Singh, H. (2019). Dynamic in vitro gastric digestion

of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition. *International Dairy Journal*, 97, 76–85. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.002>

Ye, J., Fan, F., Xu, X., & Liang, Y. (2013). Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk. *Food Research International*, 53(1), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.033>

Yildirim-Elikoglu, S. (2019). Interactions Between Milk Proteins and Polyphenols in Model Systems or Complex Dairy Matrices. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 554–559). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21858-1>

Yin, C., Noratto, G. D., Fan, X., Chen, Z., Yao, F., Shi, D., & Gao, H. (2020). The Impact of Mushroom Polysaccharides on Gut Microbiota and Its Beneficial Effects to Host: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116942. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116942>

Yoshikawa, K., Matsumoto, K., & Arihara, S. (1999). New lanostanoid glycosides from the fruit body of *laetiporus versisporus*. *Journal of Natural Products*, 62(4), 543–545. <https://doi.org/10.1021/np980456i>

You, Q., Yin, X., Zhang, S., & Jiang, Z. (2014). Extraction, purification, and antioxidant activities of polysaccharides from *Tricholoma mongolicum* Imai. *Carbohydrate Polymers*, 99, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.088>

Younis, A. M., Yosri, M., & Stewart, J. K. (2019). In vitro evaluation of pleiotropic properties of wild mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 79–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aogas.2019.05.001>

Yu, C.-H., Kan, S.-F., Shu, C.-H., Lu, T.-J., Sun-Hwang, L., & Wang, P. S. (2009). Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murill on the growth of prostate cancer in vitro and in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10), 753–764. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.07.004>

Zanutto-Elgui, M. R., Vieira, J. C. S., Prado, D. Z. do, Buzalaf, M. A. R., Padilha, P. de M., Elgui de Oliveira, D., & Fleuri, L. F. (2019). Production of milk peptides with antimicrobial and antioxidant properties through fungal proteases. *Food Chemistry*, 278, 823–831. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.119>

Zhang, M., Zhu, L., Cui, S. W., Wang, Q., Zhou, T., & Shen, H. (2011). Fractionation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides and polysaccharide–protein complexes from *Pleurotus geesteranus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(1), 5–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.09.003>

Zhang, S., He, B., Ge, J., Zhai, C., Liu, X., & Liu, P. (2010). Characterization of chemical composition of *Agaricus brasiliensis* polysaccharides and its effect on myocardial SOD activity, MDA and caspase-3 level in ischemia–reperfusion rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 363–366. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.008>

Zhang, Y., Liu, D., Fang, L., Zhao, X., Zhou, A., & Xie, J. (2018). A galactomannoglucan derived from *Agaricus brasiliensis*: Purification, characterization and macrophage activation via MAPK and I κ B/NF κ B pathways. *Food Chemistry*, 239, 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.152>

Zhao, H., Lan, Y., Liu, H., Zhu, Y., Liu, W., Zhang, J., & Jia, L. (2017). Antioxidant and Hepatoprotective Activities of Polysaccharides from Spent Mushroom Substrates (*Laetiporus sulphureus*) in Acute Alcohol-Induced Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 5863523. <https://doi.org/10.1155/2017/5863523>

Zhao, L., Zhang, S., Lu, J., & Lv, J. (2020). Effects of heat treatment and stabilizing salts supplementation on the physicochemical properties, protein structure and salts balance of goat milk. *LWT*, *132*, 109878. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109878>

Zhao, X., Cheng, M., Zhang, X., Li, X., Chen, D., Qin, Y., Wang, J., & Wang, C. (2020). The effect of heat treatment on the microstructure and functional properties of whey protein from goat milk. *Journal of Dairy Science*, *103*(2), 1289–1302. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2019-17221>

Zhao, Z., Sun, X., Liu, N., Cheng, J., Wang, C., & Guo, M. (2022). Comparative analysis of caseins in Saanen goat milk from 3 different regions of China using quantitative proteomics. *Journal of Dairy Science*, *105*(7), 5587–5599. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2021-21659>

Zhong, L., Zhao, L., Yang, F., Yang, W., Sun, Y., & Hu, Q. (2017). Evaluation of anti-fatigue property of the extruded product of cereal grains mixed with *Cordyceps militaris* on mice. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *14*, 15. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0171-1>

Ziaja, K., Muszynska, B., Gawalska, A., & Sałaciak, K. (2018). *Laetiporus sulphureus* – chemical composition and medicinal value. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, *17*, 87–96. <https://doi.org/10.24326/asphc.2018.1.8>

Ziaja, K., Muszynska, B., Motyl, P., Pasko, P., & Ekiert, H. (2012). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Some Species of Polyporoid Mushrooms from Poland. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *14*, 385–393. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v14.i4.60>

Zied, D C, Minihoni, M. T. A., Kopytowski-Filho, J., & Andrade, M. C. N. (2010). Production of *Agaricus blazei* ss. Heinemann (*A. brasiliensis*) on different casing layers and environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(10), 1857–1863. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0367-x>

Zied, Diego C, Vieira Junior, W. G., Soares, D. M. M., Stevani, C. V, Dias, E. S., Iossi, M. R., & Pardo-Giménez, A. (2021). Overview of four *Agaricus subrufescens* strains used in the last 15 years in Brazil and other countries and current potential materials for the future. *Mycological Progress*, *20*(8), 953–966. <https://doi.org/10.1007/s11557-021-01711-x>

Zied, Diego Cunha, Pardo Giménez, A., Pardo González, J. E., Dias, E. S., Carvalho, M. A., & Minihoni, M. T. de A. (2014). Effect of cultivation practices on the β -glucan content of *Agaricus subrufescens* basidiocarps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(1), 41–49. <https://doi.org/10.1021/jf403584g>

Zielke, C., Lu, Y., & Nilsson, L. (2019). Aggregation and microstructure of cereal β -glucan and its association with other biomolecules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

Zielke, C., Lu, Y., Poinot, R., & Nilsson, L. (2018). Interaction between cereal β -glucan and proteins in solution and at interfaces. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, *162*, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.059>

Zimet, P., Rosenberg, D., & Livney, Y. D. (2011). Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for ω -3 polyunsaturated fatty acids. *Food Hydrocolloids*, *25*(5), 1270–1276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.025>

Zion Market-Research, преузето 14.05.2024. ca
<https://www.zionmarketresearch.com/report/mushroom-market>

Zou, Z., Duley, J. A., Cowley, D. M., Reed, S., Arachchige, B. J., Bhandari, B., Shaw, P. N., & Bansal, N. (2022). Physicochemical Properties and Whey Proteomes of Camel Milk Powders Produced by Different Concentration and Dehydration Processes. *Foods*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/foods11050727>

Zrnic-Ciric, M., Dabetic, N., Todorovic, V., Djuris, J., & Vidovic, B. (2020). Beta-glucan content and antioxidant activities of mushroom-derived food supplements. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(4), 439–451. <https://doi.org/10.2298/JSC190701121Z>

Zschätzsch, M., Steudler, S., Reinhardt, O., Bergmann, P., Ersoy, F., Stange, S., Wagenführ, A., Walther, T., Berger, R. G., & Werner, A. (2021). Production of natural colorants by liquid fermentation with *Clorociboria aeruginascens* and *Laetiporus sulphureus* and prospective applications. *Engineering in Life Sciences*, 21(3–4), 270–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/elsc.202000079>

7. Биографија аутора

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 (катеорије M34 и M64). Радови су јој цитирани 259 пута, а h-индекс према Google Scholar бази износи 5. 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, техно-функционалним и биолошким својствима хране. Течно говори енглески (C1) и руски језик (B2 сертификат). Удата је и мајка је двоје деце.

8. Прилози

Прилог 1. Полипептидни састав (у %) узорака козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *Agaricus blazei* одређен помоћу дензитометријске анализе SDS-R-PAGE електрофореграма

Број траке		RM	RMPA	RMVA	TRM	TRMPA	TRMVA	CN	CNPA	CNVA	TCN	TCNPA	TCNVA
1	Lf	4.84±0.21abc	4.98±0.08ab	4.48±0.04ac	4.96±0.03ab	5.29±0.02b	4.45±0.12c	/	/	/	3.39±0.29de	3.82±0.06d	3.13±0.34e
2	BSA	4.22±0.05a	4.21±0.03a	3.94±0.02ae	4.57±0.01b	4.66±0.06b	3.67±0.05c	/	/	/	5.03±0.18d	4.85±0.20bd	3.77±0.13ce
3	Ighc	4.78±0.27a	4.71±0.03a	5.02±0.11abd	5.42±0.21bc	5.92±0.02c	4.99±0.13ab	/	/	/	4.76±0.47a	5.62±0.06cd	4.81±0.16a
4	αs2-CN	10.41±0.35ag	9.96±0.36ac	7.64±0.11b	9.95±0.00ac	9.87±0.01ch	8.25±0.05f	15.05±0.21d	12.43±0.08e	8.50±0.10f	10.68±0.05g	10.18±0.11agh	7.31±0.09b
5	αs1-CN	2.87±0.17ab	2.88±0.18ab	2.31±0.37a	2.97±0.02ab	2.79±0.14ab	3.12±0.44bc	3.75±0.23ce	4.54±0.03d	3.86±0.26de	3.98±0.11de	3.45±0.42be	3.71±0.15ce
6	β-CN	27.18±0.58a	27.01±0.47ad	22.21±0.37b	24.88±0.21c	25.83±0.04cd	19.81±0.08e	43.04±0.25f	41.27±0.76g	11.10±0.48h	27.80±0.19aa	27.70±0.70a	9.89±0.07h
7	κ-CN	8.84±0.37af	8.47±0.25ac	8.29±0.02ac	8.02±0.10ac	6.81±0.00b	7.68±0.69bc	12.02±0.18de	12.72±0.57d	11.03±0.21e	9.72±0.31f	9.76±0.07f	11.68±0.42e
8	γ-CN	4.01±0.11a	5.03±0.12bc	/	5.12±0.01bc	4.78±0.15be	/	5.24±0.05cd	5.59±0.35d	/	4.55±0.05ef	4.17±0.04f	/
9*	трака 1	/	/	2.44±0.06a	/	/	2.81±0.02a	/	/	3.80±0.14b	/	/	3.89±0.43b
10*	трака 2	/	/	6.90±0.01a	/	/	7.05±0.28a	/	/	14.12±0.15b	/	/	10.28±0.26c
11	β-LGa	12.17±0.38a	12.57±0.23a	8.81±0.00b	15.04±0.77c	15.24±0.76c	6.78±1.06d	4.40±0.26e	4.91±0.01e	4.02±0.24e	8.58±0.12b	10.30±0.05f	9.30±0.41bf
12	β-LGb	5.09±0.29a	4.74±0.30ab	3.84±0.12bce	4.40±0.31abc	4.17±0.23abc	3.57±0.60ce	/	/	/	6.99±0.52d	6.42±0.50d	2.97±0.29e
13*	трака 3	/	/	2.84±0.27a	/	/	3.15±0.04a	/	/	6.16±0.06b	/	/	2.93±0.35a
14	α-LAa	4.15±0.22af	3.61±0.08a	5.80±0.00b	4.38±0.13ac	4.77±0.03c	7.60±0.87d	6.29±0.27be	6.35±0.03be	6.99±0.01de	4.36±0.24ac	4.16±0.34ac	4.77±0.57cf
15	α-LAb	8.54±0.06a	8.19±0.20ac	3.09±0.03b	7.40±0.34cd	7.17±0.15d	2.87±0.44be	7.48±0.36cd	7.69±0.59ad	2.03±0.32e	7.71±0.06ad	7.31±0.20cd	3.39±0.39b
16*	трака 4	/	/	8.04±0.33a	/	/	7.92±0.15a	/	/	16.47±0.61b	/	/	11.55±0.01c
17		2.89±0.06a	3.63±0.24b	2.61±0.00ae	2.88±0.06a	2.70±0.06ae	2.89±0.08a	2.73±0.44ae	4.50±0.07c	5.66±0.08d	2.44±0.11ae	2.25±0.29e	2.82±0.16a
18*	трака 5	/	/	1.74±0.19a	/	/	3.38±0.17b	/	/	6.26±0.16c	/	/	3.80±0.13d

Вредности у табели представљене су као средња вредност ± стандардна девијација (n = 3). Различита латинична слова у истом реду означавају статистички различите вредности према *Tukey*-евом тесту (p < 0,05). Знак “/” – није детектовано. Болдоване вредности показују удео неспецифичних полипептида у узорцима RMVA, TRMVA, CNVA, TCNVA (у %). Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA - мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.

Прилог 2. Просечан састав казеина (у %) узорака козјег млека, казеина и њихових мешавина са екстрактима *Agaricus blazei* одређен помоћу дензитометријске анализе SDS-R-PAGE електрофореграма, израчунат као % укупних казеина

	RM	RMPA	RMVA	TRM	TRMPA	TRMVA	CN	CNPA	CNVA	TCN	TCNPA	TCNVA
αs2-CN	19.54±0.90a	18.67±0.61ad	18.88±0.21ad	19.54±0.04a	19.71±0.15a	24.22±0.29b	19.03±0.25ad	16.24±0.03c	24.63±0.16b	18.83±0.08ad	18.42±0.03d	22.43±0.44e
αs1-CN	5.38±0.26a	5.40±0.31a	5.71±0.89a	5.83±0.05a	5.58±0.25a	8.04±1.19b	4.74±0.29a	5.93±0.01a	11.19±0.55c	7.02±0.19ab	6.25±0.82ab	11.39±0.56c
β-CN	50.97±0.46a	50.63±1.06ac	54.91±1.08b	48.84±0.33c	51.57±0.25a	50.97±0.15c	54.41±0.35b	53.91±0.55b	32.17±0.80d	49.01±0.35c	50.12±0.81ac	30.34±0.001e
κ-CN	16.57±0.49af	15.88±0.41af	20.51±0.02b	15.75±0.22acf	13.61±0.08c	19.76±1.63be	15.19±0.24ac	16.63±0.89af	32.01±1.20d	17.13±0.54ae	17.66±0.04ef	35.84±1.00g
γ-CN	7.53±0.30ae	9.42±0.27b	/	10.04±0.03c	9.54±0.23bc	/	6.63±0.06d	7.30±0.39a	/	8.02±0.08e	7.54±0.01ae	/

Вредности у табели представљене су као средња вредност ± стандардна девијација (n = 3). Различита латинична слова у истом реду означавају статистички различите вредности према *Tukey*-евом тесту (p < 0,05). Знак “/” – није детектовано. Скраћенице: RM – обезмашћено термички нетретирано козје млеко; RMPA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; RMVA – мешавина обезмашћеног термички нетретираног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; TRM – термички третирано обезмашћено козје млеко; TRMPA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TRMVA – мешавина термички третираног обезмашћеног козјег млека и воденог екстракта *A. blazei*; CN – казеини обезмашћеног термички нетретираног млека; CNPA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; CNVA – мешавина казеина обезмашћеног термички нетретираног млека и воденог екстракта *A. blazei*; TCN – казеини термички третираног обезмашћеног млека; TCNPA – мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и полисахаридног екстракта *A. blazei*; TCNVA - мешавина казеина термички третираног обезмашћеног млека и воденог екстракта *A. blazei*.

Прилог 3. Антиоксидативна својства мешавина са воденим екстрактом *A.blazei* – одговори (зависно променљиве) код фракционог факторијског дизајна (FFD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.4.

Ознака узорка	ABTS (mg Trolox / mL)	FCC (mg EDTA / mL)	FRP ($\mu\text{g AA} / \text{mL}$)
1A	0,712 \pm 0,004	1,755 \pm 0,043	462,073 \pm 10,976
2A	0,173 \pm 0,001	1,003 \pm 0,097	24,268 \pm 1,220
3A	1,351 \pm 0,006	4,803 \pm 0,000	519,390 \pm 1,220
4A	0,694 \pm 0,005	2,021 \pm 0,011	447,439 \pm 1,220
5A	0,564 \pm 0,000	1,087 \pm 0,053	441,951 \pm 0,610
6A	1,953 \pm 0,019	5,369 \pm 0,016	523,049 \pm 14,634
7A	1,488 \pm 0,004	4,949 \pm 0,032	512,073 \pm 14,634
8A	1,114 \pm 0,007	4,884 \pm 0,000	130,976 \pm 6,707
9A	0,713 \pm 0,007	2,235 \pm 0,007	457,195 \pm 7,317
10A	0,573 \pm 0,003	1,476 \pm 0,077	463,902 \pm 0,610
11A	0,222 \pm 0,004	4,350 \pm 0,113	123,659 \pm 7,927
12A	0,231 \pm 0,004	2,024 \pm 0,049	21,829 \pm 1,220
13A	1,105 \pm 0,006	4,811 \pm 0,024	119,390 \pm 7,317
14A	0,167 \pm 0,001	0,985 \pm 0,014	21,829 \pm 0,000
15A	1,120 \pm 0,005	4,930 \pm 0,032	123,049 \pm 4,878
16A	1,931 \pm 0,004	5,454 \pm 0,048	511,463 \pm 21,341
17A	0,578 \pm 0,006	1,331 \pm 0,055	453,537 \pm 20,732
18A	1,968 \pm 0,041	5,390 \pm 0,048	488,293 \pm 4,268
19A	0,885 \pm 0,008	2,122 \pm 0,014	373,049 \pm 17,073
20A	0,228 \pm 0,004	4,494 \pm 0,008	101,098 \pm 3,659
21A	0,238 \pm 0,001	4,206 \pm 0,096	127,317 \pm 4,268
22A	0,166 \pm 0,001	0,962 \pm 0,007	23,049 \pm 2,439
23A	1,477 \pm 0,007	4,598 \pm 0,056	474,878 \pm 18,902
24A	0,238 \pm 0,003	1,981 \pm 0,000	30,366 \pm 4,878
25A	0,239 \pm 0,003	2,059 \pm 0,033	54,146 \pm 5,488
26A	0,829 \pm 0,012	2,317 \pm 0,016	310,244 \pm 9,146
27A	0,866 \pm 0,011	2,300 \pm 0,013	310,244 \pm 14,024

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања ABTS^{•+}; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Прилог 4. Анализа варијанси (ANOVA), фракциони факторијски дизајн – одређивање антиоксидативних својстава мешавина са екстрактом *A. blazei*, кодиране вредности.

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F - вредност	p - вредност
ABTS ($R^2 = 99,84$)						
Главни ефекти	5	8,19467	8,19467	1,63893	2026,99	0,000
w(ME)	1	3,19933	3,19933	3,19933	3956,83	0,000
w(MPP)	1	3,48710	3,48710	3,48710	4312,75	0,000
Т	1	0,03459	0,03459	0,03459	42,77	0,000
t	1	0,51616	0,51616	0,51616	638,38	0,000
pH	1	0,95749	0,95749	0,95749	1184,19	0,000
Интеракције	2	0,60662	0,60662	0,30331	375,13	0,000
w(MPP), Т	1	0,07252	0,07252	0,07252	89,70	0,000
w(MPP), pH	1	0,53410	0,53410	0,53410	660,56	0,000
Превој (закривљење)	1	0,00896	0,00896	0,00896	11,08	0,004
Резидуална грешка	18	0,01455	0,01455	0,00081		
Грешка	18	0,01455	0,01455	0,00081		
Укупно	26	8,82480				
FCC ($R^2 = 99,53$)						
Главни ефекти	5	68,3269	68,3269	13,6654	733,06	0,000
w(ME)	1	0,5947	0,5947	0,5947	31,90	0,000
w(MPP)	1	64,4137	64,4137	64,4137	3455,37	0,000
Т	1	0,0209	0,0209	0,0209	1,12	0,303
t	1	0,1661	0,1661	0,1661	8,91	0,008
pH	1	3,1315	3,1315	3,1315	167,98	0,000
Интеракције	2	0,2027	0,2027	0,1013	5,44	0,014
w(MPP), Т	1	0,0689	0,0689	0,0689	3,69	0,071
w(MPP), pH	1	0,1338	0,1338	0,1338	7,18	0,015
Превој (закривљење)	1	2,5012	2,5012	2,5012	134,17	0,000
Резидуална грешка	18	0,3355	0,3355	0,0186		
Грешка	18	0,3355	0,3355	0,0186		
Укупно	26	71,3663				
FRP ($R^2 = 99,44$)						
Главни ефекти	5	0,682502	0,682502	0,136500	631,65	0,000
w(ME)	1	0,660183	0,660183	0,660183	3054,96	0,000
w(MPP)	1	0,020388	0,020388	0,020388	94,34	0,000
Т	1	0,000034	0,000034	0,000034	0,16	0,697
t	1	0,001709	0,001709	0,001709	7,91	0,012
pH	1	0,000190	0,000190	0,000190	0,88	0,361
Интеракције	2	0,000019	0,000019	0,000009	0,04	0,958
w(MPP), Т	1	0,000018	0,000018	0,000018	0,08	0,779
w(MPP), pH	1	0,000001	0,000001	0,000001	0,01	0,940
Превој (закривљење)	1	0,005197	0,005197	0,005197	24,05	0,000
Резидуална грешка	18	0,003890	0,003890	0,000216		
Грешка	18	0,003890	0,003890	0,000216		
Укупно	26	0,691608				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe; ABTS - способност сакупљања ABTS^{•+}; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺.

Прилог 5. Антиоксидативна својства мешавина са воденим екстрактом *L. sulphureus* – одговори (зависно променљиве) код фракционог факторијског дизајна (FFD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.4.

Ознака узорка	ABTS (mg Trolox / mL)	FCC (mg EDTA / mL)	FRP (µg AA / mL)
1L	0,650 ± 0,021	1,693 ± 0,004	455,976 ± 23,171
2L	0,156 ± 0,001	1,044 ± 0,015	45,000 ± 6,098
3L	1,304 ± 0,051	5,003 ± 0,117	684,024 ± 9,756
4L	0,684 ± 0,013	2,111 ± 0,042	465,122 ± 17,683
5L	0,469 ± 0,001	1,306 ± 0,087	351,098 ± 4,878
6L	1,934 ± 0,010	4,954 ± 0,008	676,098 ± 11,585
7L	1,384 ± 0,076	4,202 ± 0,018	646,829 ± 16,463
8L	1,157 ± 0,001	4,081 ± 0,173	198,049 ± 1,829
9L	0,672 ± 0,005	1,610 ± 0,011	445,000 ± 8,537
10L	0,462 ± 0,004	1,681 ± 0,012	363,293 ± 1,220
11L	0,826 ± 0,015	4,911 ± 0,063	181,585 ± 1,220
12L	0,245 ± 0,001	2,088 ± 0,027	70,000 ± 6,707
13L	1,147 ± 0,004	3,991 ± 0,027	183,415 ± 4,268
14L	0,140 ± 0,002	3,991 ± 0,027	57,195 ± 3,659
15L	1,166 ± 0,003	4,321 ± 0,028	259,634 ± 15,854
16L	1,994 ± 0,049	4,602 ± 0,047	666,341 ± 29,878
17L	0,445 ± 0,006	1,578 ± 0,068	366,341 ± 0,610
18L	2,004 ± 0,051	4,938 ± 0,024	737,073 ± 14,024
19L	0,913 ± 0,004	2,033 ± 0,003	461,463 ± 10,366
20L	0,772 ± 0,022	4,536 ± 0,094	138,902 ± 9,756
21L	0,867 ± 0,027	2,112 ± 0,186	149,268 ± 10,366
22L	0,153 ± 0,001	1,431 ± 0,065	74,268 ± 6,098
23L	1,292 ± 0,078	4,302 ± 0,122	639,512 ± 34,756
24L	0,260 ± 0,002	1,972 ± 0,024	116,341 ± 9,146
25L	0,257 ± 0,001	2,126 ± 0,027	92,561 ± 1,220
26L	0,935 ± 0,016	2,023 ± 0,041	433,415 ± 5,488
27L	0,925 ± 0,004	2,102 ± 0,017	443,780 ± 24,390

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања ABTS^{•+}; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Прилог 6. Анализа варијанси (ANOVA), фракциони факторијски дизајн – одређивање антиоксидативних својстава мешавина са екстрактом *L. sulphureus*, кодиране вредности.

Порекло варијације	Степен слободe	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F - вредност	p - вредност
ABTS ($R^2 = 99,82$)						
Главни ефекти	5	7,68989	7,68989	1,53798	1975,78	0,000
w(ME)	1	1,57495	1,57495	1,57495	2023,27	0,000
w(MPP)	1	5,27861	5,27861	5,27861	6781,21	0,000
Т	1	0,06639	0,06639	0,06639	85,29	0,000
t	1	0,13628	0,13628	0,13628	175,07	0,000
pH	1	0,63367	0,63367	0,63367	814,04	0,000
Интеракције	2	0,18566	0,18566	0,09283	119,25	0,000
w(MPP), Т	1	0,01653	0,01653	0,01653	21,23	0,000
w(MPP), pH	1	0,16913	0,16913	0,16913	217,28	0,000
Превој (закривљење)	1	0,01409	0,01409	0,01409	18,10	0,000
Резидуална грешка	18	0,01401	0,01401	0,00078		
Грешка	18	0,01401	0,01401	0,00078		
Укупно	26	7,90365				
FCC ($R^2 = 79,68$)						
Главни ефекти	5	38,0944	38,0944	7,6189	13,06	0,000
w(ME)	1	0,0789	0,0789	0,0789	0,14	0,717
w(MPP)	1	35,8276	35,8276	35,8276	61,42	0,000
Т	1	0,0686	0,0686	0,0686	0,12	0,736
t	1	1,8816	1,8816	1,8816	3,23	0,089
pH	1	0,2378	0,2378	0,2378	0,41	0,531
Интеракције	2	0,1048	0,1048	0,0524	0,09	0,915
w(MPP), Т	1	0,0394	0,0394	0,0394	0,07	0,798
w(MPP), pH	1	0,0654	0,0654	0,0654	0,11	0,742
Превој (закривљење)	1	2,9670	2,9670	2,9670	5,09	0,037
Резидуална грешка	18	10,4994	10,4994	0,5833		
Грешка	18	10,4994	10,4994	0,5833		
Укупно	26	51,6656				
FRP ($R^2 = 99,20$)						
Главни ефекти	5	0,862066	0,862066	0,172413	436,11	0,000
w(ME)	1	0,681077	0,681077	0,681077	1722,75	0,000
w(MPP)	1	0,142913	0,142913	0,142913	361,49	0,000
Т	1	0,000408	0,000408	0,000408	1,03	0,323
t	1	0,025155	0,025155	0,025155	63,63	0,000
pH	1	0,012513	0,012513	0,012513	31,65	0,000
Интеракције	2	0,002006	0,002006	0,001003	2,54	0,107
w(MPP), Т	1	0,001683	0,001683	0,001683	4,26	0,054
w(MPP), pH	1	0,000323	0,000323	0,000323	0,82	0,378
Превој (закривљење)	1	0,021800	0,021800	0,021800	55,14	0,000
Резидуална грешка	18	0,007116	0,007116	0,000395		
Грешка	18	0,007116	0,007116	0,000395		
Укупно	26	0,892989				

Скраћенице: Seq. SS – секвенцијална сума квадрата (зависи од редоследа параметара); Adj. SS – усклађена сума квадрата (независна од редоследа параметара); Adj. MS – средња вредност квадрата (SeqSS/DF); SS – степен слободe; ABTS - способност сакупљања ABTS²⁺; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺.

Прилог 7. Антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина са воденим екстрактом *A. blazei* – одговори (зависно променљиве) код централног композитног дизајна (CCD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.6.

Назив узорка	ABTS (mg Trolox / mL)	FCC (mg EDTA / mL)	FRP ($\mu\text{g AA} / \text{mL}$)	FC (%)	FS (%)	ESI (min)	EAI (m^2/g)
1A	5,756 \pm 0,010	5,005 \pm 0,051	181,300 \pm 9,386	233,33 \pm 50,00	8,33 \pm 8,33	35,917 \pm 2,330	32,058 \pm 3,044
2A	5,827 \pm 0,031	2,149 \pm 0,010	80,580 \pm 1,706	250,00 \pm 50,00	0	36,977 \pm 1,750	29,294 \pm 1,878
3A	3,730 \pm 0,034	2,166 \pm 0,014	13,521 \pm 0,429	33,33 \pm 16,67	0	32,721 \pm 3,434	35,374 \pm 1,758
4A	5,973 \pm 0,022	2,208 \pm 0,009	101,740 \pm 2,646	33,33 \pm 0	0	53,600 \pm 2,251	15,783 \pm 0,767
5A	5,643 \pm 0,020	2,116 \pm 0,004	101,399 \pm 1,365	316,67 \pm 33,33	0	40,811 \pm 0,702	35,558 \pm 3,017
6A	5,663 \pm 0,031	4,894 \pm 0,019	52,423 \pm 2,901	650,00 \pm 16,67	16,67 \pm 0	28,345 \pm 4,429	44,079 \pm 4,124
7A	5,960 \pm 0,051	2,211 \pm 0,006	92,355 \pm 0,512	616,67 \pm 16,67	16,67 \pm 0	37,931 \pm 2,126	44,770 \pm 2,518
8A	3,910 \pm 0,026	1,930 \pm 0,026	46,280 \pm 2,560	16,67 \pm 0	0	70,974 \pm 16,805	11,484 \pm 0,698
9A	5,806 \pm 0,010	2,161 \pm 0,021	89,795 \pm 0	200,00 \pm 33,33	0	39,127 \pm 5,027	30,768 \pm 1,474
10A	5,509 \pm 0,020	2,099 \pm 0,002	95,256 \pm 1,706	200,00 \pm 16,67	0	44,947 \pm 4,480	29,724 \pm 1,712
11A	5,626 \pm 0,052	2,147 \pm 0,009	134,540 \pm 7,339	225,00 \pm 8,33	16,67 \pm 0	35,008 \pm 4,334	36,787 \pm 1,294
12A	5,069 \pm 0,020	1,882 \pm 0,006	10,956 \pm 0,171	541,67 \pm 41,67	25,00 \pm 8,33	17,879 \pm 0,299	51,034 \pm 1,329
13A	6,042 \pm 0,041	2,203 \pm 0,004	84,164 \pm 1,024	533,33 \pm 33,33	16,67 \pm 0	32,742 \pm 4,711	43,788 \pm 2,892
14A	5,943 \pm 0,052	4,909 \pm 0,003	108,399 \pm 5,888	558,33 \pm 75,00	25,00 \pm 8,33	25,924 \pm 4,472	34,637 \pm 3,986

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања ABTS^{•+}; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺; FC – капацитет пене; FS – стабилност пене; ESI - индекс стабилности емулзије; EAI - индекс активности емулзије; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Прилог 8. Антиоксидативна и техно-функционална својства мешавина са воденим екстрактом *L. sulphureus* – одговори (зависно променљиве) код централног композитног дизајна (CCD); мешавине направљене према реалним вредностима из табеле 4.6.

Назив узорка	ABTS (mg Trolox / mL)	FCC (mg EDTA / mL)	FRP ($\mu\text{g AA}$ / mL)	FC (%)	FS (%)	ESI (min)	EAI (m^2/g)
1L	4,034 \pm 0,041	4,187 \pm 0,007	265,256 \pm 6,485	583,33 \pm 33,33	41,67 \pm 8,33	29,641 \pm 1,154	38,875 \pm 1,638
2L	4,208 \pm 0,011	1,855 \pm 0,004	152,969 \pm 3,413	683,33 \pm 33,33	33,33 \pm 0	23,980 \pm 1,462	45,139 \pm 2,469
3L	3,666 \pm 0,008	1,985 \pm 0,014	32,628 \pm 0,512	41,67 \pm 25,00	0	17,765 \pm 1,451	55,088 \pm 4,356
4L	5,434 \pm 0,075	2,019 \pm 0,004	226,348 \pm 0,341	291,67 \pm 58,33	0	17,609 \pm 2,258	53,061 \pm 6,199
5L	4,143 \pm 0,034	1,881 \pm 0,009	170,034 \pm 1,706	716,67 \pm 50,00	50,00 \pm 0	22,235 \pm 0,908	50,482 \pm 1,772
6L	3,965 \pm 0,036	4,431 \pm 0,051	61,468 \pm 6,143	708,33 \pm 8,33	33,33 \pm 0	22,134 \pm 3,536	39,366 \pm 1,431
7L	3,994 \pm 0,023	1,783 \pm 0,002	134,881 \pm 2,389	733,33 \pm 33,33	33,33 \pm 0	18,644 \pm 1,157	55,640 \pm 3,127
8L	3,805 \pm 0,023	1,729 \pm 0,042	110,610 \pm 4,352	41,67 \pm 8,33	0	114,556 \pm 13,175	11,177 \pm 0,647
9L	4,024 \pm 0,011	1,853 \pm 0,010	155,358 \pm 2,730	633,33 \pm 16,67	33,33 \pm 16,67	24,804 \pm 1,196	45,876 \pm 3,016
10L	4,017 \pm 0,069	1,886 \pm 0,007	180,956 \pm 1,706	683,33 \pm 66,67	33,33 \pm 0	21,235 \pm 1,351	51,342 \pm 2,862
11L	5,883 \pm 0,036	1,996 \pm 0	269,010 \pm 8,191	658,33 \pm 25,00	41,67 \pm 8,33	17,942 \pm 0,483	56,255 \pm 2,369
12L	3,672 \pm 0,029	1,682 \pm 0,021	17,950 \pm 1,281	433,33 \pm 50,00	0	18,240 \pm 1,462	42,744 \pm 3,228
13L	3,902 \pm 0,023	1,794 \pm 0,008	150,580 \pm 3,754	666,67 \pm 33,33	33,33 \pm 0	17,422 \pm 1,033	60,753 \pm 4,376
14L	3,630 \pm 0,052	4,888 \pm 0,010	139,113 \pm 4,949	200,00 \pm 33,33	0	21,875 \pm 1,730	35,374 \pm 3,762

Скраћенице: ABTS - способност сакупљања ABTS^{•+}; FCC - способност хелирања јона Fe²⁺; FRP - способност редукције јона Fe³⁺; FC – капацитет пене; FS – стабилност пене; ESI - индекс стабилности емулзије; EAI - индекс активности емулзије; EDTA - етилендиаминтетрасирћетна киселина; AA – еквиваленти аскорбинске киселине.

Прилог 9. Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Душанка А. Поповић Минић

Број индекса ТХ170002

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 10. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Душанка А. Поповић Минић

Број индекса ТХ170002

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада „Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*“

Ментор проф. др Мирјана Б. Пешић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 11. Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Функционални адитиви на бази протеина козјег млека и екстраката гљива из родова *Laetiporus* и *Agaricus*“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава се умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.