

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana A. Plećić

**MIKROINKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH
JEDINJENJA IZ SEMENKI GROŽĐA SORTE
PROKUPAC I GLJIVE *AGROCYBE AEGERITA*
(V. BRIG.) SINGER I NJIHOVA PRIMENA U
PROIZVODNJI DEHIDRISANIH
PREHRAMBENIH PROIZVODA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERZITET U BEOGRADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Ana A. Plećić

**MIKROINKAPSULACIJA BIOAKTIVNIH
JEDINJENJA IZ SEMENKI GROŽĐA SORTE
PROKUPAC I GLJIVE *AGROCYBE AEGERITA*
(V. BRIG.) SINGER I NJIHOVA PRIMENA U
PROIZVODNJI DEHIDRISANIH
PREHRAMBENIH PROIZVODA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF AGRICULTURE

Ana A. Plećić

**MICROENCAPSULATION OF BIOACTIVE
COMPOUNDS FROM PROKUPAC GRAPE
SEEDS AND *AGROCYBE AEGERITA* (V.
BRIG.) SINGER MUSHROOM AND THEIR
APPLICATION IN THE PRODUCTION OF
DEHYDRATED FOOD PRODUCTS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2026

Mentor

dr Viktor Nedović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Mirjana Pešić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije

dr Danijel Milinčić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Ivana Sredović Ignjatović, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Steva Lević, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Tanja Petrović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Jovana Petrović, viši naučni saradnik

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ – Institut od nacionalnog značaja za Republiku
Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Zahvalica

Najveći deo eksperimenta ove doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Katedre za hemiju i biohemiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimenta je urađen u laboratorijama Katedre za konzervisanje i vrenje, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i Institutu za bološka istraživanja „Siniša Stanković“ (IBISS) – Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu.

*Najveću zahvalnost pri izradi ove doktorske disertacije dugujem **prof. dr Viktoru Nedoviću**, sjajnom mentoru i pedagogu, divnom čoveku sa kojim nemoguće postaje moguće i sa kojim sam naučila da svaki problem ima rešenje. Tokom celog školovanja, od diplomskog i master rada do izade ove disertacije je bio moj vetar u leđa, podrška i neko na koga sam uvek mogla da se oslonim. Hvala na svim pruženim prilikama, saradnjama, projektima, poznanstvima, a pre svega na ukazanom povrenju i veri u mene kao mladog istraživača da ćemo uspešno realizovati sve što smo započeli. Hvala na smehu, šali i svim divnim druženjima koje ću pamtiti. Čast je i zadovoljstvo biti u društvu izvrsnog stručnjaka, sa ogromnim znanjem, koje je nesebično delio sa mnom, a pre svega čovekom koji uvek pruža ruke za pomoć, savet, razgovor i podršku.*

*Ogromnu zahvalnost drugujem **prof. dr Mirjani Pešić**, koja me je pre svega naučila odgovornosti, požrtvovanju, predanosti, posvećenosti, šta znači raditi u timu, i bez koje ova doktorska disertacija ne bi bila uspešno realizovana. Hvala na ogromnom strpljenju u radu sa mnom, znanju koje ste nesebično delili, na svim sugestijama, pohvalama i kritikama koje su bile usmerene na izrastanju mene, kao samostalnog istraživača. Zadovoljstvo je biti njen blizak saradnik ali i velika odgovornost opravdati njena očekivanja i veru u mene. Naučila me je kako funkcioniše veliki kolektiv, kako se uz ogroman trud, volju i želju sve može i sa njom je sve bilo lako! Hvala na svakom danu koji smo proveli zajedno u usavršavanju, radu, razvijaju eksperimenata, šali, smehu, suzama, plaču, a pre svega zdravim životnim pričama i deljenju saveta i iskustava. Velika mi je čast što sam upoznala ženu koja je toliko nadahnuta, posvećena i okrenuta ka studentima i kod koje su vrata za sve uvek otvorena.*

*Veliku zahvalnost dugujem, sada već prijatelju, izvrsnom stručnjaku i znalcu, **dr Danijelu Milinčiću**, za nesebično vreme provedeno u radu sa mnom, učeći me onom najboljem što on poseduje, a to je znanje iz svoje oblasti. Hvala na podršci, razumevanju i rečima koje su mi bile vetar u leđa. Sa njim je svaki dan rada bio poseban, isunjen životnim pričama, dugim razgovorima i savetima koje ću pamtiti. Za njega je svaka reč suvišna. Hvala ti prijatelju!*

*Veliko hvala **svim članovima komisije**, na nesebičnoj podršci, razumevanju, na svim sugestijama i komentarima koje su mi dali i omogućili i pomogli da ova disertacija izgleda baš ovako.*

*Hvala mojim dragim prijateljima i kolegama na bezuslovnoj podršci, razumevanju i bodrenju tokom izrade ove doktorske disertacije. Posebno bih izdvojila mog, sada već velikog prijatelja, **prof. dr Sašu Despotovića**, koji se prema meni ophodio zaštitnički, kao roditelj, i uvek je bio dostupan i tu, da me čuje. Njegove reči ohrabrenja, podrška, vera u mene, razgovori sa osmehom a i sa suzama, su zaista neprocenjivi. Kada sam mislila da ne mogu, kada sam padala, on me je podizao rečima, savetima i primerima. Pored toga, što smo kolege, moja je čast i zadovoljstvo imati jednog takvog čoveka za prijatelja, za ceo život. Veliko hvala na svemu!*

*Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici, mužu **Nenadu**, ocu **Aleksandru**, majci **Milenki**, bratu **Božu**, dedi i baki, što su verovali u mene, gurali me napred njihovom podrškom, razumevanjem, savetima i bez čijeg oslonca ne bih uspela. Hvala na neizmernoj ljubavi, osmehu*

na mom licu, podizanju kada padnem, smehu, suzama, lepim i teškim trenucima. Bez vas bi sve bilo teško, sa vama je sve lako. Hvala Bogu što vas imam.

Beograd, 2026

*Autor
Ana Plečić*

Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja iz semenki grožđa sorte Prokupac i gljive *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer i njihova primena u proizvodnji dehidrisanih prehrambenih proizvoda

Sažetak

Predmet istraživanja predviđen izradom ove doktorske disertacije je formulisanje i optimizacija novog funkcionalnog sastojka na bazi termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka obogaćenog ekstraktom gljive *A. aegerita* (ME) i ekstraktom semenke grožđa sorte Prokupac (GPE), namenjenog za primenu u prehrambenoj industriji, i koji je testiran u modelu dehidrisane supe. Centralni kompozitni dizajn (CCD) je primenjen za preliminarnu optimizaciju i formulaciju zasnovanu na antioksidativnim svojstvima. Optimizovani sastojak je pokazao poboljšanu antioksidativnu aktivnost, pri čemu je GPE identifikovan kao dominantni faktor koji utiče na odgovore. ATR-FTIR spektri su bili dominantno određeni jedinjenjima mleka, dok su DLS i elektroforetska analiza ukazale na strukturne modifikacije, uključujući polimodalnu raspodelu veličine čestica i promene u proteinskom profilu, što upućuje na interakcije između mlečnih proteina, fenolnih jedinjenja i jedinjenja poreklom iz gljive. UHPLC-QToF-MS analiza potvrdila je visok sadržaj fenolnih jedinjenja poreklom iz grožđa. Nakon simulirane gastrointestinalne digestije, nekoliko fenolnih jedinjenja detektovano je u rastvorljivoj frakciji, pri čemu su katehin i etil-galat pokazali najveću biodostupnost (12,58 % i 4,54 %). Obogaćeni sastojak pokazao je izmenjena tehno-funkcionalna svojstva, uključujući smanjen emulzioni kapacitet, ali poboljšano ponašanje pri penjenju, što se može pripisati strukturnim promenama proteina i međumolekulskim interakcijama. Primena u modelu dehidrisane supe pokazala je dobru rastvorljivost, stabilnost i visoku senzornu prihvatljivost, bez negativnog uticaja na ukus. Razvijena formulacija predstavlja perspektivan prirodni funkcionalni sastojak koji objedinjuje poboljšana bioaktivna svojstva i zadovoljavajuće tehnološke karakteristike.

Ključne reči: mikroinkapsulacija, bioaktivna jedinjenja, semenka, Prokupac, *Agrocybe aegerita*, kozje mleko, funkcionalni sastojak, biodostupnost, dehidrisane supe

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Nauka o konzervisanju i vrenju

UDK broj: 66.040.82:664.8.047]:[634.8+635.8(043.3)

Microencapsulation of bioactive compounds from Prokupac grape seeds and *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer mushroom and their application in the production of dehydrated food products

Abstract

The subject of this doctoral dissertation was to formulate and optimize a novel functional ingredient based on thermally treated skimmed goat milk enriched with *A. aegerita* mushroom extract (ME) and grape pomace seed extract (GPE), intended for application food industry, and tested in a dehydrated soup model. A central composite design (CCD) was applied for preliminary optimization and the formulation based on antioxidant properties. The optimized ingredient exhibited enhanced antioxidant activity, with GPE identified as the dominant factor influencing the responses. ATR-FTIR spectra were dominated by milk compounds, while DLS and electrophoretic analysis revealed structural modifications, including polymodal particle size distribution and alterations in the protein profile, indicating interactions between milk proteins, polyphenols, and mushroom-derived compounds. UHPLC-QToF-MS analysis confirmed a high content of grape-derived phenolic compounds. Following simulated gastrointestinal digestion, several phenolic compounds were detected in the soluble fraction, with catechin and ethyl gallate exhibiting the highest bioaccessibility (12.58 % and 4.54 %). The enriched ingredient showed modified techno-functional properties, including reduced emulsifying capacity but improved foaming behavior, which was attributed to protein structural changes and intermolecular interactions. Application in a dehydrated soup model demonstrated good solubility, stability, and high sensory acceptability without negative effects on flavor. The developed formulation represents a promising natural functional ingredient, combining enhanced bioactive properties with satisfactory technological performance.

Keywords: microencapsulation, bioactive compounds, seed, Prokupac, *Agrocybe aegerita*, goat milk, functional ingredient, bioaccessibility of phenolic compounds, dehydrated soups

Scientific field: Technological Engineering

Scientific subfield: The science of food preservation and fermentation

UDC: 66.040.82:664.8.047]:[634.8+635.8(043.3)

Sadržaj

1	UVOD	1
2	Pregled literature	3
2.1	Anatomija vinove loze	3
2.2	Komina grožđa sorte Prokupac i semenke kao izvor bioaktivnih jedinjenja	4
2.2.1	Komina kao nis-proizvod vinske industrije i njen sastav	4
2.2.2	Hemijski sastav semenke grožđa	5
2.2.3	Fenolna jedinjenja semenke grožđa	6
2.2.3.1	Fenolne kiseline	6
2.2.3.2	Flavonoidi	7
2.2.4	Bioaktivna svojstva fenolnih jedinjenja iz semenke grožđa	9
2.3	Osnovne biološke i morfološke karakteristike gljiva.....	11
2.4	Taksonomija, opšte karakteristike, hemijski sastav i bioaktivna svojstva <i>A. aegerita</i>	12
2.4.1	Taksonomija i opšte karakteristike vrste <i>A. aegerita</i>	12
2.4.2	Hemijski sastav plodonosnog tela <i>A. aegerita</i>	13
2.4.3	Bioaktivne komponente i biološka aktivnost <i>A. aegerita</i>	14
2.5	Kozje mleko: hemijski sastav, tehno-funkcionalna svojstva i uticaj termičke obrade.....	15
2.5.1	Hemijski sastav kozjeg mleka i nutritivne karakteristike	16
2.5.2	Tehno-funkcionalna svojstva proteina kozjeg mleka.....	18
2.5.3	Uticaj termičke obrade na sastav i svojstva kozjeg mleka.....	19
2.6	Dizajn eksperimenta i optimizacija formulacije	20
2.7	Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja – značaj i tehnike (sprej-sušenje i liofilizacija)	21
2.7.1	Značaj mikroinkapsulacije u prehrambenoj industriji	21
2.7.2	Tehnike mikroinkapsulacije	22
2.7.2.1	Sprej-sušenje (spray-drying)	22
2.7.2.2	Liofilizacija (freeze-drying)	23
2.7.3	Proteini kozjeg mleka kao nosači za mikroinkapsulaciju	25
2.8	Prehrambeni proizvodi na bazi mleka obogaćeni bioaktivnim komponentama iz gljiva i semenki grožđa	27
2.9	<i>In vitro</i> digestija i biodostupnost bioaktivnih komponenata u složenim matriksima na bazi proteina kozjeg mleka	33
3	MATERIJAL I METODE	35
3.1	Priprema polaznih sirovina i ekstrakata	35
3.1.1	Priprema vodenog ekstrakta gljive.....	35
3.1.2	Priprema ekstrakta semenke grožđa.....	35
3.1.3	Priprema termički tretiranog obezmašćenog mleka, kazeinske frakcije i frakcije serum proteina	35
3.2	Karakterizacija polaznih ekstrakata	36

3.2.1	Karakterizacija vodenog ekstrakta gljive	36
3.2.1.1	Određivanje ukupnog sadržaja proteina	36
3.2.1.2	Određivanje sadržaja ukupnih glukana	36
3.2.1.3	Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC)	36
3.2.1.4	Antioksidativna svojstva	36
3.2.1.4.1	Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona (redukujuća moć) (FRP)	36
3.2.1.4.2	Sposobnost sakupljanja $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikal katjona ($\text{ABTS}^{\bullet+}$ test)	37
3.2.1.4.3	Sposobnost sakupljanja $\text{DPPH}^{\bullet}$ radikala ($\text{DPPH}^{\bullet}$ test)	37
3.2.1.4.4	Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona (CHE)	37
3.2.1.5	Proteinski profil vodenog ekstrakta gljive (elektroforetska analiza)	37
3.2.1.6	ATR-FTIR spektroskopija	38
3.2.1.7	Fenolni profil (hromatografska analiza)	38
3.2.2	Karakterizacija ekstrakta semenke grožđa	39
3.2.2.1	UHPLC QToF-MS karakterizacija fenolnih jedinjenja	39
3.2.2.2	Antioksidativna svojstva	39
3.2.3	Karakterizacija proteinskih frakcija kozjeg mleka	39
3.2.3.1	Tehno-funkcionalna svojstva	39
3.2.3.1.1	Emulgujuća svojstva	39
3.2.3.1.2	Peniva svojstva	40
3.2.3.2	Elektroforetska analiza proteina	40
3.3	Dizajn eksperimenta i optimizacija formulacija mikroinkapsulata	40
3.3.1	Priprema različitih formulacija mikroinkapsulata	41
3.3.2	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva pripremljenih formulacija mikroinkapsulata	42
3.4	Fizičko-hemijska karakterizacija optimizovane formulacije mikroinkapsulata	42
3.4.1	Određivanje sadržaja glukana	42
3.4.2	ATR-FTIR analiza	42
3.4.3	Raman spektroskopija	42
3.4.4	DLS merenja zeta (ζ) potencijala i veličina čestica	43
3.4.5	Elektroforetska analiza	43
3.4.6	SEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija	43
3.4.7	UHPLC-Q-ToF-MS analiza	43
3.4.8	Rastvorljivost prahova	44
3.4.9	Sadržaj vode	44
3.4.10	Aktivnost vode (a_w vrednost)	44
3.4.11	Kvašljivost prahova	44
3.4.12	Nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost prahova	44
3.5	Tehno-funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata	45
3.5.1	Emulgujuća i peniva svojstva	45

3.5.2	Kapacitet zadržavanja vode/ulja	45
3.6	Funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata	46
3.6.1	Antioksidativna svojstva i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja	46
3.7	Antimikrobna svojstva	46
3.7.1	Mikroorganizmi	46
3.7.2	Antibakterijska aktivnost	46
3.7.3	Antifungalna aktivnost	46
3.8	Biodostupnost fenolnih jedinjenja u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata	47
3.8.1	Simulirana <i>in vitro</i> gastrointestinalna digestija i biodostupnost fenolnih jedinjenja	47
3.8.2	UHPLC QToF-MS analiza digestovanih uzoraka	47
3.8.3	Antioksidativna svojstva nakon <i>in vitro</i> GID	47
3.8.4	Antimikrobna aktivnost nakon <i>in vitro</i> GID	48
3.8.5	Elektroforetska analiza nakon <i>in vitro</i> GID	48
3.9	Model dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane formulacije mikroinkapsulata	48
3.9.1	Fizičko-hemijska karakterizacija funkcionalne dehidrisane supe	48
3.9.2	Senzorna analiza funkcionalne dehidrisane supe	49
3.9.2.1	Ukupna ocena kvaliteta	49
3.9.2.2	Ocena prihvatljivosti od strane potrošača	49
3.10	Statistička analiza	49
4	REZULTATI I DISKUSIJA	50
4.1	Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja vodenog ekstrakta gljive	50
4.1.1	Ukupan sadržaj proteina u liofilisanom vodenom ekstraktu <i>A. aegerita</i>	50
4.1.2	Ukupan sadržaj α - i β -glukana u liofilisanom vodenom ekstraktu <i>A. aegerita</i>	50
4.1.3	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u liofilisanom vodenom ekstraktu <i>A. aegerita</i>	51
4.1.4	Procena antioksidativnih svojstava	51
4.1.5	Proteinski profil vodenog ekstrakta <i>A. aegerita</i>	52
4.1.6	ATR-FTIR spektroskopija vodenog ekstrakta <i>A. aegerita</i>	53
4.1.7	UHPLC-QToF-MS karakterizacija bioaktivnih jedinjenja u vodenom ekstraktu <i>A. aegerita</i>	54
4.2	Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja ekstrakta semenke grožđa	57
4.2.1	UHPLC-QToF-MS karakterizacija fenolnih jedinjenja ekstrakta semenke Prokupca	57
4.2.2	Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakta semenke Prokupca	64
4.3	Karakterizacija termički tretiranog i sirovog kozjeg mleka i njihovih proteinskih frakcija	65
4.3.1	Tehno-funkcionalna svojstva obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka i njegovih frakcija	65
4.3.2	Elektroforetska karakterizacija termički tretiranog i sirovog kozjeg mleka i njihovih proteinskih frakcija	67
4.4	Dizajn eksperimenta (DoE) i centralni kompozitni dizajn (CCD)	68

4.4.1	Multiparameterska optimizacija – funkcija poželjnosti	72
4.5	Fizičko-hemijska karakterizacija optimizovane formulacije mikroinkapsulata	74
4.5.1	Ukupan sadržaj glukana	74
4.5.2	ATR-FTIR analiza optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	74
4.5.3	Raman spektroskopija optimizovane formulacije mikroinkapsulata	75
4.5.4	Merenja dinamičkog rasejanja svetlosti – DLS	77
4.5.5	Elektroforetska analiza optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	78
4.5.6	SEM mikroskopija optimizovane formulacije mikroinkapsulata	79
4.5.7	UHPLC-Q-ToF-MS analiza ekstrakata optimizovane formulacije mikroinkapsulata	80
4.5.8	Rastvorljivost praha optimizovane formulacije mikroinkapsulata	86
4.5.9	Sadržaj vlage i aktivnost vode optimizovane formulacije mikroinkapsulata	86
4.5.10	Kvašljivost praha optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	87
4.5.11	Nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	87
4.6	Tehno-funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata	88
4.6.1	Emulgujuća i peniva svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata	88
4.6.2	Kapacitet zadržavanja vode/ulja	90
4.7	Funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	91
4.7.1	Procena antioksidativne aktivnosti optimizovane formulacije mikroinkapsulata.....	91
4.7.2	Antimikrobna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata	93
4.7.2.1	Antibakterijska aktivnost	93
4.8	<i>In vitro</i> gastrointestinalna digestija optimizovane formulacije mikroinkapsulata i biodostupnost fenolnih jedinjenja	97
4.9	Procena antioksidativne aktivnosti digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon <i>in vitro</i> GID	98
4.10	Procena antimikrobne aktivnosti digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon <i>in vitro</i> GID	100
4.11	Proteinski profil digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon <i>in vitro</i> GID	102
4.12	Fizičko-hemijska karakterizacija dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane funkcionalne formulacije mikroinkapsulata	103
4.13	Senzorna analiza dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane funkcionalne formulacije mikroinkapsulata.....	104
4.13.1	Ukupna ocena kvaliteta	105
4.13.2	Ocena prihvatljivosti od strane potrošača	107
5	Zaključak.....	109
6	Literatura.....	112
7	Prilozi.....	138
7.1	Tabele	138

7.2	Slike	146
8	Biografija autora	148
9	Izjava o autorstvu.....	149
10	Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	150
11	Izjava o korišćenju	151

1 UVOD

Dokazano je da su bioaktivna jedinjenja hemijski nestabilna, odnosno da podležu promenama, degradaciji, migraciji, i takođe, da njihova osetljivost na kiseonik, svetlost, temperaturu, vlagu i pH vrednost sredine tokom skladištenja, prerade hrane ili transporta može dovesti do gubitka njihove bioaktivnosti (Ranveer et al., 2016; Kalušević, 2017a; Salević et al., 2018). U ovom radu, fenolna jedinjenja, koja su ekstrahovana iz semenki grožđa su takođe podložna uticaju pomenutih faktora (Kalušević, 2017a), dok se neki ekstrakti gljiva, pored osetljivosti na visoke temperature, kiseonik i svetlost, odlikuju i jakim mirisom i ukusom (Ribeiro et al., 2015a).

Stoga, kako bi se očuvala funkcionalnost pomenutih ekstrakata bioaktivnih jedinjenja, primenjuje se proces inkapsulacije (Nedović et al., 2011; Kalušević, 2017a; Salević et al., 2018). Inkapsulacija se može definisati kao proces „pakovanja“ aktivnih komponenata unutar određenih materijala (nosača) ili formiranja fizičke barijere koja štiti bioaktivne komponente od nepoželjnih uticaja spoljašnje sredine, primenom odgovarajućih materijala (nosača) kao i različitih tehnika inkapsulacije, čime se poboljšava njihova stabilnost i održivost (Nedović et al., 2013; Salević et al., 2018; Lević. 2014a).

Poznato je da plodonosna tela makromiceta predstavljaju bogat izvor proteina, dijetetskih vlakana, esencijalnih amino-kiselina, vitamina i minerala. Pored toga, izvor su biološki aktivnih jedinjenja, kao što su polisaharidi, biološki aktivni proteini (enzimi, lektini), ergotionein (amino-kiselina), steroli, terpenoidi i dr. Ova jedinjenja doprinose poboljšaju imunološke funkcije i pokazuju: antimikrobna, antitumorska, antioksidativna, antiinflamatorna, hipoglikemična, hipoholesterololemična svojstva (Rengel-Vargas et al., 2021; Popović Minić et al., 2023; Landi et al., 2017). Prirodan izvor navednih komponenata mogu biti plodonosna tela jestive gljive *Agrocybe aegerita*, u Srbiji poznatija kao jablanovača.

Utvrđeno je da od ukupne težine grožđa, 10 do 30 % čine sporedni proizvodi (komina, pokožica, peteljka i seme) koji zaostaju nakon tradicionalnog načina proizvodnje vina (Milinčić et al., 2021a). Semenke grožđa, pored fenolnih jedinjenja, sadrže značajne količine lipida, proteina, dijetetskih vlakana i minerala (Yu & Ahmedna, 2013). Količina fenolnih jedinjenja u plodu varira, pri čemu semenska sadrži približno 60-70 % ukupnih rastvorljivih fenolnih jedinjenja, pokožica oko 28-35 %, dok pulpa samo oko 10 % (Pantelić et al., 2016). Utvrđeno je da fenolna jedinjenja ispoljavaju antioksidativno, kardioprotektivno, antiinflamatorno, antimikrobno, antikancerogeno dejstvo na ljudski organizam (Pintać et al., 2018). U radu Milinčić et al. (2021b) je pokazano da ekstrakt semenke grožđa Prokupac sadrži 35 fenolnih jedinjenja od kojih su najzastupljeniji fenolne kiseline i njeni derivati, flavan-3-oli i procijanidini.

Kozje mleko se koristi za proizvodnju velikog broja prehrambenih proizvoda, kao što su, UHT mleko, fermentisani proizvodi (mlačenica, sir, smrznuti jogurt, jogurt), konditorski proizvodi, sladoled, puter, kondenzovani/sušeni proizvodi i bombone (Verruck et al., 2019). Zbog visokog sadržaja nutritivnih i bioaktivnih komponenti, koristi se kao odlična osnova za razvoj inkapsulata i velikog broja inovativnih proizvoda koji promovišu zdravlje (Verruck et al., 2019).

U literaturi ne postoje podaci vezani za antioksidativna, antimikrobna i tehno-funkcionalna svojstva mikroinkapsulata koji predstavljaju kombinaciju ekstrakta makrogljive *A. aegerita* i ekstrakta semenke grožđa sorte Prokupac, na nosaču poput obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka ili njegovih proteinskih frakcija, kao i njihove primene u dehidrisanim prehrambenim proizvodima. Iz tog razloga, cilj ovog istraživanja je proizvodnja optimizovanih formulacija mikroinkapsulata (prahova), obogaćenih ekstraktom semenki grožđa Prokupca i ekstraktom jestive gljive jablanovače,

na nosaču kao što je obezmašćeno termički tretirano kozje mleko ili njegove proteinske frakcije. Da bi se postigao glavni cilj, urađeno je sledeće:

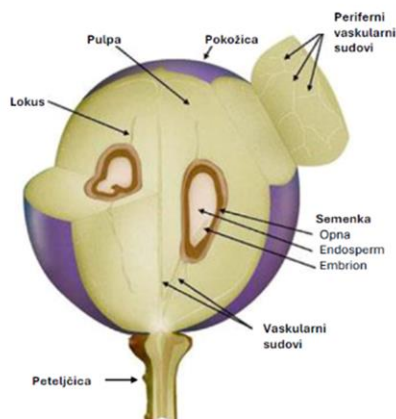
- biohemijska karakterizacija proteina obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka i njegovih frakcija (kazeina i serum proteina), polaznih ekstrakata gljive *A. aegerita* sa posebnim fokusom na proteine i glukane, kao i polifenolna karakterizacija ekstrakta semenke autohtone sorte Prokupac;
- optimizacija sastava formulisanih mikroinkapsulata (prahova) na bazi obezmašćenog kozjeg mleka, tako da poseduju najbolja antioksidativna svojstva;
- određivanje tehno-funkcionalnih svojstava (peniva i emulgujuća svojstva), i antimikrobna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata;
- fizičko-hemijska karakterizacija optimizovanih dobijenih formulacija mikroinkapsulata;
- procena *in vitro* digestibilnosti i biodostupnosti fenolnih jedinjenja optimizovane formulacije mikroinkapsulata;
- potencijalna primena optimizovane formulacije mikroinkapsulata u formulaciji dehidrisanih prehrambenih proizvoda.

Od ovog ispitivanja se očekuje da će optimizovana formulacija mikroinkapsulata sa dodatkom ekstrakata gljive jablanovače i fenolnih jedinjenja iz semenki fermentisane komine na bazi obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka ili njegovih proteinskih frakcija, posedovati poboljšana antioksidativna, antimikrobna i tehno-funkcionalna svojstva. Pored toga, očekuje se da poseduju dobru funkcionalnost nakon *in vitro* digestije i poboljšanu biodostupnost fenolnih jedinjenja, i da njihova direktna primena u formulaciji dehidrisanih prehrambenih proizvoda, tj. dehidrisanih supa, utiče na poboljšanje funkcionalnosti ovih proizvoda.

2 Pregled literature

2.1 Anatomija vinove loze

Grozđ vinove loze se sastoji od glavne ose i dva istaknuta, te tri ili četiri manje razgranata ogranka, a završava se peteljčicama koje nose bobice (Zoffoli & Latorre, 2011). Bobica grožđa je mesnat i sočan plod koji je razvijen iz jednog jajnika, nakon spajanja dva ploda okružena zidom jajnika (Zoffoli & Latorre, 2011). Bobice čine oko 97 % mase grozda, dok šepurina (peteljka) čini preostalih 3 %. Tip grozda, kao i njegova struktura zavise od sorte vinove loze, pa se može reći da su kod stonih sorti grožđa, grozdovi veći i rastresiti, dok su kod vinskih sitniji i zbijeni (Venkitasamy et al., 2019). Plodovi grožđa su u obliku okruglih ili duguljastih bobica koje se sastoje iz tri osnovna dela: egzokarpa (pokožica), mezokarpa (pulpa) i endokarpa (semenka i tkivo oko semenki) (Zoffoli & Latorre, 2011) (Slika 2.1). Pokožica se sastoji od hipodermisa i epidermisa u čijim ćelijama se akumuliraju fenolna jedinjenja (antocijani), pigmenti koji su zaslužni za stvaranje crvene, plave, ljubičaste i tamno ljubičaste boje grožđa, hlorofil, kao i jedinjenja koja doprinose ukusu i aromi (Zoffoli & Latorre, 2011; Venkitasamy et al., 2019). Pulpa (mesnati deo) čini skoro 80 % ukupne težine bobice i glavni je izvor vode, šećera (glukoza i fruktoza) koji određuju sočnost ploda, kao i organskih jedinjenja (Zoffoli & Latorre, 2011; Ollat et al., 2002). Najveći sadržaj fenolnih jedinjenja i ulja je skoncentrisan u semenkama grožđa sa dokazanom antioksidativnom i antimikrobnom aktivnošću (Krasteva et al., 2023; Feei Ma & Zhang, 2017).



Slika 2.1. Delovi bobice grozda (modifikovano sa <https://grapes.extension.org/basic-grape-berry-structure/>)

Grožđe predstavlja bogat izvor hranljivih sastojaka, pa se koristi u različite svrhe. Može se konzumirati kao sveže voće, ali zbog osetljivosti na mikrobiološki kvar, uglavnom se prerađuje u suvo grožđe, vino, džem, sok, žele, sirće, ili, ekstrakt semenke grožđa bogat fenolnim jedinjenjima. Takođe, nusproizvodi prerade grožđa, poput semenki i komine, koriste se za dobijanje ulja, dijetetskih suplemenata i bioaktivnih jedinjenja kao funkcionalnih sastojaka hrane (Pintać et al., 2018; Venkitasamy et al., 2019).

Na našim prostorima, od autohtonih belih vinskih sorti, izdvajaju se Smederevka, Tamjanika, Graševina, Banatski riesling, a od autohtonih crnih sorti, najznačajnije su: Prokupac, Vranac, Slankamenka, Kavčina (Tomić et al., 2017; Simonovic et al., 2019).

2.2 Komina grožđa sorte Prokupac i semenke kao izvor bioaktivnih jedinjenja

U savremenim istraživanjima sve više pažnje se posvećuje valorizaciji nusproizvoda prehrambene industrije, među kojima komina grožđa zauzima posebno mesto zbog visokog sadržaja bioaktivnih jedinjenja, naročito fenolnih jedinjenja (Sabra et al., 2021; Milinčić, et al., 2022; Rodrigues Machado et al., 2023; Abreu et al., 2024; Almanza-Oliveros et al., 2024). Iako postoji veliki broj studija koje se bave ekstrakcijom i primenom fenolnih jedinjenja iz internacionalnih sorti grožđa (crvenih i belih), podaci o autohtonim sortama, kao što je Prokupac, su i dalje ograničeni. Upravo iz tog razloga, izbor grožđa sorte Prokupac za istraživanje u okviru ove doktorske disertacije predstavlja doprinos očuvanju nacionalnog potencijala i promociji lokalnih sorti u skladu sa principima održivog razvoja i cirkularne ekonomije. Prokupac, kao autohtona srpska sorta sa tradicijom uzgoja u vinorodnoj Župi, prepoznata je kao vredan izvor fenolnih jedinjenja koje je moguće efikasno ekstrahovati iz semenki i dalje koristiti za formulisanje funkcionalnih prehrambenih proizvoda. Pored centralne Srbije, Prokupac se gaji i na području Kosova i Metohije, u delu Vojvodine, Bugarske, Makedonije i u Ruskoj Federaciji (Avramov & Žunić, 2001). Postoji više lokalnih sinonima za ovu sortu: Rskavac, Kameničarka, Niševka, Crnka, Prokupka, Zarčin, Skopsko Crno (Garić et al., 2024; Utvić et al., 2024). Danas se najveće površine pod Prokupcem nalaze u centralnoj Srbiji, posebno u vinogradarskom rejonu Tri Morave, sa naglašenom koncentracijom u čuvenom Župskom vinogorju. U poređenju sa ostalim autohtonim sortama, Prokupac je i dalje najzastupljenija lokalna sorta u Srbiji (Utvić et al., 2024).

2.2.1 Komina kao nis-proizvod vinske industrije i njen sastav

Vinska industrija generiše značajne količine nusproizvoda u procesu proizvodnje vina, što rezultira ogromnom količinom otpada na globalnom nivou. Jedan od glavnih nusproizvoda je komina grožđa koja čini 20-30 % ukupne mase grožđa (Karastergiou et al., 2024). Ako se adekvatno ne procesuirati, dovodi do negativnih ekoloških i ekonomskih uticaja, zagađenja voda, degradacije zemljišta, oštećenja vegetacije, potrošnje energije i oslobađanja neprijatnih gasova i mirisa (Caponio et al., 2023). Zbog toga je neophodno razviti ekološki prihvatljive metode valorizacije komine grožđa i njenog iskorišćenja i upotrebe kako u prehrambenoj, tako i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Proces dobijanja komine se može razlikovati u zavisnosti od tehnologije proizvodnje vina. Kod crvenih vina, komina se dobija nakon fermentacije kljuka (tzv. fermentisana komina), dok se kod belih vina grožđe presuje pre fermentacije, pa komina delimično sadrži nefermentisani sok i šećere. Zbog toga nefermentisana komina (tipično iz proizvodnje belih vina) sadrži više zaostalog šećera, dok fermentisana komina (iz crvenih vina) ima veći udeo alkohola i ekstraktivnih materija iz procesa vrenja (Muhlack et al., 2017). Nakon prerade, značajna količina bioaktivnih jedinjenja, tj. oko 70 % sadržaja fenolnih jedinjenja se zadržava u komini grožđa (Beres et al., 2017).

Zahvaljujući bogatom hemijskom sastavu komine i njenih konstituenata, u novije vreme raste interesovanje za njenu valorizaciju, odnosno za pronalaženje načina da se ova sirovina iskoristi u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda i sastojaka visoke nutritivne vrednosti, obogaćenih bioaktivnim jedinjenjima, čineći ih funkcionalnim namirnicama sa antioksidativnim, antiinflamatornim, kardioprotektivnim, antimikrobnim i antikancerogenim svojstvima (Caponio et al., 2023). Kominu, koja predstavlja čvrsti ostatak koji ostaje nakon ceđenja i/ili fermentacije grožđa, čine pokožica (~50 %), semenka (~25 %) i peteljka (~25 %) (Feei Ma & Zhang, 2017; Ferrer-Gallego & Silva, 2022; Karastergiou et al., 2024; Lopes et al., 2025) (Slika 2.2). U hemijskom sastavu komine dominiraju polisaharidi (uglavnom dijetetska vlakna) sa ~43-75 %, ugljeni hidrati ~25 %, uz udeo proteina od ~6-15 %, lipida i širok spektar fenolnih jedinjenja (Silva et al., 2024). Ponaosob, svaki konstituent komine se karakteriše različitim hemijskim sastavom, kao i bogatim profilom različitih fenolnih jedinjenja. S obzirom na to da je semenka grožđa komponenta koja je korišćena u

eksperimentalnom radu, u nastavku će detaljno biti opisan hemijski sastav i profil fenolnih jedinjenja kojima ona obiluje.



Slika 2.2. (a) Fermentisana komina grožđa sorte Prokupac (lična arhiva); (b) Semenke grožđa sorte Prokupac izdvojene iz fermentisane komine (lična arhiva)

2.2.2 Hemijski sastav semenke grožđa

Semenke čine značajan deo komine grožđa i zauzimaju 2 - 5% težine grožđa, što približno čini 38-52% mase komine (u zavisnosti od sorte i načina prerade) (Beres et al., 2017). Sa hemijskog aspekta, semenke obiluju u sadržaju ulja i predstavljaju dobar izvor fenolnih jedinjenja. Ulje semenki grožđa, bogato je nezasićenim masnim kiselinama, pre svega linolnom (61,15 % - 83,47 %), uz manji udeo oleinske kiseline (6,14 % - 9,72 %). Među zasićenim masnim kiselinama izdvajaju se palmitinska (3,36 % - 7,94 %) i stearinska kiselina (4,10 % - 8,27 %) (Milinčić et al., 2020). Ranija istraživanja su pokazala da, kada je reč o brašnu semenki grožđa sorte Prokupac, linolna kiselina se takođe izdvaja kao dominantna masna kiselina sa sadržajem od $61,15 \pm 0,36$ %, uz udeo oleinske kiseline od $9,72 \pm 0,24$ %, uz relativno visok sadržaj palmitinske ($7,94 \pm 0,18$ %) i stearinske ($8,27 \pm 0,13$ %) kiseline, dok je odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina brašna semenki grožđa iznosio oko 3,63 (Milinčić et al., 2020). U obezmašćenom brašnu semenki Prokupca izdvojenih iz nefermentisane komine identifikovano je 15 rastvorljivih šećera, ukupne koncentracije ~ 73 mg/kg, pri čemu su saharoza, fruktoza i glukoza najzastupljenije (Milinčić et al., 2020). Koncentracija navedenih šećera u brašnu semenke najčešće varira i zavisi od kontakta semenke sa pulpom tokom procesuiranja grožđa. Osim lipida, semenke su dobar izvor fenolnih jedinjenja. Dosadašnja ispitivanja pokazuju da se oko 60-70 % ukupnih rastvorljivih fenolnih jedinjenja nalazi u semenkama (Pantelić et al., 2016; Karastergiou et al., 2024).

Stoga, komina koja sadrži semenke poseduje značajan sadržaj bioaktivnih sastojaka poput proantocijanidina (kondenzovanih tanina) i flavan-3-ola (monomera katehina i epikatehina). Semenke takođe sadrže galnu kiselinu i njene derivate, kao i flavonole i fenolne kiseline u manjim količinama. Među identifikovanim jedinjenjima utvrđen je i značajan sadržaj etil-galata (fermentisana komina Prokupca) (Milinčić et al., 2021a). Uz fenolna jedinjenja, semenke sadrže i oko 40 % vlakana, 10 % proteina, kao i šećere i minerale (Antonić et al., 2020). Nesvarljive frakcije, uglavnom celuloza i pektini čine oko 80 % suve materije bez šećera (Beres et al., 2017). Tokoferoli takođe mogu biti prisutni u semenkama grožđa, a njihov sadržaj varira u zavisnosti od sortnih karakteristika grožđa i metoda ekstrakcije. Prosečan sadržaj tokoferola se kreće od 265-454 mg/kg. Semenke su bogate i fitosterolima, od kojih je najzastupljeniji β -sitosterol (~ 65 %), zatim stigmasterol (~ 15 %), kampesterol (~ 10 %) i sitostanol (~ 4 %). Njihova pozitivna uloga u ljudskom organizmu se odnosi na kardiovaskularne i metaboličke procese zbog njihove izrazite sposobnosti da snižavaju nivo holesterola u krvi (Caponio et al., 2023). Pored toga postoji značajna količina i drugih bioaktivnih jedinjenja sa dokazanim antioksidativnim i antikancerogenim dejstvom (Antonić et al., 2020), kao i mineralnih materija koncentrisanih u semenkama, poput, kalcijuma, fosfora, sumpora i magnezijuma

(Garcia-Lomillo & Gonzalez-SanJose, 2017). Značajno je da kalcijum u komini, više potiče iz semenki nego pokožice. Barriga-Sanchez et al. (2022)., su pokazali da semenke sadrže ~137 mg Ca/100g, dok komina u celini sadrži ~46 mg Ca/100g. S obzirom na bogat hemijski sastav, semenke predstavljaju najvredniji deo komine za dobijanje ulja iz semenki grožđa koji se ceni u kulinarstvu i kozmetici zbog visokog sadržaja nezasićenih masnih kiselina i vitamina E kao i ekstrakata bogatih proantocijanidinima. Komercijalni ekstrakti iz semenki grožđa (oligomerni proantocijanidini - OPC) koriste se kao dodaci ishrani zbog antioksidativnih i kardioprotektivnih svojstava. Većina tih ekstrakata se zapravo proizvodi od osušenih semenki komine grožđa. Dodavanje brašna od semenki grožđa u pekarske proizvode povećava nutritivnu vrednost i sadržaj antioksidanasa (Antonić et al., 2020).

2.2.3 Fenolna jedinjenja semenke grožđa

Poslednjih godina, veliki broj naučnih istraživanja se bavio upravo identifikovanjem i strukturnom karakterizacijom pojedinačnih fenolnih jedinjenja komine grožđa (Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016; Milinčić et al., 2021a). Komina grožđa, a samim tim i njen osnovni konstituent, semenska, su dokazano vredan izvor bioaktivnih jedinjenja, pre svega fenolnih jedinjenja, koji pozitivno utiču na ljudsko zdravlje i imaju potencijalnu primenu, uglavnom u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. (Lucarini et al., 2020; Milinčić et al., 2021a; Caponio et al., 2023; Almanza-Oliveros et al., 2024; Karastergiou et al., 2024). Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najrasprostranjenijih grupa sekundarnih metabolita biljaka, a odlikuju se velikom strukturnom raznovrsnošću i različitim biološkim aktivnostima. Fenolna jedinjenja mogu se, prema svojoj hemijskoj strukturi, podeliti na dve glavne grupe: flavonoide (antocijanini, flavanoli, flavanoni, flavonoli, flavononi i izoflavoni) i neflavonoide (fenolne kiseline, uključujući hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline, kao i ksantone, stilbene, tanine i lignane) (Durazzo et al., 2019).

Količina fenolnih jedinjenja koja se mogu ekstrahovati iz bobice grožđa varira, pri čemu semenska sadrži približno 60-70 % ukupnih rastvorljivih fenolnih jedinjenja, pokožica oko 28-35 %, dok pulpa samo oko 10 % (Lopes et al., 2025). U pogledu sadržaja fenolnih jedinjenja u semenki grožđa, dominiraju: fenolne kiseline (derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline), flavan-3-oli (proantocijanidini) i flavonoli (Gođevac et al., 2010; Zdunić et al., 2019; Zhou et al., 2022; Milinčić et al., 2022).

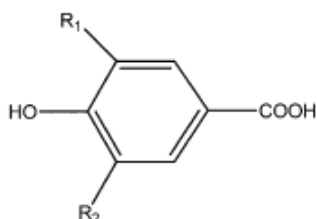
2.2.3.1 Fenolne kiseline

Fenolne kiseline predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja koja se javljaju u obliku hidroksibenzoevih (C6-C1) i hidroksicimetnih kiselina (C6-C3). Ove kiseline predstavljaju hidroksilne derivate aromatičnih karboksilnih kiselina, a prema osnovnoj strukturi dele se na derivate benzoave i cimetne kiseline (Slika 2.3). U semenkama ne dominiraju hidroksicimetne kiseline, ali se mogu naći kofeinska kiselina (1,49 mg/g), *p*-kumarinska (0,11 mg/g) i ferulinska kiselina (1,06 mg/g), premda u relativno malim količinama (ispod 2 mg/g) (Elkatry et al., 2022). U radu Pantelić et al. (2016) se navode podaci o sadržaju tri hidroksicimetne kiseline (hlorogenska, kofeinska i ferulinska kiselina) u čak 13 različitih sorti grožđa, među kojima je u sorti Prokupac najzastupljenija bila hlorogenska kiselina (2,90 mg/kg suve materije), zatim ferulinska kiselina (1,75 mg/kg suve materije) i kofeinska kiselina (0,96 mg/kg suve materije). Najdominantnije hidroksibenzoeve kiseline kvantifikovane u semenki su: galna (23,87 mg/g) i protokatehinska kiselina (17,45 mg/g), uz niži sadržaj *p*-hidroksibenzoeve kiseline (5,39 mg/g) (Elkatry et al., 2022). U radu, Milinčić et al. (2021a) hidroksibenzoeva kiselina i njeni derivati su detektovani u značajnom sadržaju u svim ispitivanim vodenim ekstraktima komine grožđa sorte Prokupac, gde je komina u celini imala 46,34 %, semenska 51,63 %, pokožica 14,30 % i stabljika 26,02 % od ukupnih fenolnih jedinjenja. Ističu se i heksozidi galne kiseline izomeri 1 i 2 koji su dominirali u vodenim ekstraktima semenke. Dokazano je da je etanolni ekstrakt semenke Prokupca imao značajno veći sadržaj galne kiseline (0,91 mg/g suve

materije) u poređenju sa više različitih crvenih sorti grožđa koje su imale znatno niže vrednosti sadržaja galne kiseline, i to: Gamay (0,17 mg/g suve materije), Vranac (0,31 mg/g suve materije), Pinot Noir (0,36 mg/g suve materije), Zacinak (0,58 mg/g suve materije), Crna Tamjanika (0,47 mg/g suve materije), Frankovka (0,27 mg/g suve materije) i Shiraz (0,32 mg/g suve materije), dok je sadržaj protokatehinske kiseline bio prisutan u manjim količinama u svim uzorcima (Dabetic et al., 2022). Istraživanje u radu Pantelić et al. (2016) takođe dokazuje da je u poređenju sa sedam različitih sorti crvenog grožđa, koncentracija galne kiseline u semenki sorte Prokupca iznosila 289,13 mg/kg suve mase, dok je najmanji sadržaj galne kiseline imala sorta Merlot (78,10 mg/kg suve mase). Pored veoma visokog sadržaja galne kiseline, najveća koncentracija elaginske kiseline takođe je pronađena kod sorte Prokupca (77,17 mg/kg suve mase) (Gođevac et al., 2010; Milinčić et al., 2025b).

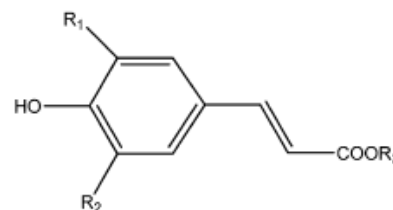
Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da galna, a zatim i elaginska kiselina predstavljaju najzastupljenije fenolne kiseline u semenima, iako fenolne kiseline čine samo deo ukupnog fenolnog profila.

Hidroksibenzojeva kiselina



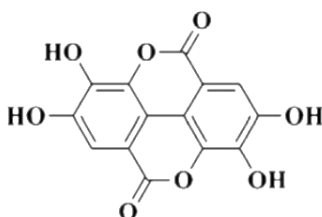
<i>Derivati hidroksibenzojeve kiseline</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>
Galna kiselina	OH	OH
p-Hidroksibenzojeva kiselina	H	H
Protokatehinska kiselina	OH	H

Hidroksicimetna kiselina



<i>Derivati hidroksicimetne kiseline</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
Kofeinska kiselina	OH	H	H
P-kumarinska kiselina	H	H	H
Ferulinska kiselina	OCH ₃	H	H

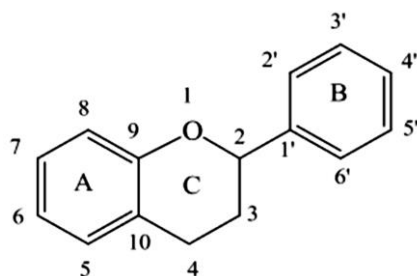
Elaginska kiselina



Slika 2.3. Strukturne formule hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline i njihovih derivata prisutnih u semenki grožđa (Fontana et al., 2013; Garrido & Borges, 2013)

2.2.3.2 Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najzastupljeniju grupu fenolnih jedinjenja u semenkama grožđa. Odlikuje ih C6-C3-C6 struktura, koja se sastoji od dva fenil prstena (A i B) povezana trougleničnim mostom koji formira zatvoreni heterociklični piranski prsten (C) (Slika 2.4). Ovaj fenil benzopiranski skelet omogućava širok spektar supstitucija i modifikacija, što rezultira različitim podelama flavonoida (Karastergiou et al., 2024).

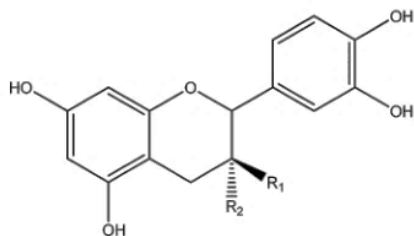


Slika 2.4. Osnovna struktura flavonoida

Flavan-3-oli (pro(anto)cijanidini i katehini) su najčešća grupa flavonoida, koji se od drugih flavonoida razlikuju hidroksilnom grupom (-OH) vezanom za treći atom ugljenika C prstena (Karastergiou et al., 2024) (Slika 2.5). Ovim jedinjenjima su posebno bogate semenke grožđa (Gođevac et al., 2010; Yu & Ahmedna, 2013; Beres et al., 2017; Feei Ma & Zhang, 2017; Lucarini et al., 2020; Zhou et al., 2022; Milinčić et al., 2022; Dabetić et al., 2022; Karastergiou et al., 2024; Milinčić et al., 2025b). Monomerne flavan-3-ole u semenkama čine (+)-katehin i (-)-epikatehin, često i u formi galatnih estara (npr. (-)-epikatehin-3-*O*-galat) (Yu & Ahmedna, 2013; Lucarini et al., 2020; Dabetić et al., 2022; Milinčić et al., 2025b). Analize vina i grožđa su pokazale da su upravo katehin i epikatehin među dominantnim jedinjenjima u ekstraktima semenki: u semenkama sorte Tintal del pais zabeleženo je da (+)-katehin čini oko 11 %, (-)-epikatehin 10 %, a (-)-epikatehin-3-*O*-galat oko 9 % od ukupnih izolovanih fenolnih jedinjenja (Feei Ma & Zhang, 2017). Flavan-3-oli se lako kondenzuju u oligomerne pro(anto)cijanidine i polimerna jedinjenja (kondenzovane tanine, koje doprinose izraženom astringentnom oporom ukusu). Osim monomera, prisutni su i brojni oligomeri: identifikovano je najmanje 14 dimernih, 11 trimernih i čak jedan tetramerni procijanidin u semenkama. Najčešći dimeri su procijanidin B1 (katehin-(4 β →8)-katehin) i B2 (katehin-(4 β →8)-epikatehin), dok je prisustvo ovako velikog broja oligomernih flavanola potvrđeno nakon degradacije tanina iz semenki, kojom su oslobođeni katehin, epikatehin i galatni estri što ukazuje da su oni strukturne jedinice ovih polimera (Feei Ma & Zhang, 2017).

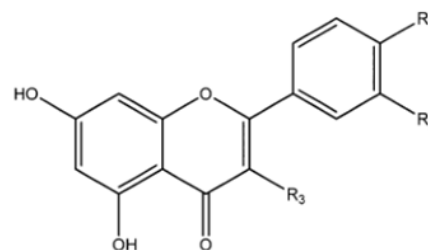
Flavonoli predstavljaju drugu podgrupu flavonoida i odlikuju se 3-hidroksiflavonskim skeletom. Prisutni su i u grožđu (Slika 2.5), pri čemu su u semenkama zastupljeni u manjoj meri i najčešće se javljaju u obliku 3-*O*-glikozida. U semenkama nekih sorti grožđa prisutni su kvercetin, miricetin i kampferol (Zhou et al., 2022). Elkatry et al. (2022) su utvrdili da ekstrakt semenki sadrži ~3,60 mg/g rutina, dok su slobodni kvercetin (~0,18 mg/g) i kampferol (~0,13 mg/g) bili znatno ređe zastupljeni. Ovo sugerise da određeni procenat flavanola može poticati i od zaostalih delova pokožice.

Flavanoli



Jedinjenja	R1	R2
Katehin	OH	H
Epikatehin	H	OH
Epikatehin galat	H	O-galna kiselina

Flavonoli



Jedinjenja	R1	R2	R3
Kampferol	OH	H	H
Kvercetin	OH	OH	H
Miricetin	OH	OH	OH

Slika 2.5. Strukturne formule flavanola i flavonola sa najznačajnijim jedinjenjima prisutnim u semenki grožđa (Fontana et al., 2013)

2.2.4 Bioaktivna svojstva fenolnih jedinjenja iz semenke grožđa

Fenolna jedinjenja prisutna u semenkama grožđa ispoljavaju različita bioaktivna svojstva, što može doprineti njihovim potencijalnim pozitivnim efektima na zdravlje ljudi (Slika 2.6).

Ekstrakti semenki grožđa pokazuju snažnu **antioksidativnu aktivnost**, uglavnom zahvaljujući visokom sadržaju fenolnih jedinjenja. Utvrđena je jasna pozitivna koleracija između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja u ekstraktima i njihovog kapaciteta da neutrališu slobodne radikale (ABTS i DPPH) (Beres et al., 2017; Krasteva et al., 2023). Pored neutralizacije slobodnih radikala, ova jedinjenja mogu doprineti zaštiti ćelija od oksidativnog oštećenja i imati potencijalnu ulogu u prevenciji pojedinih hroničnih oboljenja, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes i određene vrste raka (Caponio et al., 2023). Na primer, semenke crnih sorti grožđa sa najvećim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja pokazale su i najveću oksidativnu moć u pomenutim testovima. Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da flavan-3-oli poput katehina i epikatehina dominiraju u semenkama grožđa i doprinose jakom kapacitetu „hvatanja” slobodnih radikala (Krasteva et al., 2023). Beres et al. (2017) ističu da se viša koncentracija fenolnih jedinjenja u semenkama u poređenju sa pokožicom povezuje sa izraženijim antioksidativnim efektom ekstrakata, što ukazuje na njihov potencijal kao bogatog izvora prirodnih antioksidanasa i mogućnost njihove primene kao funkcionalnih dodataka u prehrambenoj industriji.

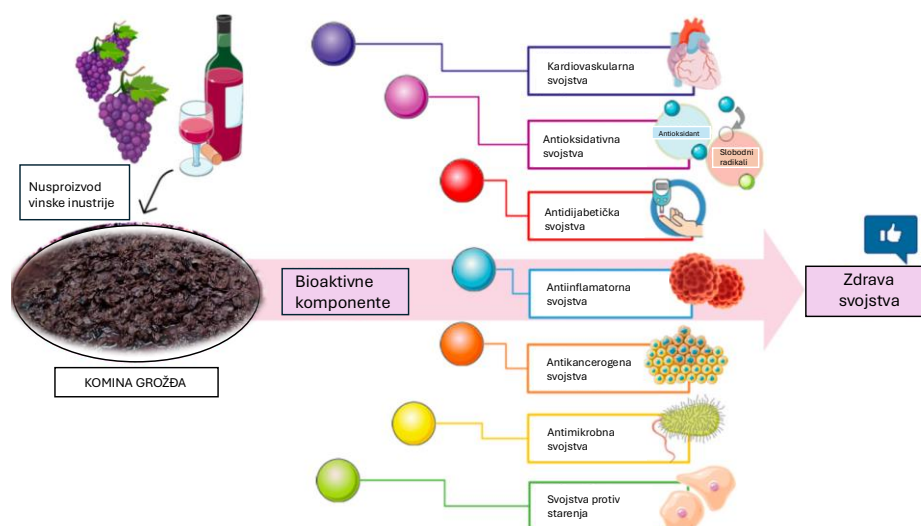
Takođe, brojna istraživanja potvrđuju i **antimikrobno dejstvo** fenolnih jedinjenja iz semenki grožđa. Ekstrakti semenki grožđa, bogati katehinima, pokazali su inhibiciju rasta različitih patogenih bakterija. Nađeno je da su ekstrakti semenki grožđa efikasni protiv Gram-pozitivnih bakterija *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, kao i Gram-negativne *Escherichia coli*, pri minimalnim inhibitornim koncentracijama od 0,12-0,50 mg/mL. Zapaženo je da su *S. aureus* i *B. cereus* nešto osetljivije od *E. coli* na ove ekstrakte (Krasteva et al., 2023). Ovim se zaključuje da se ekstrakti semenki grožđa mogu koristiti kao prirodni antimikrobni agensi u proizvodnji hrane, radi inhibicije patogenih mikroorganizama i potencijalne zamene sintetičkih konzervanasa (Krasteva et al., 2023).

Fenolna jedinjenja iz semenki grožđa privukla su veliku pažnju zbog eksperimentalno dokazanih **antikancerogenih svojstava**. Prema preglednom radu Xia et al. (2010), mnogobrojne studije su pokazale da ova jedinjenja mogu inhibirati razvoj i progresiju različitih tipova kancera, uključujući između ostalog rak prostate i kolorektalni karcinom. Proantocijanidini iz semenki grožđa pokazuju antikancerogeno delovanje u suzbijanju karcinoma dojke tako što inhibiraju invazivnost i metastaze tumorskih ćelija. Ovi rezultati ukazuju na to da bioaktivne komponente grožđa mogu ispoljavati potencijalne antikancerogene efekte kroz različite mehanizme, uključujući antimutageno delovanje i sprečavanje oštećenja DNK, indukciju apoptoze i inhibiciju procesa povezanih sa metastaziranjem (Xia et al., 2010).

Antiinflamatorno dejstvo fenolnih jedinjenja povezano je sa njihovim antioksidativnim svojstvima i sposobnošću modulacije ćelijskih signalnih puteva uključenih u procese zapaljenja. Fenolna jedinjenja, posebno u semenkama grožđa, pokazala su značajne antiinflamatorne efekte kako kod miševa tako i kod ljudi, čemu najviše doprinose flavonoli, flavanoli i procijanidini (oligomerni flavonoidi). Efekat kombinacije semenki i pokožice grožđa bio je gotovo paralelan efektu indometacina, uobičajenog leka u terapiji degenerativnih bolesti zglobova. Flavonoli, među kojima se izdvaja kvercetin, pokazuju sposobnost da smanje produkciju inflamatornih molekula u ćelijama imunog sistema (npr. inhibicija oslobađanja citokina) (Xia et al., 2010). U kliničkoj studiji Castilla et al. (2006) sa pacijentima na hemodijalizi, svakodnevna konzumacija koncentrovanog soka od crvenog grožđa (boca od 750 mL nedeljno; 50 mL dva puta dnevno) tokom tri nedelje dovela je do značajnog smanjenja nivoa monocitnog hemotaktnog proteina-1 (MCP-1), inflamatornog citokina povezanog sa rizikom od kardiovaskularnih oboljenja (Xia et al., 2010). Ovi rezultati jasno ukazuju

da fenolna jedinjenja iz bobice grožđa deluju protivupalno i mogu doprineti ublažavanju hroničnih upalnih stanja.

Epidemiološki i eksperimentalni podaci sugerišu da fenolna jedinjenja iz bobice grožđa imaju i **kardioprotektivno dejstvo**. Konzumiranje proizvoda od grožđa bogatih fenolnim jedinjenjima (poput crvenog vina ili soka) povezuju se sa poboljšanjem parametara kardiovaskularnog zdravlja. Fenolna jedinjenja doprinose prevenciji ateroskleroze prvenstveno kroz antioksidativno delovanje u kardiovaskularnom sistemu. Oni inhibiraju oksidaciju LDL holesterola i na taj način smanjuju stvaranje aterogenih naslaga (Xia et al., 2010). Groždani sok je u vrlo niskoj koncentraciji (0,01 %) potpuno inhibirao bakrom indukovanu oksidaciju humanih LDL čestica *in vitro*, što ukazuje na moćan antioksidativni potencijal soka u kontekstu zaštite krvnih sudova. Pored efekata na oksidativni stres, fenolna jedinjenja mogu povoljno uticati i na profile lipida u krvi. Pokazano je da flavonoidi iz grožđa poput katehina i kvercetina mogu povećati nivo apolipoproteina A1 (glavne proteinske komponente HDL holesterola) za 19-26 %, što implicira porast „dobrog“ holesterola (Xia et al., 2010). Ovi efekti mogu doprineti kardioprotektivnom delovanju fenolnih jedinjenja iz semenki grožđa, koje može biti povezano sa očuvanjem funkcije endotela, smanjenjem krvnog pritiska i poboljšanjem lipidnog profila.



Slika 2.6. Efekti bioaktivnih jedinjenja komine grožđa na zdravlje čoveka (modifikovano iz Caponio et al., 2023)

Navedeni podaci ukazuju na bioaktivni potencijal fenolnih jedinjenja iz semenki grožđa i mogućnost njihove primene kao funkcionalnih sastojaka hrane. U brojnim studijama obuhvaćenim različitim granama prehrambene industrije, ekstrakti semenke grožđa su uspešno korišćeni kao izvori biološki aktivnih fenolnih jedinjenja u formulaciji različitih prehrambenih proizvoda. Njihovom inkorporacijom postignuto je poboljšanje antioksidativnih, nutritivnih i senzornih svojstava proizvoda, bez negativnog uticaja na njihova organoleptička svojstva (Milinčić et al., 2021b; Wang et al., 2024). Prema dosadašnjim istraživanjima najčešće se navodi inkorporacija u sledeće proizvode: mesne preradevine (suve fermentisane i dimljene kobasice, suvi fermentisani svinjski vratovi, pileтина, govedina, ćuretina, riblji proizvodi), pekarski proizvodi (hlebovi, paste), mlečni proizvodi (sirevi, jogurti, fermentisana mleka, sladoledi), konditorski proizvodi (biskviti, kolačići, mafini), pića (Ribas-Agustí et al., 2014; Zhou et al., 2020; Libera et al., 2020; Kandylyis et al., 2021; Zhou et al., 2022; Elkatry et al., 2022; Sekhavatizadeh et al., 2023; Rodrigues Machado et al., 2023; Almanza-Oliveros et al., 2024; Abreu et al., 2024; Wang et al., 2024; Ivanov et al., 2025b). Međutim, u literaturi ne postoje podaci koji opisuju primenu ekstrakata semenki grožđa izdvojenih iz fermentisane komine

u formulaciji dehidrisanih prehrambenih proizvoda i upravo to je razlog i inovativan doprinos zašto je baš semenka Prokupca izabrana kao jedna od komponenti za razvoj nove optimizovane formulacije mikroinkapsulata.

2.3 Osnovne biološke i morfološke karakteristike gljiva

Gljive predstavljaju posebnu grupu organizama koju odlikuju specifične morfološke, biološke i biohemijske karakteristike. Telo gljiva najčešće je izgrađeno od končastih struktura hifa, koje međusobnim povezivanjem formiraju micelijum, odnosno vegetativno telo gljive (Vukojević, 1998; Savić, 2014). Kod pojedinih vrsta, u odgovarajućim uslovima, formira se i plodonosno telo koje može biti makroskopske ili mikroskopske veličine, a osnovna uloga mu je razmnožavanje i stvaranje spora (Vukojević, 1998; Savić, 2014). Gljive se odlikuju heterotrofnim načinom ishrane i nemaju sposobnost fotosinteze, jer ne poseduju hlorofil. Njihov ćelijski zid pretežno je izgrađen od hitina, polimera N-acetilglukozamina, dok glukani predstavljaju još jednu značajnu grupu polisaharida ćelijskog zida (Lolić, 2018; Derbyshire, 2020). Ćelijske membrane gljiva sadrže ergosterol, karakterističan sterol ove grupe organizama (Derbyshire, 2020). Prisustvo hitina i ergosterola, odsustvo hlorofila i specifičan način ishrane predstavljaju neke od osnovnih karakteristika po kojima se gljive razlikuju od biljaka. Carstvo gljiva odlikuje velika raznovrsnost u pogledu morfologije, načina života, staništa i ekološke uloge. Prema načinu života, gljive mogu biti saprotrofne, parazitske i simbiotske, dok se prema značaju i primeni za čoveka mogu izdvojiti različite grupe, među kojima posebno mesto zauzimaju jestive i lekovite vrste. Veliki broj vrsta još uvek nije dovoljno istražen, što ukazuje na značajan potencijal gljiva kao izvora različitih bioaktivnih jedinjenja.

Posebnu grupu među gljivama predstavljaju makromicete, odnosno vrste koje formiraju krupna plodonosna tela dovoljno velika da budu vidljiva golim okom i da se ubere rukom. Makromicete ne predstavljaju formalnu taksonomsku kategoriju, već obuhvataju predstavnike različitih grupa gljiva, prvenstveno Ascomycotina i Basidiomycotina (Chang & Miles, 2004). Broj opisanih vrsta makromiceta procenjuje se na oko 14 000, pri čemu se oko 700 vrsta povezuje sa lekovitim svojstvima (Stajić, 2015). Makromicete imaju dugu istoriju primene u ishrani i tradicionalnoj medicini. Jestive vrste koriste se hiljadama godina, dok je primena pojedinih vrsta u medicinske svrhe posebno razvijena u tradicionalnim medicini Dalekog istoka (Nestler, 2002). Upotreba makromiceta u savremenoj medicini i farmaciji poslednjih decenija privlači sve veću pažnju, što je praćeno intenzivnijim istraživanjima njihovog hemijskog sastava i bioloških svojstava (Morris et al., 2017).

Među makromicetama posebno značajnu grupu čine jestive gljive, koje predstavljaju izvor proteina, polisaharida, fenolnih jedinjenja i drugih bioaktivnih komponenti. Njihov nutritivni sastav i prisustvo različitih bioaktivnih jedinjenja povezani su sa brojnim biološkim aktivnostima, uključujući antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno, imunomodulatorno i antikancerogeno delovanje (Landi et al., 2017; Du et al., 2018; Das et al., 2021; Rangel-Vargas et al., 2021; Kumar et al., 2021; Gariboldi et al., 2023; Singh et al., 2025). Zbog nutritivnog sastava i prisustva različitih bioaktivnih komponenti, jestive gljive poslednjih godina privlače sve veću pažnju u istraživanjima usmerenim ka razvoju funkcionalnih prehrambenih proizvoda. U tom kontekstu, posebnu pažnju privlači vrsta *A. aegerita*. Iako je jestiva vrsta sa nutritivnim i funkcionalnim potencijalom, u poređenju sa pojedinim drugim jestivim gljivama znatno je manje istražena, naročito u pogledu primene u prehrambenim matricama i valorizacije njenih bioaktivnih komponenti. Dosadašnja istraživanja obuhvatila su različite aspekte njenog hemijskog sastava i bioloških svojstava (Zhao et al., 2003; Zhang et al., 2003; Manzi et al., 2004; Diyabalanage et al., 2008; Jasińska et al., 2012; Petrović et al., 2014; Petrović et al., 2015; Lin et al., 2017; Landi et al., 2017; Song et al., 2020; Rezaeian et al., 2022). Međutim, istraživanja usmerena na njenu primenu u prehrambenim proizvodima, uključujući procese poput mikroinkapsulacije su i dalje ograničena.

Upravo zbog toga, *A. aegerita* je odabrana kao predmet istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji, sa ciljem detaljnijeg ispitivanja njenih nutritivnih i funkcionalnih svojstava i mogućnosti primene u razvoju prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću.

2.4 Taksonomija, opšte karakteristike, hemijski sastav i bioaktivna svojstva *A. aegerita*

2.4.1 Taksonomija i opšte karakteristike vrste *A. aegerita*

Klasifikacija

Podrazdeo: Basidiomycotina

Klasa: Hymenomycetes

Red: Agaricales

Familija: Bolbitiaceae

Rod: *Agrocybe*

Vrsta: *Agrocybe aegerita* (V.Brig.) Singer

syn: *Cyclocybe aegerita*



Slika 2.7. Plodonosna tela *Agrocybe aegerita*
(<https://hr.wikipedia.org/wiki/Jablanovaca>)

A. aegerita (V. Brig.) Singer, poznata i pod nazivima jablanovača ili topolovka je jestiva gljiva visokog kvaliteta cenjena zbog prijatnog ukusa, jedinstvene arome i bogatog nutritivnog sastava (Rezaeian et al., 2022). Prirodno raste kao saprotrof najčešće u busenovima na panjevima, deblima i trulim ostacima listopadnih drveća poput topole, vrbe, jasena i drugog drveća (Jasińska et al., 2012). Komercijalno se gaji u Evropi, Kini, Japanu, Južnoj Koreji i drugim zemljama (Rezaeian et al., 2022).

Plodonosno telo gljive *A. aegerita* je mesnate konzistencije, klobuk (šešir) je u početku poluloptast i konveksan, a kasnije se raširi, dostižući prečnik i do 20 cm. Boja klobuka varira od žućkasto-sive do sivo-smeđe, pri čemu je sredina tamnija (Jasińska et al., 2012). Listići sa donje strane klobuka su gusto poređani i prvo poprimaju sivu boju, a kako gljiva sazreva i spore dozrevaju, listići postaju čokoladno smeđi. Drška gljive je čvrsta, bele boje, često blago zakrivljena, sa jasno vidljivim prstenom, tzv. „suknjicom” blizu vrha. Ovaj membranozni prsten kod zrelih primeraka poprima braon boju usled taloženja praha spora. Spore su eliptične i tamno smeđe (Jasińska et al., 2012; Rezaeian et al., 2022). Zbog blagog prijatnog ukusa (koji pomalo podseća na meso), ova gljiva je uživala reputaciju delikatesa još od antičkog doba. Postoje podaci da su je gajili stari Grci i Rimljani (Jasińska et al., 2012), a i danas se komercijalno uzgaja na različitim lignoceluloznim supstratima kao što su slama, ljuske kikirikija i slični poljoprivredni ostaci (Petrović, 2018).

Dosadašnja istraživanja pružila su uvid u hemijski sastav i prisustvo različitih biološki aktivnih jedinjenja u ovoj gljivi, kao i u njena potencijalna biološka i zdravstvena svojstva, o čemu će detaljnije biti reči u narednim poglavljima.

2.4.2 Hemijski sastav plodonosnog tela *A. aegerita*

Brojne analize su pokazale da jestive gljive predstavljaju bogat izvor proteina, dijetetskih vlakana (hemiceluloza, hitin, manan i β -glukan), esencijalnih amino-kiselina, esencijalnih masnih kiselina, vitamina i minerala. Pored toga, izvor su biološki aktivnih jedinjenja, kao što su polisaharidi, biološki aktivni proteini (enzimi, lektini), ergotionein (amino-kiselina), steroli, terpenoidi i antioksidansi (Landi et al., 2017; Du et al., 2018; Rengel-Vargas et al., 2021; Das et al., 2021; Kumar et al., 2021; Gariboldi et al., 2023; Singh et al., 2025). Među jestivim gljivama, posebnu pažnju privlači *A. aegerita*, čiji će hemijski sastav i bioaktivna svojstva biti detaljnije razmotreni u nastavku.

Dosadašnja istraživanja su dokazala da se plodonosno telo gljive *A. aegerita* odlikuje visokim sadržajem ugljenih hidrata (84,50 g/100g suve mase), dok su proteini prisutni sa oko 6,68 g/100g suve mase, zajedno sa visokim udelom nezasićenih masnih kiselina, pri čemu polinezasićene masne kiseline (PUFA) čine oko 78,60 %. (Zong et al., 2026). Novija istraživanja ukazuju na to da hemijski sastav plodonosnog tela vrste *A. aegerita* može varirati u zavisnosti od različitih faktora, kao što su karakteristike soja, sastav i tretman supstrata za gajenje, uslova gajenja, razvojna faza i analizirani deo plodonosnog tela (Li et al., 2024; Zong et al., 2026). Tako, u istraživanju Li et al. (2024) sprovedenom na plodonosnim telima *A. aegerita* gajenim na različitim fermentisanim i nefermentisanim supstratima sa različitim udelom *Caragana korshinskii*, sadržaj sirovih proteina iznosio je 25,40 – 29,60 % suve mase, pepela 7,20 – 7,80 %, sirovih polisaharida 3,90 – 4,46 %, a sirovih vlakana 7,75 – 9,15 % u zavisnosti od sastava i tretmana supstrata (Li et al., 2024).

Polisaharidi gljiva privlače posebnu pažnju zbog uočene biološke aktivnosti. Tako, povoljan sadržaj β -glukana, dijetetskih vlakana i hitina u komercijalnim uzorcima svežeg plodonosnog tela *A. aegerita* kvantifikovan je još u radu Manzi et al. (2004). U svežem plodonosnom telu utvrđeno je $5,07 \pm 0,25$ g ukupnih dijetetskih vlakana/100 g jestivog dela, od čega $0,96 \pm 0,11$ g/100 g rastvorljivih i $4,11 \pm 0,13$ g/100 g nerastvorljivih vlakana. Sadržaj β -glukana iznosio je $302,50 \pm 3,20$ mg/100 g, dok je sadržaj hitina iznosio 0,80 g/100 g (Manzi et al., 2004). Liu et al. (2020) izolovali su iz *A. aegerita* polisaharid AAPS molekulske mase od $1,81 \times 10^4$ Da, čiju monosaharidnu osnovu pretežno čine glukoza, fruktoza, manoza i ramnoza u molarnom odnosu 38,27:10,25:3,70:2,90. Trehaloza je identifikovana kao dominantan slobodni šećer sa udelom preko 10 % (12,49 g/100g suvog uzorka *A. aegerita*). Pored trehaloze, detektovan je i manitol u količini od 0,93 g/100g suvog uzorka (Petrović et al., 2015). Takođe, u plodonosnim telima *A. aegerita* su identifikovani i lektini sa antitumorskim dejstvom AAL i AAL-2 (Zhao et al., 2003). Dalje, Li et al. (2024) su u plodonosnim telima identifikovali 16 amino-kiselina, pri čemu je njihov ukupan sadržaj, u zavisnosti od supstrata iznosio $16,45 \pm 0,35$ % – $20,05 \pm 0,05$ % suve mase, dok su esencijalne amino-kiseline bile zastupljene u rasponu od 6,04 do 7,22 %. Glutaminska kiselina bila je najzastupljenija amino-kiselina u svim ispitivanim varijantama, a sledile su asparaginska kiselina i leucin (Li et al., 2024).

U ranijim istraživanjima identifikovane su četiri organske kiseline: jabučna kiselina, koja je bila najzastupljenija (1,82 g/100 g suve mase), zatim limunska (0,88 g/100 g suve mase), fumarna (0,26 g/100 g suve mase) i oksalna kiselina (0,09 g/100 g suve mase) (Petrović et al., 2015; Petrović et al., 2014). Novija analiza hidrolizata *A. aegerita* pokazala je širi profil organskih kiselina, koji je obuhvatio oksalnu, vinsku, jabučnu, askorbinsku, limunsku i ćilibarnu kiselinu. U zavisnosti od primenjenog enzima, ćilibarna kiselina je bila najzastupljenija (1,79 – 2,09 mg/g), dok se ukupan sadržaj organskih kiselina kretao od 4,47 do 4,99 mg/g (Yang et al., 2024; Zong et al., 2026). Prisustvo organskih kiselina u plodonosnim telima *A. aegerita* značajno je kako sa aspekta njihovog hemijskog sastava, tako i zbog njihovog uticaja na svojstva i potencijalnu funkcionalnu vrednost ove gljive. Organske kiseline su poznate po svojoj relativnoj hemijskoj stabilnosti i sporim promenama tokom skladištenja. Imaju značajnu ulogu u formiranju organoleptičkih svojstava, doprinose kiselkastom ukusu i karakterističnim mirisnim svojstvima gljiva, a pojedine mogu ispoljavati antioksidativno dejstvo ili učestvovati kao kofaktori u različitim metaboličkim procesima.

Kada je reč o sadržaju masnih kiselina, konkretno, od ukupnih masnih kiselina čak ~78,40 % čini linolna kiselina (C18:2n6c, omega-6 masna kiselina). Sledeća po zastupljenosti je palmitinska (C16:0) sa ~13,10 %, zatim oleinska (C18:1n9c) ~3,00 % i stearinska kiselina (C18:0) ~2,10 % (Petrović et al., 2015). Dominacija linolne kiseline je naročito značajna. To je esencijalna masna kiselina koju organizam ne može sam sintetisati, a neophodna je za zdravlje kože i metabolizam (Das et al., 2021). Uz to, linolna kiselina je poznata i kao prekursor aromatičnih jedinjenja u gljivama. Njena oksidacija dovodi do formiranja 1-okten-3-ola, supstance koja gljivama daje karakterističan „šumski” miris (Petrović et al., 2015). Ovakav sastav masti potvrđuje da jablanovača, kao i druge jestive gljive, može doprineti unosu omega-6 masti dok sadrži vrlo malo zasićenih masnoća.

Kada su u pitanju mikronutrijenti, *A. aegerita* ima sadržaj gvožđa od $3,85 \pm 0,06$ mg/g suve mase, i znatno niže sadržaje selen, cinka, bakra, mangana, kalijuma, fosfora, magnezijuma, kalcijuma i natrijuma (Muthu & Shanmugasundaram, 2016; Zong et al., 2026). U plodonosnim telima detektovana su četiri izomera tokoferola: α -, β -, γ - i δ -tokoferol, pri čemu je najzastupljeniji bio γ -tokoferol sa 86,1 μ g/100 g suve mase. Slede β -tokoferol (8,80 μ g/100 g), δ -tokoferol (3,40 μ g/100 g) i α -tokoferol (2,10 μ g/100 g) (Petrović et al., 2015; Petrović et al., 2014). Navodi se i to da *A. aegerita* sadrži i nekoliko bioaktivnih metabolita, kao što su derivati indola koji imaju antioksidativnu aktivnost, zatim agrocibin, peptid koji je pokazao antifungalnu i antikancerogenu aktivnost, kao i ceramid, metil- β -D-glukopiranozid i α -D-glukopiranozid (Diyabalanage et al., 2008).

2.4.3 Bioaktivne komponente i biološka aktivnost *A. aegerita*

Fenolna jedinjenja i organske kiseline značajno utiču na senzorni profil gljiva, doprinoseći njihovim specifičnim ukusima i mirisima. Takođe, zahvaljujući izraženoj antioksidativnoj aktivnosti, ova jedinjenja imaju važnu zaštitnu funkciju. Eksperimentalno je potvrđeno da plodonosna tela makromiceta, sadrže značajne količine fenolnih kiselina (posebno derivate benzojeve i cimetine kiseline), protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske, salicilne, *p*-kumarne, galne, gentisinske, siringinske, cimetine, kafeinske i ferulinske kiseline sa širokim spektrom bioloških aktivnosti i potencijalnih pozitivnih zdravstvenih efekata (Das et al., 2021). Istraživanje Petrović et al. (2014) takođe potvrđuju da su u metanolnom ekstraktu *A. aegerita* identifikovane: *p*-hidroksibenzojeva, *p*-kumarna i cimetna kiselina, dok su u vodenom ekstraktu identifikovane galna, protokatehinska, hlorogenska i ferulinska kiselina (Lin et al., 2017).

A. aegerita je predmet velikog interesovanja i istraživanja koja se bave ispitivanjem njenih bioaktivnih komponenti i mogućnostima primene u funkcionalnoj hrani i medicini. Kao i brojne druge, ova makromiceta pokazuje različite biološke aktivnosti, među kojima se izdvajaju antimikrobno, antioksidativno, antiinflamatorno, imunomodulatorno, antitumorsko i citotoksično dejstvo (Diyabalanage et al., 2008; Das et al., 2021; Petrović et al., 2014; Petrović et al., 2015; Petrović, 2018; Zhao et al., 2003; Landi et al., 2017).

Tako je studija Petrović et al. (2014) potvrdila da ekstrakti *A. aegerita* imaju izraženo antimikrobno dejstvo (antibakterijsko i antifungalno). Ekstrakt gljive je inhibirao rast različitih mikroorganizama na dozno zavistan način, a dobijene vrednosti za inhibitornu i baktericidnu aktivnost su bile u rangu komercijalnih antibiotika i antimikotika. Inhibicija rasta *Staphylococcus aureus* (čest uzročnik kožnih infekcija) i *Pseudomonas aeruginosa*, bakterije poznate po rezistenciji i sposobnosti formiranja biofilma, zabeležena je pri minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIK) od 0,59 mg/mL, i minimalnoj baktericidnoj koncentraciji (MBK) od 1,18 mg/mL, dok su komercijalni antibiotici pokazali inhibitornu aktivnost u opsegu od 0,05-0,30 mg/mL i baktericidnu aktivnost u opsegu od 0,10-0,50 mg/mL (Petrović et al., 2014). Novije istraživanje Bains et al. (2023), sprovedeno na etanolnom ekstraktu kulture micelije *A. aegerita*, dopunjuje navedene rezultate pokazujući anti-quorum sensing i antibiofilm aktivnost prema *P. aeruginosa* PAO1. Ekstrakt je smanjio produkciju piocijanina za

61,32 %, pioverdina za 54,02 % i sposobnost kretanja (swarming motility) za 56,32 %, dok je inhibicija formiranja biofilma iznosila 72,35 %. Potvrđeno je takođe da *A. aegerita* luči peptid agrocibin koji ima antifungalnu i antikancerogenu aktivnost (Ngai et al., 2005). Agrocibin je seskviterpenski derivat amino-kiselina specifičan za rod *Agrocybe* koji inhibira određene bakterije i gljivice. Zhao et al. (2003) su prvi opisali izolovanje lektina ALL, proteina sa snažnim antitumorskim dejstvom iz plodonosnog tela *A. aegerita* i pokazali da on inhibira rast različitih linija humanih tumorskih ćelija *in vitro*. Novi ribotoksin, ageritin, koji je prvi put izolovan i prečišćen iz bazidiomicete *A. aegerita* korišćen je da se sprovede preliminarna citotoksična analiza koja je usmerena na procenu njegovog antitumorskog potencijala protiv agresivnih i malignih karcinoma centralnog nervnog sistema (CNS) (Landi et al., 2017). Takođe je ispitan i antikancerogeni potencijal ceramida, koji je izolovan iz *A. aegerita* protiv pet ćelijskih linija ljudskog raka *in vitro* i utvrđeno je da inhibira proliferaciju ćelijskih linija raka želuca, dojke i CNS-a za 26,90 %, 23,20 % i 39,10 %, respektivno, pri koncentraciji od 100 µg/mL (139 µM). Ovo sugerise da bi konzumiranje *A. aegerita* pomoglo u ublažavanju inflamatornih stanja, kao i smanjenju razvoja navedenih tumora (Diyabalanage et al., 2008).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da jedinjenja i ekstrakti izolovani iz gljiva, kao što su polisaharidi, peptidi, proteini, lipopolisaharidi i glikoproteini poseduju snažnu sposobnost modulacije imunog sistema, menjajući biološki odgovor ćelija. Ukoliko stimulišu aktivnost imunog sistema (imunostimulatorno delovanje), mogu imati važnu primenu u lečenju malignih bolesti, bolesti povezanih sa oslabljenim imunim sistemom ili u stanjima kada je imunost potisnuta usled terapije lekovima. Lektin, protein izolovan iz jestive gljive *A. aegerita*, pokazuje imunomodulatornu aktivnost, a ispoljava i sposobnost indukcije apoptoze i degradacije DNK (Zhao et al., 2003). Oksidativni stres izazvan viškom reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxygen species* - ROS) može dovesti do mnogih bolesti kod ljudi (Song et al., 2020). Kao što je već pomenuto, gljiva sintetiše različita fenolna jedinjenja koja doprinose njenoj antioksidativnoj aktivnosti (Petrović, 2018; Petrović et al., 2015). Ova jedinjenja neutrališu slobodne radikale, čime štite ćelije od oksidativnog stresa, potencijalno sprečavajući oštećenja koja mogu voditi ka razvoju različitih oboljenja. Takođe, proteini hrane se mogu smatrati dobrim materijalima za proizvodnju antioksidativnih peptida, vrste prirodnih antioksidanasa, koji privlače veliku pažnju zbog svoje niske toksičnosti i jake antioksidativne aktivnosti. Ukupno je identifikovano 25 novih peptida iz proteina gljive *A. aegerita* korišćenjem enzimske hidrolize. Pokazano je da temperatura značajno utiče na antioksidativnu aktivnost hidrolizata, a optimalni uslovi za dobijanje peptida sa najvišom antioksidativnom aktivnošću su bili: temperatura 51,1 °C, pH 8,5 i odnos enzima prema supstratu (E/S) od 3 %. Sastav određenih amino-kiselina i sekvenci ovih peptida su uticali na njihovu biološku aktivnost. Ovi rezultati pokazuju da hidrolizati proteina *A. aegerita* imaju potencijal da se koriste kao prirodni antioksidansi u funkcionalnoj hrani i prehrambenoj industriji (Song et al., 2020).

Zbog posebno izraženog antioksidativnog potencijala, kao i svih pomenutih bioloških svojstava, *A. aegerita* ima širok spektar potencijalnih primena u prehrambenoj industriji, posebno kao sastojak funkcionalnih prehrambenih proizvoda, suplemenata ili farmaceutskih preparata.

2.5 Kozje mleko: hemijski sastav, tehno-funkcionalna svojstva i uticaj termičke obrade

Kozje mleko poslednjih godina privlači sve veću pažnju kao nutritivno vredna i tehnološki interesantna sirovina za razvoj različitih mlečnih i funkcionalnih prehrambenih proizvoda. U poređenju sa kravljim mlekom, odlikuje se nizom osobina koje mogu doprineti njegovoj boljoj svarljivosti, niskim alergenim svojstvima i iskorišćenju pojedinih hranljivih materija (Chen et al., 2020; dos Santos et al., 2023; ALKaisy et al., 2023b; Thakur et al., 2024; Verma et al., 2026). Među njima se posebno izdvajaju manja veličina masnih globula, veći udeo kratkolančanih i

srednjelančanih masnih kiselina, kao i specifičan proteinski profil, koji uključuje niži sadržaj α s1-kazeina i relativno veću zastupljenost β -kazeina. Pored toga, proteini kozjeg mleka pokazuju specifična tehno-funkcionalna svojstva, uključujući dobru rastvorljivost, termičku stabilnost, sposobnost emulgovanja i formiranja pene, kao i povoljan digestivni potencijal (ALKaisy et al., 2023b; dos Santos et al., 2023; Akshit et al., 2024; Verma et al., 2026). Kada govorimo o nutritivnim vrednostima, kozje mleko je bogato određenim mineralima (poput kalcijuma, fosfora, kalijuma i magnezijuma) i vitaminom A, dok ima niži sadržaj folne kiseline i vitamina B12 (Turkmen, 2017; Akshit et al., 2024). Zbog ovih karakteristika, kao i činjenice da se po sastavu smatra mnogo bližim majčinom mleku nego drugi izvori mleka, kozje mleko se često smatra pogodnijom alternativom posebno za ishranu odojčadi kao i dece sa nutritivnim problemima (borba protiv neuhranjenosti) (dos Santos et al., 2023). Nutritivni značaj kozjeg mleka dodatno je povezan sa prisustvom brojnih biološki aktivnih i nutritivno značajnih komponenti, među kojima se izdvajaju oligosaharidi, bioaktivni peptidi, fosfolipidi, taurin, poliamini, vitamini i mineralne materije. Zbog takvog sastava, kozje mleko se u literaturi povezuje sa antioksidativnim, antimikrobnim, imunomodulatornim i antiinflamatornim delovanjem, kao i sa potencijalno povoljnim efektima na gastrointestinalno i kardiovaskularno zdravlje (Verma et al., 2026).

U okviru ove doktorske disertacije, kozje mleko je odabrano kao osnovna matrica za mikroinkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja i proizvodnju dehidrisanih proizvoda, pa je neophodno razmotriti njegov hemijski sastav, funkcionalnost i ponašanje pri termičkom tretmanu.

2.5.1 Hemijski sastav kozjeg mleka i nutritivne karakteristike

Novija globalna meta-analiza, zasnovana na 82 studije objavljene u periodu 1975-2023, pokazala je da prosečne vrednosti sastava kozjeg mleka iznose približno 12,81 % ukupne suve materije, 4,13 % mlečne masti, 3,52 % proteina i 4,44 % laktoze (Akshit et al., 2024). Ista analiza potvrđuje da sastav kozjeg mleka značajno varira u zavisnosti od geografskog porekla, rase, stadijuma laktacije, godišnjeg doba i ishrane (Akshit et al., 2024). Metzger (2022) navodi podatak da jedna šolja ($\approx$ 240 mL) punomasnog kozjeg mleka sadrži oko 168 kcal, 9 g proteina i 10 g masti (Metzger, 2022).

Mlečna mast kozjeg mleka se ističe po strukturi i sastavu masnih globula. Preko 80 % masnih globula u kozjem mleku su prečnika $< 5 \mu\text{m}$, što doprinosi finijoj dispergovanosti masti. Kao posledica, kozje mleko je prirodno homogenizovano i lakše je za varenje, jer se manje globule brže razgrađuju enzimom lipazom (Turkmen, 2017). Međutim, veličina masne globule nije jedini faktor koji određuje brzinu digestije lipida. U sirovom kozjem mleku veća brzina digestije bila je povezana sa nižim udelom triacilglicerida manje molekulske mase, kraćim lancima masnih kiselina, nižim stepenom zasićenosti masnih kiselina na sn-1 i sn-3 pozicijama, kao i sa specifičnim međupovršinskim svojstvima masnih globula (Zhao et al., 2022). Homogenizacija je u navedenom *in vitro* modelu povećala brzinu digestije lipida i kozjeg i kravljeg mleka, dok je HTST (*High Temperature–Short Time*) tretman smanjio početnu brzinu digestije u odnosu na homogenizovane globule mlečne masti, što ukazuje da termička obrada može značajno menjati međupovršinske osobine i ponašanje mlečne masti tokom digestije (Zhao et al., 2022).

Sastav masnih kiselina takođe ide u prilog svarljivosti. Kozje mleko je relativno bogatije kratkim i srednje dugim lancima masnih kiselina, kao što su kapronska (C6:0), kaprilna (C8:0), kaprinska (C10:0) i laurinska (C12:0) kiselina. Ove masne kiseline čine 15-18 % ukupnih masnih kiselina u kozjem mleku. Kratki lanac omogućava bržu hidrolizu i apsorpciju masnoće, što je još jedan razlog bolje iskorišćenosti kozjeg mleka u digestivnom traktu (Turkmen, 2017). Prisustvo kaprilne, kaprinske i srodnih kiselina daje karakterističan „opori” miris i ukus kozjeg mleka i sireva, ali se fermentacijom i adekvatnim procesuiranjem taj miris može ublažiti. Dos Santos et al. (2023) dodatno

izdvajaju kratkolančane i srednjelančane masne kiseline, oligosaharide kao i fosfolipide, među lipidnim komponentama kozjeg mleka sa izraženim funkcionalnim potencijalom.

Dominanti **ugljeni hidrat** kozjeg mleka je laktoza (mlečni šećer), čiji sadržaj se kreće oko 4,10-4,40 g/100g (Turkmen, 2017). Pored laktoze sadrži i manje količine oligosaharida, složenih ugljenih hidrata koji imaju prebiotsku i imunomodularnu ulogu. Iako u znatno manjoj koncentraciji nego u ljudskom mleku, profil oligosaharida u kozjem mleku sličniji je ljudskom nego kravlje mleko (Sousa et al., 2019). Kozje mleko sadrži i neutralne oligosaharide (npr. 3-galaktozil-laktozu) i sijalisane oligosaharide (npr. 6-sijalil-laktozu i 3-sijalil-laktozu) koji su strukturalno bliski humanim mlečnim oligosaharidima (Verruck et al., 2019). Istraživanja pokazuju da oligosaharidi kozjeg mleka mogu delovati prebiotski tako što podstiču rast korisne crevne mikroflore, ispoljavaju antiinflamatorne efekte u crevima i potencijalno doprinose razvoju nervnog sistema kod odojčadi (Verruck et al., 2019; Sousa et al., 2019; dos Santos et al., 2023). Iako su prisutni u relativno maloj količini (0,30 g/L), značajni su za funkcionalnost kozjeg mleka (dos Santos et al., 2023).

Vitamin A je zastupljen u kozjem mleku u znatnoj količini. Koze efikasno konvertuju karoten iz ishrane u vitamin A. Ova osobina je važna jer vitamin A doprinosi normalnoj funkciji vida, imunog sistema i rasta. Svetska zdravstvena organizacija (WHO) procenjuje da deficit ovog vitamina pogađa oko 190 miliona dece predškolskog uzrasta, pretežno u Africi i Jugoistočnoj Aziji, prvenstveno u zemljama sa niskim i srednjim prihodima (World Health Organization, 2011; World Health Organization, 2019). U 100 g kozjeg mleka ima oko 185 IU (engl. *International Unit* - IU) vitamina A, naspram ~126 IU u kravljem. S druge strane, kozje mleko sadrži znatno manje folne kiseline (vitamina B9), vitamina B12, vitamina B6 i D, dok je nivo riboflavina (B2) i niacina nešto viši. Folata ima tek oko 1 µg/100g (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Turkmen, 2017). Vitamin C (askorbinska kiselina) je prisutan u maloj količini (oko 1,30 mg/100g) (Turkmen, 2017). Usled deficita folata i vitamina B12, u praksi se za ishranu odojčadi koristi adaptirana formula na bazi kozjeg mleka koja je obogaćena folnom kiselinom i drugim vitaminima kako bi se ispunile njihove potrebe.

Kozje mleko je bogat izvor i makro- i mikrominerala. Sadržaj kalcijuma iznosi oko 130-140 mg/100g, fosfora oko 110 mg/100g, dok je sadržaj ostalih minerala: magnezijuma ~14 mg, kalijuma ~200 mg, hlora ~150 mg, natrijuma ~50 mg i gvožđa svega ~0,05 mg (Turkmen, 2017). Sa aspekta nutritivnog sastava, kozje mleko se preporučuje kao dobar izvor kalcijuma i fosfora, posebno u populacijama gde su deficiti ovih minerala česti i gde je potrošnja mesa niska (Raynal-Ljutovac et al., 2008; Turkmen, 2017). Kozje mleko takođe predstavlja značajan izvor kalcijuma, uz vrednosti od 120 mg/100 mL⁻¹, i ističe njegov nutritivni i funkcionalni značaj u okviru ukupnog sastava kozjeg mleka (dos Santos et al., 2023).

Proteini čine oko 3-4 % kozjeg mleka, s tim da kazein (CN) čini oko 80 % ukupnog sadržaja proteina (Verruck et al., 2019; ALKaisy et al., 2023b). Proteini kozjeg mleka pokazuju antioksidativna, antimikrobna, antikancerogena i antiinflamatorna svojstva, koja su značajna kod ljudi koji pate od hroničnih (alergije, astma, artritis) inflamatornih stanja (ALKaisy et al., 2023b). Kazeini su fosforilovani proteini koji u mleku postoje u obliku velikih koloidnih agregata – kazeinskih micela. Najpoznatija podela se bazira na četiri glavne frakcije: α_{s1} -kazein, α_{s2} -kazein, β -kazein i κ -kazein (Pešić, 2011; Cheema et al., 2015; Moeller et al., 2017; Turkmen, 2017; Verruck et al., 2019). Kod kozjeg mleka najdominantniji je β -kazein koji čini čak do ~60 % kazeina, udeo α_{s1} -kazeina može biti vrlo nizak (0-25 %, u zavisnosti od genotipa), α_{s2} -kazeina oko 10-20 %, a κ -kazeina oko 15-25 % (Pešić, 2011; Verruck et al., 2019). S druge strane, glavni serum proteini su: β -laktoglobulin (β -LG), α -laktalbumin (α -LA), uz manje količine serum albumina krvi (BSA), imunoglobulina (Ig), laktoferina i proteozopeptonske frakcije (Pešić, 2011; Turkmen, 2017; Verruck et al., 2019; Popović Minić, 2024). Ukupno, serum proteini čine ~20-25 % ukupnih proteina mleka (oko 0,60 g/100 mL u kozjem mleku). Najzastupljeniji je β -LG koji čini oko 60-70 % serum proteina, dok drugo mesto

zauzima α -LA i čini oko 20 % serum proteina kozjeg mleka (Verruck et al., 2019). Serum proteini kozjeg mleka takođe pokazuju različite spektre bioloških svojstava. Peptidi nastali enzimskom hidrolizom β -LG i α -LA mogu pokazati antihipertenzivno, imunomodularno, antioksidativno i antimikrobno dejstvo (Pešić et al., 2016; Verruck et al., 2019; dos Santos et al., 2023).

2.5.2 Tehno-funkcionalna svojstva proteina kozjeg mleka

Pod tehno-funkcionalnim svojstvima podrazumeva se ponašanje mleka i njegovih komponenata tokom prerade kao i u finalnim prehrambenim proizvodima. Dokazano je da proteini kozjeg mleka pokazuju visoku sposobnost emulgovanja i sposobnost formiranja pene, što ih čini važnim funkcionalnim komponentama u razvoju funkcionalnih i inovativnih prehrambenih proizvoda (Pešić et al., 2014; Li et al., 2020; AlKaisy et al., 2023b).

Emulgujuća svojstva odnose se na sposobnost proteina da stabilizuju emulzije, najčešće tipa ulje/voda. Mlečni proteini deluju kao prirodni emulgatori, adsorbuju se na međupovršini ulje/voda i formiraju sloj oko uljnih kapljica, sprečavajući njihovo spajanje (Milinčić, 2023). Ovu funkciju definišu sledeći indeksi: indeks aktivnosti emulzije (engl. *emulsion activity index* – EAI) i indeks stabilnosti emulzije (engl. *emulsion stability index* – ESI) (Li et al., 2020; Tian et al., 2023). U kozjem mleku, serum proteini poseduju visoku površinsku aktivnost. Oni se brzo adsorbuju na granici ulje/voda, razmeštajući se tako da hidrofobne amino-kiseline budu u dodiru sa uljanom fazom, a hidrofilne sa vodenom, čime snižavaju međupovršinski napon. Kazeini, sa druge strane, mogu formirati mrežastu strukturu oko dispergovanih kapljica ulja i dodatno stabilizovati emulziju pružajući elektrostatičku barijeru protiv spajanja kapljica (Pešić, 2011; AlKaisy et al., 2023b). Kombinacija ova dva efekta doprinosi stvaranju sitnih i stabilnih kapljica ulja u emulziji. Termički tretman kozjeg mleka utiče na emulgujuća svojstva proteina kroz promene njihove strukture i međumolekulskih veza. Blago do umerena denaturacija (npr. zagrevanje do ~ 70 - 75 °C), može da poveća stabilnost emulzije. Delimično denaturisani proteini formiraju čvršći, deblji zaštitni sloj oko kapljica, što otežava njihovo ponovno spajanje. Utvrđeno je da nakon termičke obrade serum proteina kozjeg mleka indeksi stabilnosti emulzije rastu. (Tian et al., 2023). Sa druge strane, prekomerno zagrevanje ili produženo vreme delovanja termičkog tretmana mogu umanjiti inicijalnu emulgujuću aktivnost. Jako denaturisani i agregirani proteini teže difunduju do međupovršine i oblažu kapljice. Posledica je manji EAI, odnosno slabija efikasnost formiranja emulzije (Chen et al., 2025). Pri dužem zagrevanju formiraju se veći proteinski agregati koji ne mogu efikasno da okruže sitne kapljice ulja, što doprinosi da emulzija bude grublja i manje homogena (Tian et al., 2023). Emulgujuća svojstva kozjeg mleka zavise i od pH vrednosti. Pešić et al. (2013) su utvrdili da promena pH sa 6,5 na 6,9 (u termički tretiranom kozjem mleku – 90 °C, 10 min) dovodi do povećanja stabilnosti emulzije, ali i smanjenja sposobnosti formiranja emulzije. Stoga, optimalni termički uslovi treba da omoguće dovoljnu denaturaciju za poboljšanu stabilnost, ali na način da ne dođe do gubitka rastvorljivosti proteina ili formiranja prevelikih kompleksa koji imaju smanjena emulgujuća svojstva. Proteini iz kozjeg mleka mogu služiti kao emulgatori u proizvodima kao što su prelive za salate, majonez, kremasti sosovi i formulacije za ishranu odojčadi (AlKaisy et al., 2023b), odnosno u proizvodima kod kojih je potrebno formirati stabilnu suspenziju masti u vodenoj matrici. Njihova efikasnost u stabilizaciji emulzija doprinosi finijoj dispergovanosti masti (manjim kapljicama) i sprečava izdvajanje ulja na površinu proizvoda tokom skladištenja.

Peniva svojstva predstavljaju sposobnost proteina da formiraju i stabilizuju penu, sistem gasnih mehurića dispergovanih u tečnoj fazi. Iako su pene termodinamički nestabilne, proteini mogu da se adsorbuju na međupovršinu vazduh/voda, smanje površinski napon i formiraju stabilan film oko mehurića, čime usporavaju njihovo spajanje i pucanje (Antúnez-Medina et al., 2025). Kod određivanja penivih svojstava, ključni parametri su: kapacitet formiranja pene (engl. *foam capacity* – FC, često dat u %) i stabilnost pene (vreme zadržavanja zapremine ili visine pene). Veći kapacitet

formiranja pene znači da protein može da stvori više pene, dok veća stabilnost pene predstavlja otporniju penu koja sporije opada (Li et al., 2020). Proces formiranja pene vrlo je sličan procesu formiranja emulzije. Pri formiranju pene, molekuli proteina difunduju na međupovršinu vazduh/voda i orijentišu se tako da su hidrofobni delovi ismereni ka gasnoj fazi, a hidrofilni ka vodenoj. Time se smanjuje površinski napon i olakšava nastanak mehurića. Istovremeno proteini formiraju viskoelastični film oko mehurića koji pruža mehaničku otpornost, čime stabilizuje penu (Pešić, 2011). Uticaj termičkog tretmana i promena pH vrednosti, značajno utiču na peniva svojstva kozjeg mleka (Li et al., 2020; Zhao et al., 2020). Termički tretman kozjeg mleka modifikuje proteine mleka čime poboljšava i formiranje i stabilnost pene u odnosu na proteine koji nisu prošli termički tretman. Tian et al. (2023), su objavili da je zagrevanje na $\sim 75^{\circ}\text{C}$ (15-25 min) dovodi do značajnog porasta penivih svojstava, jer je denaturacija pri toj temperaturi otkrila hidrofobne segmente proteina i pospešila međumolekulske interakcije, olakšavajući formiranje stabilne pene. Što se tiče uticaja pH vrednosti, Li et al. (2020) su utvrdili da je pri nižim pH kozje mleko formiralo najveći volumen pene i najbolju stabilnost pene, dok na višim pH pena teže nastaje, ali se i sporije destabilizuje, usled promene naelektrisanja i konformacije proteina na međupovršini vazduh–voda. Peniva svojstva su važna u kreiranju teksture i volumena mnogih prehrambenih proizvoda koji sadrže inkorporisan vazduh. Sposobnost proteina mleka da naprave stabilnu penu utiče na kvalitet šlagova, suflea, penastih kremova, glazura, topinga (Pešić, 2011; Milinčić, 2023). Peniva svojstva takođe utiču i na senzorna svojstva i stabilnost proizvoda tokom čuvanja.

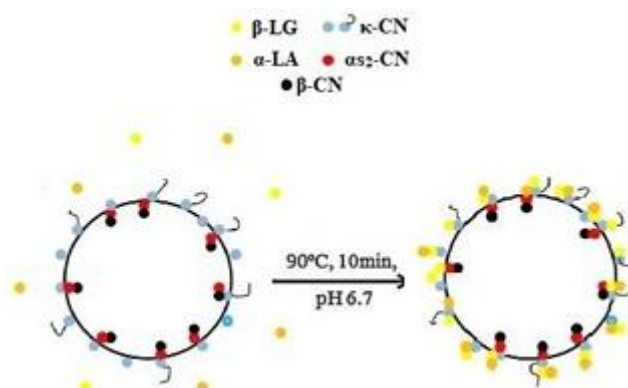
Proteini kozjeg mleka, zahvaljujući svojoj specifičnoj strukturi i sastavu, poseduju dobra emulgujuća i peniva svojstva. Ova svojstva se mogu dodatno poboljšati podešavanjem pH vrednosti, temperature i dodatkom drugih funkcionalnih sastojaka (poput biljnih ekstrakata grožđa, pečuraka, zatim polena i sličnih bogatih izvora bioaktivnih komponenti), što ih čini izuzetno pogodnim za upotrebu u formulaciji funkcionalnih prehrambenih proizvoda.

2.5.3 Uticaj termičke obrade na sastav i svojstva kozjeg mleka

Termička obrada mleka neophodna je za bezbednost proizvoda, ali dovodi do značajnih promena u strukturi proteina i drugih nutritivnih komponenti (Zhao et al., 2020). Neophodno je optimizovati uslove termičke obrade kozjeg mleka da bi se očuvala nutritivna i funkcionalna svojstva, a istovremeno obezbedila mikrobiološka bezbednost.

Kozje mleko ispoljava nešto nižu termičku stabilnost na prirodnom pH ($\sim 6,6-6,7$) (Moatsou, 2023). Pri zagrevanju na $\geq 60^{\circ}\text{C}$ započinje denaturacija serum proteina, posebno β -laktoglobulina, koji u kozjem mleku gubi tercijernu strukturu i izlaže hidrofobne grupe. Posledica toga je interakcija denaturisanih serum proteina sa kazeinom, što dovodi do formiranja kompleksa i povećanja veličine čestica proteina u mleku (Zhao et al., 2020; Moatsou, 2023). Ove promene mogu biti poželjne npr. kod proizvodnje jogurta ili mleka u prahu, jer kontrolisana denaturacija poboljšava viskoznost i sposobnost rehidracije. Dok sa druge strane prekomeran termički tretman (npr. sterilizacija na visokim temperaturama) može dovesti do pojave taloga (sedimentacije proteina) i braon boje usled Majardovih reakcija (Halabi et al., 2020). Zbog različite strukture kazeinske micelle kozjeg mleka (veći sadržaj β -CN i α_{s2} -CN, tj. niži sadržaj α_{s1} -CN), u formiranju ovih kompleksa proteina kozjeg mleka učestvuju sva tri kazeina (α_{s2} -CN, β -CN i κ -CN) koji doprinose ravnomernijoj distribuciji i jačoj interakciji denaturisanih serum proteina, stvarajući serum protein/kazein komplekse (WP/CN) na površini micelle (Slika 2.8). α_{s2} -CN i β -CN se nalaze bliže površini micelle, što im omogućava lakši kontakt sa denaturisanim β -LG. Pri termičkom tretmanu (90°C , 10 min) kozjeg mleka, na prirodnoj pH (6,7) više od 95 % serum proteina (α -LA i β -LG) je denaturisano i deo su kompleksa vezanih za micelle (Pešić et al., 2012). Eksperimentalno je pokazano da zagrevanje kozjeg mleka, npr. na 65°C tokom 30 min, ili brza pasterizacija na $85^{\circ}\text{C}/15$ sek, značajno uvećava prečnik čestica proteina, zamućenost (turbiditet) i apsolutnu vrednost zeta-potencijala, uz porast površinske hidrofobnosti

proteina (Zhao et al., 2020). To praktično znači da mleko postaje malo gušće/viskoznije i može uticati na formiranje gelova ili emulzija nakon jače termičke obrade (Milinčić, 2023).



Slika 2.8. Uticaj termičkog tretmana (90 °C, 10 min) na kazeinsku micelu kozjeg mleka na prirodnoj pH vrednosti (6,71) (Pešić et al., 2012)

2.6 Dizajn eksperimenta i optimizacija formulacije

Istraživački deo disertacije obuhvata planiranje eksperimenta i optimizaciju formulacije koju čine tri komponente (ekstrakt semenki grožđa, ekstrakt gljive *A. aegerita* i matriks od kozjeg mleka) sa ciljem formulacije finalnog proizvoda najboljih karakteristika. Primena statističkih metoda dizajna eksperimenta (*Design of Experiments – DoE*) omogućava efikasno ispitivanje uticaja više faktora na karakteristike ispitivanog sistema, uz istovremeno variranje tih faktora i utvrđivanja njihovog optimalnog odnosa (Mazzara et al., 2021; Lučić et al., 2022). Kako navode Mazzara et al. (2021) *DoE* predstavlja pogodan i efikasan pristup za proučavanje kompleksnih procesa i optimizaciju eksperimentalnih uslova u prehrambenoj industriji. U ovom poglavlju razmatra se značaj takvog pristupa i metode koje se mogu koristiti. U domenu funkcionalne hrane, optimizacija formulacije je od posebnog značaja jer često postoji više ciljanih odgovora. Na primer potrebno je istovremeno poboljšati i nutritivna svojstva i senzorni kvalitet proizvoda. Korišćenjem višestruke optimizacije moguće je istovremeno uzeti u obzir više odgovora i pronaći kompromisno optimalno rešenje (Tan et al., 2012; Candiotti et al., 2014). Metodologija odgovora površina (*Response Surface Methodology – RSM*) predstavlja skup statističkih i matematičkih tehnika koje se koriste za modelovanje i optimizaciju procesa u kojima na određeni odgovor utiče više nezavisnih varijabli (Bas & Boyaci, 2007). Osnovna ideja RSM-a je da se na osnovu dobro osmišljenog eksperimentalnog plana (poput centralnog kompozitnog ili Box-Behnken dizajna) prikupi skup podataka koji omogućavaju formiranje empirijskog modela, najčešće polinomne jednačine drugog reda, koja opisuje kako promena faktora utiče na odgovor (Bezerra et al., 2008). Jednom kada je model izgrađen mogu se konstruisati odzivne površine (3D grafici ili konture) koje vizuelno prikazuju odnos faktora i odgovora, što olakšava identifikaciju optimalnih uslova (Candiotti et al., 2014).

Među najčešće korišćenim eksperimentalnim dizajnima u okviru metodologije odzivnih površina (RSM) izdvaja se centralni kompozitni dizajn (CCD), koji se primenjuje za modelovanje i optimizaciju procesa.

CCD se sastoji od tri vrste eksperimentalnih tačaka: (1) faktorijalnih tačaka na dva nivoa (obično označeni sa -1 i +1) koji ispituju glavne efekte i interakcije, (2) aksijalne (zvezdaste) tačke koje predstavljaju dodatne nivoe faktora (iznad i ispod osnovnog opsega) radi procene kvadratnih (nelinearnih) efekata, i (3) centralne tačke (svi faktori na srednjem nivou) koje omogućavaju procenu

eksperimentalne greške i proveru stabilnosti modela. Jedna od važnih osobina CCD-a je rotabilnost dizajna, koja se postiže odgovarajućim izborom udaljenosti aksijalnih tačaka (faktora α). Rotabilan dizajn ima jednaku preciznost predikcije odgovora u svim pravcima od centra eksperimentalnog prostora (Candiotti et al., 2014). Pored CCD, u RSM pristupima često se koristi i Box-Behnken dizajn (BBD) koji se odlikuje trosistemskim nivoima faktora i eksperimentalnim tačkama raspoređenim na sredinama ivica faktorskog prostora (i u centru), bez kombinacija u kojima su svi faktori istovremeno na ekstremnim nivoima. Prednost BBD-a je što često zahteva manji broj eksperimenata od CCD-a za isti broj faktora, a istovremeno izbegava eksperimentisanje u uglovima eksperimentalnog prostora koji mogu biti problematični (npr. krajnje kombinacije mogu dovesti do nepoželjnih reakcija ili neodrživih stanja) (Tan et al., 2012). Kada je reč o statističkom pristupu dizajna eksperimenata, potrebno je pomenuti da kod ispitivanja svojstava sistema o kojima nema dovoljno podataka, pre postupka optimizacije primenjuju se potpuni ili frakcionisani faktorski dizajn (FFD). Faktorski dizajn se primarno koristi u fazi preliminarnog ispitivanja, kada je broj potencijalno značajnih faktora veliki i gde se pomoću manje proba dobijaju informacije o efektima većeg broja faktora (Candiotti et al., 2014). U istraživanjima, faktorski dizajn nalazi primenu, na primer, u preliminarnoj selekciji sastojaka ili tehnoloških uslova koji značajno utiču na kvalitet proizvoda (npr. izbor vrsta kultura, temperatura i vreme fermentacije, sastav recepture i sl.). Nakon što se na osnovu faktorskog dizajna selektuju faktori koji statistički značajno utiču na odziv sistema, oni se dalje detaljnije proučavaju i optimizuju primenom metodologije odgovora površina (Mazzara et al., 2021).

Ključ uspešne optimizacije je uvek dobra priprema, pravilan odabir faktora i nivoa na osnovu prethodnog znanja, čime se se obezbeđuje da ispitivani opseg obuhvati relevantne uslove za određivanje optimalnih vrednosti faktora (Simić, 2018). RSM je u prehrambenoj industriji uspešno korišćena za enzimске hidrolize (Nikhita & Sachindra, 2021), mikroinkapsulaciju lipidnih komponenata (Zahran et al., 2023), formulaciju i poboljšanje svojstava proizvoda (Patial & Ghosh, 2023), termičke tretmane (Omidiran et al., 2023), itd.

2.7 Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja – značaj i tehnike (sprej-sušenje i liofilizacija)

2.7.1 Značaj mikroinkapsulacije u prehrambenoj industriji

Mikroinkapsulacija predstavlja postupak oblaganja ili zatvaranja jedne supstance (aktivne komponente) unutar druge (materijala nosača) formiranjem zaštitnog omotača oko aktivne komponente (Nedović et al., 2011; Nedović et al., 2013; Đorđević et al., 2014; Lević, 2014a; Lević et al., 2014b; Kalušević, 2017a ; Salević et al., 2018). Na taj način se aktivna komponenta fizički odvaja od spoljašnje sredine i biva zaštićena od nepovoljnih uticaja okoline (Nedović et al., 2013). U prehrambenoj tehnologiji ova strategija se široko primenjuje za stabilizaciju osetljivih sastojaka (vitamina, fenolnih jedinjenja, antioksidanasa, aroma) i produženje njihovog roka trajanja u proizvodima, kao i zadržavanje njihovih nutritivnih i funkcionalnih svojstava do momenta konzumacije (Buljeta et al., 2022). Za polifenolne ekstrakte, koji su sklони oksidaciji i degradaciji (pod uticajem svetlosti, topolote, pH vrednosti), mikroinkapsulacija omogućava očuvanje biološke aktivnosti i stabilnosti tokom procesiranja i čuvanja (Valková et al., 2022). Materijal omotača (nosač) mora biti prehrambeno podoban, biokompatibilan i sposoban da izgradi barijeru između aktivne supstance i okruženja (Nedović et al., 2011). Kao aktivne komponente mogu se pojaviti razne materije, kao što su: vitamini, minerali, arome, probiotici, enzimi, antioksidansi, aromatične supstance itd. (Lević et al., 2014a ; Tahmaz, 2023), dok se kao nosači mogu koristiti različiti polisaharidi (skrob i derivati skroba, celuloza i derivati celuloze, hitozan, pektin, alginat, itd.), proteini (kazein, surutka), gluten, želatin, lipidi (masne kiseline i alkoholi, pčelinji vosak, i kanauba, gliceridi, itd.) (Nedović et al., 2011; Salević et al., 2018; Tahmaz, 2023). U zavisnosti od odabira nosača, tehnike inkapsulacije, kao i krajnje primene, mogu se dobiti čestice (inkapsulati) sfernog ili

cilindričnog oblika i veličine između 3 i 800 μm u prečniku što omogućava široku primenu u praksi (Chew et al., 2019).

Glavni ciljevi mikroinkapsulacije u prehrambenoj industriji su: (1) zaštita osjetljivih bioaktivnih jedinjenja od spoljašnjih uticaja (kiseonika, svetlosti, toplote, vlage) koji mogu izazvati gubitak aktivnosti; (2) kontrolisano oslobađanje koje omogućava da se aktivna materija oslobodi na željenoj lokaciji ili u određeno vreme (npr. oslobađanje arome tokom žvakanja, odnosno polifenola u crevima); (3) olakšano rukovanje i povećana stabilnost: tečne ili lepljive supstance pretvaraju se u suvi prah, čime se olakšavaju doziranje i rukovanje i smanjuje reaktivnost sa drugim komponentama; (4) maskiranje neprijatnih ukusa ili mirisa bioaktivnih ekstrakata koji inače mogu narušiti senzorne osobine proizvoda (Nedović et al., 2011; Nedović et al., 2013; Đorđević et al., 2014; Lević et al., 2014b; Kalušević, 2017a; Salević et al., 2018; Valková et al., 2022; Tahmaz, 2023). Sve ovo doprinosi tome da se funkcionalni sastojci lakše integrišu u formulacije hrane. S obzirom na osjetljivost fenolnih jedinjenja na različite spoljašnje uticaje, mikroinkapsulacija predstavlja značajnu tehniku za njihovu zaštitu i očuvanje stabilnosti. Inkapsuliranjem u matrikse od polisaharida, lipida ili proteina u ovom slučaju uspešno se smanjuje njihova degradacija i poboljšava delotvornost u funkcionalnim proizvodima (Buljeta et al., 2022).

U prehrambenoj industriji razvijeno je više tehnika mikroinkapsulacije zavisno od prirode materijala koji se inkapsulira, željene veličine čestica i termostabilnosti aktivnih jedinjenja. Među njima najčešće se primenjuju postupci sušenja: sprej-sušenje (sušenje raspršivanjem) i liofilizacija (sušenje smržavanjem) (Buljeta et al., 2022), koje će detaljnije biti objašnjenje u sledećem poglavlju, jer su upravo ove metode korišćene u eksperimentalnom radu. Pored pomenutih, koriste se i metode kao što su: ekstruzija, oblaganje u fluidizovanom sloju, koacervacija, molekulska inkluzija, sprej rashlađivanje/hlađenje, emulzifikacija i lipozomska inkapsulacija (Nedović et al., 2011; Nedović et al., 2013; Lević et al., 2014b; Đorđević et al., 2014; Salević et al., 2018; Buljeta et al., 2022).

2.7.2 Tehnike mikroinkapsulacije

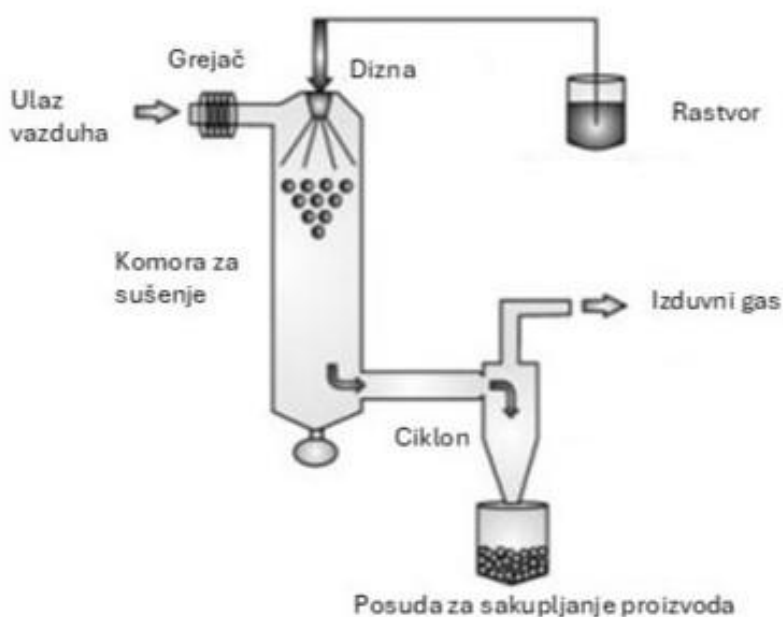
2.7.2.1 Sprej-sušenje (spray-drying)

Sprej-sušenje ili sušenje raspršivanjem je najstarija i najzastupljenija tehnika inkapsulacije u prehrambenoj industriji (Nedović et al., 2011; Đorđević et al., 2014; Buljeta et al., 2022). Princip sprej-sušenja podrazumeva raspršivanje (atomizaciju) tečne smeše (rastvor ili emulzija koja sadrži aktivnu supstancu i nosač) u komori kroz koju struji vruć vazduh, pri čemu rastvarač momentalno isparava i formiraju se suve čestice praha (Slika 2.9) (Đorđević et al., 2014; Lević et al., 2014b; Buljeta et al., 2022). Proces se odvija izuzetno brzo, sušenje traje od nekoliko milisekundi do par sekundi što omogućava da i termolabilni materijali mogu biti osušeni bez značajnije degradacije (Nedović et al., 2011; Đorđević et al., 2014; Kalušević et al., 2017b). Tipične temperature ulaznog vazduha u komori za sušenje su 150-220 $^{\circ}\text{C}$, dok je temperatura izlaznog vazduha niža (često 80-120 $^{\circ}\text{C}$), a sama kapljica se zbog isparavanja hladi i retko prelazi 40-50 $^{\circ}\text{C}$ tokom sušenja (Lević et al., 2014b).

Prednosti sprej-sušenja uključuju visoku efikasnost, kontinualni rad procesa i ekonomičnost. Brzo sušenje (red veličine nekoliko sekundi) ograničava vreme izlaganja toploti, pa su bioaktivna jedinjenja manje izložena degradaciji nego kod konvencionalnih tehnika sušenja baziranih na dugotrajnom izlaganju materijala povišenim temperaturama (Buljeta et al., 2022). Dobijene mikrokapsule su sfernog oblika, relativno malog prečnika (u proseku $<100\mu\text{m}$), što je poželjno sa aspekta teksture i osećaja u ustima kada se dodaju u hranu, kao i radi lakšeg rukovanja (mešanja, rastvaranja) (Nedović et al., 2013). Za uspešnu mikroinkapsulaciju sprej-sušenjem ključno je formiranje stabilne suspenzije ili emulzije pre raspršivanja, kao i izbor odgovarajućeg nosača i uslova sušenja (Đorđević et al., 2014). Materijali koji se koriste kao nosači za sprej-sušenje treba da imaju

dobra emulzifikujuća svojstva, da formiraju stabilnu emulziju ili rastvor a da pri tom ne otežavaju raspršivanje (Lević et al., 2014a). Od materijala nosača izdvajaju se: guma arabika, proteini mleka, surutka u prahu, obezmašćeno mleko, želatin, proteini soje, šećeri, maltodekstrini i sl. (Nedović et al., 2013; Kalušević et al., 2017b). Često se koristi kombinacija materijala kako bi se postigao optimalan balans osobina i formirale stabilne mikrokapsule. Efikasnost inkapsulacije tokom sprej-sušenja najviše zavisi od odnosa aktivne komponente i nosača (što je veći udeo nosača, to je generalno bolja zaštita aktivne materije), kao i od temperature ulaznog vazduha. Optimalno je pronaći balans gde je temperatura dovoljno visoka za brzo sušenje, a ne preterano visoka da izazove razgradnju ili isparavanje aktivne materije (Đorđević et al., 2014). Mnoge studije navode visoke prinose inkapsulacije fenolnih jedinjenja ovom metodom. Često se postiže više od 90 % zadržavanja fenolnih jedinjenja uz odgovarajući izbor nosača (maltodekstrin, proteini, guma arabika) (Buljeta et al., 2022; da Silva Júnior et al., 2023).

Nedostaci sprej-sušenja su uglavnom vezani za upotrebu povišene temperature vazduha (obično 120-180 °C). Iako je vreme kratko, određeni termolabilni sastojci mogu delimično izgubiti aktivnost. Takođe, prah dobijen ovom metodom često sadrži malo više zaostale vlage nego onaj dobijen liofilizacijom (što može uticati na njegovu stabilnost tokom skladištenja). Isto tako, deo čestica može prilikom sušenja doći u kontakt sa vrelim zidovima komore za sušenje, što može prouzrokovati zagorevanje ili degradaciju dela materijala (Nedović et al., 2011). Uprkos tome, uz pravilan izbor nosača i optimizaciju uslova, tehnikom sprej-sušenja mogu se postići odlični rezultati u pogledu visoke inkapsulacione efikasnosti i dobre stabilnosti inkapsulisanih jedinjenja (Valková et al., 2022).



Slika 2.9. Šema procesa sprej-sušenja (sušenje raspršivanjem) (modifikovano iz Sosnik & Seremeta, 2015)

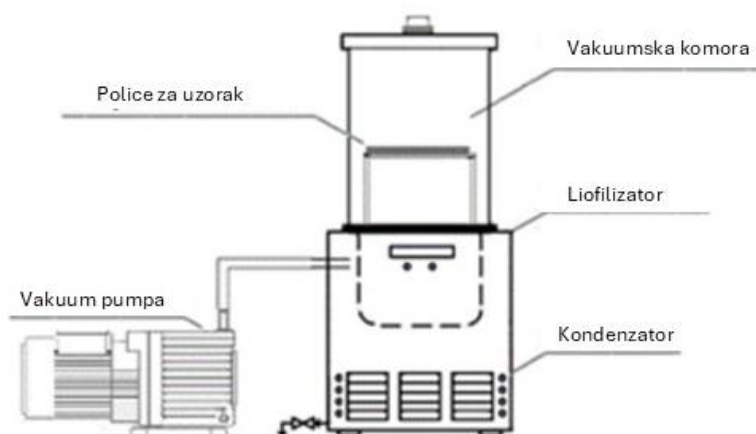
2.7.2.2 Liofilizacija (freeze-drying)

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je tehnika inkapsulacije, gde se uzorak u prvoj fazi zamrzava (obično na -50 °C ili niže), a zatim pod vakuumom pri odgovarajućoj temperaturi i pritisku vrši sublimacija vode i na taj način dolazi do sušenja (Slika 2.10). Ta prva početna faza podrazumeva primenu temperature u opsegu od -90 °C do -40 °C i prisustvo pritiska od nekoliko desetina paskala. Smatra se „zlatnim standardom” za očuvanje strukture i aktivnosti termolabilnih jedinjenja, pa se često koristi kada je cilj maksimalna zaštita bioaktivnih komponenti (Buljeta et al., 2022).

Prednosti primene liofilizacije ogledaju se u kvalitetno dobijenom inkapsulatu koji često zadržava vrlo visok nivo bioaktivnosti i nutritivnih svojstava u poređenju sa drugim sušenim proizvodima (Šeregelj, 2021). Tokom liofilizacije izbegava se zagrevanje jer se materijal održava na niskoj temperaturi, dok led sublimacijom direktno prelazi u vodenu paru, čime se sprečava termička degradacija osetljivih molekula. Inkapsulati dobijeni ovom tehnikom obično imaju poroznu, sunderastu strukturu i veće čestice u poređenju sa sprej-sušenjem (Buljeta et al., 2022), i sadrže izuzetno malo preostale vlage (često $<2\%$) što doprinosi dugoj stabilnosti praha (Stabrauskiene et al., 2024). Kod inkapsulacije polifenola, liofilizovani prahovi često pokazuju veći preostali sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativnu aktivnost nego oni dobijeni sprej-sušenjem, usled odsustva toplotnog stresa (Wilkowska et al., 2016; Stabrauskiene et al., 2024).

Međutim, glavni nedostaci liofilizacije su što je znatno skuplja i sporija metoda gde proces traje više sati, uz visoku potrošnju energije za zamrzavanje i održavanje vakuuma (Buljeta et al., 2022). Kapacitet proizvodnje kod liofilizacije je ograničen relativno dugim trajanjem postupka, ograničenom površinom polica i kapacitetom kondenzatora, kao i ograničenom brzinom prenosa toplote i mase, a oprema (liofilizatori) zahteva veće investicije. Dobijeni prahovi imaju poroznu strukturu, pa se tokom sušenja formira otvoreni, sunderasti matriks nosača. Ovakav visokoporozni zid kapsule nekada pruža slabiju barijeru ako je cilj dugotrajno zadržavanje aktivne materije (npr. postepeno otpuštanje) (Nedović et al., 2011). Ipak za visoko vredne materijale (npr. ekstrakte lekovitih biljaka, farmaceutske supstance) i one izrazito termoosetljive, liofilizacija je često primarna metoda inkapsulacije (Buljeta et al., 2022).

Liofilizacija takođe omogućava dobijanje inkapsulata sa izuzetno visokom stopom zadržavanja bioaktivnih komponenti. Step en očuvanosti osetljivih sastojaka (poput fenolnih jedinjenja, antocijana, vitamina) prilikom liofilizacije može biti preko 90 %. Takođe, liofilizovani proizvodi su često manje higroskopni (manje privlače vlagu iz okoline) u poređenju sa onim dobijenim sprej-sušenjem, što može biti prednost za stabilnost praha tokom skladištenja (Kuck & Noreña, 2016). U praksi, izbor između sprej-sušenja i liofilizacije predstavlja kompromis između efikasnosti i troškova. Često se liofilizacija koristi u istraživačke svrhe ili za premium proizvode gde je ključno maksimalno očuvanje funkcionalnosti, dok se sprej-sušenje primenjuje za masovnu proizvodnju funkcionalnih sastojaka zbog niže cene (Buljeta et al., 2022). Obe tehnike imaju značajnu primenu u očuvanju osetljivih aktivnih materija kao što su i bioaktivna jedinjenja iz semenke grožđa i gljive, koje su podložne različitim negativnim uticajima spoljašnje sredine, i budući da su pogodne za dobijanje dehidrisanih funkcionalnih dodataka na bazi kozjeg mleka.



Slika 2.10. Šematski prikaz uređaja za liofilizaciju (modifikovano iz Taskin, 2020)

2.7.3 Proteini kozjeg mleka kao nosači za mikroinkapsulaciju

Materijali koji se koriste kao nosači imaju presudan uticaj na uspeh inkapsulacije. Oni grade zid kapsule i određuju zaštitna svojstva inkapsulata. Moraju ispunjavati stroge kriterijume bezbednosti, biti prirodnog porekla i odgovarajućeg kvaliteta za primenu u prehrambenoj industriji, i biorazgradivi. Takođe, nosači treba da obezbede maksimalnu zaštitu aktivne supstance od spoljašnjih uticaja, očuvaju aktivne sastojke unutar strukture kapsule tokom različitih tehnoloških postupaka obrade i skladištenja i ne stupaju u neželjene interakcije sa inkapsuliranim materijalom (Nedović et al., 2013). U prehrambenoj industriji često se koriste jestivi biopolimeri: polisaharidi, lipidi i proteini. Među njima, mlečni proteini i proizvodi od mleka se izdvajaju kao efikasni i jestivi nosači, zbog svoje sposobnosti emulgovanja i formiranja stabilnih matriksa. Istraživanja pokazuju da micelarna struktura proteina kravljeg mleka (kazein, surutka) pogoduje zaštiti različitih bioaktivnih jedinjenja (Singh et al., 2003; Nedović et al., 2011; Petrović et al., 2015; Tumbas Šaponjac et al., 2016; Kalušević 2017a; Sokolińska et al., 2018; Cais; Corrêa et al., 2018; Radzki et al., 2023). U vezi sa tim, ispitana je mogućnost primene proteina kozjeg mleka kao nosača funkcionalnih jedinjenja, s obzirom na nešto drugačiji sastav njihovih proteina i gore pomenute prednosti (bolju svarljivost, nižu alergenost). U nastavku će biti opisani nosači iz kozjeg mleka: obezmašćeno kozje mleko, kazeini kozjeg mleka, kao i surutka kozjeg mleka, sa naglaskom na njihov potencijal primene kao nosača za mikroinkapsulaciju.

Obezmašćeno (obrano) kozje mleko u prahu predstavlja proizvod kozjeg mleka sa uklonjenom mlečnom masti (sadrži uglavnom laktozu, kazeine i proteine surutke) i kao takvo može služiti kao višekomponentni prirodni nosač za mikroinkapsulaciju. Studije su pokazale da obezmašćeno mleko u prahu može biti izuzetno efikasan nosač. Tako, primenom tehnike sprej-sušenja, ulje semenki nara je uspešno mikroinkapsulirano u obezmašćeno kozje mleko uz efikasnost inkapsulacije od čak 95,60 % (Goula & Adamopoulos, 2012). Ovako visok stepen inkorporacije ulja postignut je optimizacijom procesa, ultrazvučnom homogenizacijom emulzije i odgovarajućim odnosom ulja i nosača, što govori u prilog tome da kozje mleko u prahu može ravnopravno konkurisati maltodekstrinu i guma arabici kao često korišćenim nosačima. Dodatna potencijalna prednost kozjeg mleka jeste njegova hipoalergenost u poređenju sa kravljim mlekom, pa bi mikroinkapsulati na bazi kozjeg mleka mogli biti pogodniji za osobe osetljive na kravlje mleko. Takođe, mogli bi biti uključeni u specijalizovane funkcionalne proizvode, kao što su suplemenenti i dečija hrana. Novija istraživanja ispitivala su direktno kozje mleko u prahu kao matriks za inkapsulaciju biljnih ekstrakata. Milinčić et al. (2021b) su sprovedli studiju u kojoj su primenili tehniku sprej-sušenja koristeći termički obrađeno obezmašćeno kozje mleko kao nosač za inkapsulaciju ekstrakata semenki grožđa, bogate fenolnim jedinjenjima. Rezultati su pokazali snažnu interakciju fenolnih jedinjenja i mlečnih proteina. Prvenstveno su procijanidini iz ekstrakta stupili u vezu sa kazeinskim micelama i proteinima surutke, formirajući stabilne komplekse. Ovo je dovelo do značajnog poboljšanja antioksidativnih svojstava tako dobijenog praha. Prah obogaćen ekstraktom imao je viši ukupni antioksidativni kapacitet (meren DPPH i ABTS testovima) u odnosu na samo mleko, zahvaljujući prisustvu galne kiseline, katehina i procijanidina iz ekstrakta. Dodavanje biljnog ekstrakta u kozje mleko i njegovo sušenje raspršivanjem predstavlja perspektivan način objedinjavanja bioloških svojstava biljnog ekstrakta i nutritivne vrednosti kozjeg mleka u novom funkcionalnom sastojku (Milinčić et al., 2021b). Ovaj princip je iskorišćen i u istraživanju Kostić et al. (2021), kada je polen dodat u termički tretirano obezmašćeno kozje mleko, a dobijena smeša je potom sprej-sušenjem prevedena u funkcionalni prah. Dobijeni proizvod imao je visok sadržaj biodostupnih fenolnih jedinjenja polena i antioksidativnu aktivnost nakon simulirane digestije (Kostić et al., 2021). Popović Minić et al. (2023) su ispitivali uzorke netretiranog kozjeg mleka (M), termički tretiranog kozjeg mleka (TM), kazeina izolovanih iz netretiranog mleka (CN) i kazeina izolovanih iz termički tretiranog mleka (TCN), kao i njihove smeše sa vodenim (AE) i polisaharidnim (PE) ekstraktima gljive *Agaricus blazei* Murill. Formirane su stabilne nanočestice sa ζ -potencijalom od -41,1 mV, što ukazuje na dobru stabilnost suspenzije. Interakcije između polisaharida gljive i mlečnih proteina ostvarene su uglavnom putem vodoničnih

veza i hidrofobnih interakcija unutar kazeinskih micela. U termički tretiranom kozjem mleku dodatak ekstrakata *A. blazei* doveo je do značajnog povećanja srednjeg prečnika čestica, dok je FTIR analiza u kombinaciji sa hemometrijom ukazala na promene u strukturi proteina, kao i interakcije između polisaharida i mlečnih proteina, uspostavljene preko vodoničnih veza i hidrofobnih interakcija (Popović Minić et al., 2023). Ovi primeri pokazuju da obezmašćeno kozje mleko u prahu može uspešno da „nosi” bioaktivne molekule, koji doprinose povećanju funkcionalnosti dobijenih finalnih proizvoda. Stoga predstavlja veoma privlačan matriks za razvoj novih funkcionalnih prahova.

Kazeini iz kozjeg mleka su glavna proteinska komponenta mleka i prisutni su u obliku micela. Kazeinski proteini imaju specifičnu strukturu u kojoj hidrofobni delovi molekula stupaju u interakciju sa uljnom fazom, dok hidrofilni delovi ostaju u vodenoj fazi, čime oblažu uljne kapljice i doprinose stabilizaciji emulzije. Pri sušenju, kazeinski omotač se zgušnjava u zaštitnu školjku oko svake kapljice ulja, smanjujući isparavanje i kontakt sa kiseonikom (Đorđević et al., 2014). Pored toga, kazeinske micelle mogu da stabilizuju emulzije i da menjaju strukturu u zavisnosti od pH i temperature, što otvara mogućnost za dizajniranje sistema sa kontrolisanim oslobađanjem aktivnih komponentata (Sadiq et al., 2021). Molekuli kazeina u različitim agregatnim stanjima (kao nativne i rekonstituisane micelle, natrijum-kazeinat, β -kazein i kazeinske nanočestice) se mogu koristiti za vezivanje i prenos vitamina, minerala, fenolnih jedinjenja, lipida, proteina, peptida i drugih bioaktivnih komponenti (Casanova et al., 2021). Manjak α_{s1} -kazeina u kozjem mleku povezan je sa manjom veličinom micela kozjeg kazeina i njihovom manjom sklonošću ka agregaciji (Shi et al., 2025). Istraživanja interakcije fenolnih jedinjenja sa kazeinom pokazuju da termičkom obradom mleka dolazi do „otkrivanja” hidrofobnih centara u strukturi kazeinu koji imaju tendenciju da ostvaruju interakcije sa fenolnim jedinjenjima (Milinčić et al., 2021b). To sugeriše da kozji kazein može efikasno vezivati neke bioaktivne molekule (npr. tanine, flavonoide) i formirati stabilne komplekse. U radu Du et al. (2022) pokazano je da peptidni agregati kazeina kozjeg mleka mogu biti efikasni nosači za hidrofobna bioaktivna jedinjenja. Formirane nanočestice sa inkapsuliranim kurkuminom pokazale su povećanu rastvorljivost i stabilnost kurkumina, dobru termičku stabilnost, veću *in vitro* biodostupnost i antioksidativnu aktivnost, uz njegovo kontrolisano oslobađanje tokom intestinalne faze digestije. Slična uloga kazeina u stabilizaciji bioaktivnih komponenti opisana je i u napicima na bazi kozjeg mleka sa dodatkom biljnih ekstrakata (Komes et al., 2017). Na osnovu navedenih rezultata, kazein kozjeg mleka može se smatrati perspektivnim prirodnim nosačem za bioaktivna jedinjenja, uz istaknute prednosti u pogledu svarljivosti i alergenog potencijala u odnosu na kravlji kazein.

Proteini surutke (Whey protein) kozjeg mleka, najvažniji nusproizvodni mlečne industrije, su poznati po visokoj nutritivnoj vrednosti, ali i po specifičnim tehnološkim osobinama, uključujući biološku i emulgujuću aktivnost i sposobnost formiranja filmova. Koriste se za inkapsulaciju raznih bioaktivnih jedinjenja i proizvoda bogatih surutkom (sokovi, ulja, probiotici) (Akbarbaglu et al., 2021). *Whey protein* izolati (WPI) i *whey protein* koncentrat (WPC) se široko koriste u mikroinkapsulaciji, najčešće udruženi sa ugljenim hidratima, jer doprinose boljoj emulzifikaciji i jačoj strukturi zida kapsule nakon termičke obrade (Đorđević et al., 2014). Za potrebe inkapsulacije, od kozje surutke se može pripremiti koncentrat proteina surutke ili izolat proteina surutke uklanjanjem dela laktoze i minerala koji služe kao nosači u kombinaciji sa, na primer, maltodekstrinom ili skrobom. Specifičan primer primene kozje surutke dali su de Liz et al. (2020), koji su koristili koncentrate kozje surutke dobijene blok-zamrzavanjem, sa dodatkom inulina, kao zidni materijal za sprej-sušenje *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12. Autori su zaključili da koncentratu kozje surutke imaju potencijal za primenu kao materijali za inkapsulaciju probiotika, pri čemu je njihovo zaštitno dejstvo prema bifidobakterijama prvenstveno povezano sa svojstvima samih koncentrata. S druge strane, Hu et al. (2019) pokazali su da dodatak polisaharida *Tremella fuciformis* (TP) izolatu proteina surutke (WPI) dovodi do formiranja organizovanih WPI-TP kompleksa i značajnog smanjenja brzine *in vitro* digestije u poređenju sa samim WPI. Autori navode da bi ovakva

svojstva kompleksa mogla doprineti usporavanju pražnjenja želuca i produženju osećaja sitosti. Tumbas Šaponjac et al. (2016) su ekstrakt kome višnje inkapsulirali u proteine surutke, kao i proteine soje, a dobijene inkapsulate uključili u formulu keksa sa ciljem njihovog obogaćivanja sa polifenolima, poboljšanja antioksidativne aktivnosti, boje i stabilnosti tokom četiri meseca skladištenja. Rezultati su pokazali da je dodatak ekstrakta kome višnje očuvao funkcionalna svojstva proizvoda uz zadovoljavajuću senzornu prihvatljivost, što potvrđuje potencijal ovog pristupa za razvoj funkcionalnih pekarskih proizvoda.

U celini, dosadašnja istraživanja ukazuju da obezmašćeno kozje mleko ili pojedine frakcije kozjeg mleka imaju potencijal za primenu kao nosači ili komponente sistema nosača za bioaktivna jedinjenja i probiotske mikroorganizme, uz prednosti koje uključuju bogatu nutritivnu vrednost i funkcionalna svojstva samih mlečnih proteina.

2.8 Prehrambeni proizvodi na bazi mleka obogaćeni bioaktivnim komponentama iz gljiva i semenki grožđa

Savremeni potrošači sve više očekuju da hrana, pored osnovne nutritivne vrednosti, ima i dodatne zdravstvene benefite. Funkcionalni proizvodi odnosno hrana obogaćena bioaktivnim komponentama (vitaminima, mineralima, antioksidansima, probioticima, omega-3 masnim kiselinama, fenolnim jedinjenjima itd.) postaju standard na tržištu zdrave ishrane. U literaturi se mogu izdvojiti dva različita pristupa primene bioaktivnih komponenti u mlečnim matriksima. Prvi obuhvata direktno obogaćivanje, odnosno neposrednu inkorporaciju ekstrakata, prahova, polisaharida ili drugih funkcionalnih sastojaka u mleko i mlečne proizvode (Corrêa et al., 2018; Silva et al., 2022; Radzki et al., 2023). Drugi pristup podrazumeva stvarnu mikroinkapsulaciju bioaktivnih komponentata primenom mleka ili pojedinačnih mlečnih proteinskih frakcija kao nosača u procesu inkapsulacije (Yadav et al., 2018; Lingua et al., 2025).

Nema inkapsulata koji kombinuju ekstrakt semenke, ekstrakt pečurke i termički tretirani mleko; ali postoje praškaste formulacije koje kombiuju ekstrakt pečurke i termički tretirano mleko; ekstrakt semenke grožđa i termički tretirano mleko; i druge formulacije koje kombinuju mleko i fenolna jedinjenja iz grožđa (Tabela 2.1). Dosadašnja naučna literatura ne navodi podatke o mikroinkapsulatima dobijenim kombinacijom ekstrakta jestive gljive *Agrocybe aegerita*, i ekstrakta semenki grožđa sorte Prokupac na nosaču, obezmašćenom kozjem mleku. Pored toga, prema dostupnim literaturnim podacima ne postoje istraživanja o njihovoj primeni u dehidrisanim prehrambenim proizvodima, poput instant-supe. Stoga je ovo istraživanje usmereno na razvoj optimizovanih mikroinkapsulata (prahova) obogaćenih pomenutim ekstraktima na bazi obezmašćenog kozjeg mleka, uz ispitivanje njihovih antioksidativnih, antimikrobnih i tehnofunkcionalnih svojstava i mogućnosti primene u dehidrisanim prehrambenim proizvodima.

U Tabeli 2.1. su prikazane vrsta bioaktivnih sastojaka, uloga mlečne matrice/nosača, način inkorporacije ili inkapsulacije i neposredno utvrđeni bioaktivni efekti u pojedinačnim studijama.

Tabela 2.1. Mlečni proizvodi i funkcionalni sastojci obogaćeni bioaktivnim komponentama iz gljiva i nusproizvoda grožđa ili dobijeni uz primenu mleka ili pojedinačnih mlečnih proteinskih frakcija kao nosača u procesu inkapsulacije

Proizvod	Bioaktivni sastojak	Mlečna matrica/nosač	Način inkorporacije	Utvrđeni bioaktivni efekti	Reference
Probiotski jogurt	Niskokalorični preparat od grožđa Isabel “Precoco” i brašno dobijeno od čvrstih nusproizvoda grožđa	Probiotski jogurt od kozjeg mleka – prehrambena matrica	Direktna inkorporacija u jogurt	Formulacije sa sastojcima grožđa imale su izražen fenolni profil i viši antioksidativni kapacitet; održani su visoki brojevi <i>L. acidophilus</i> tokom čuvanja; antioksidativni kapacitet je porastao tokom simulirane gastrointestinalne digestije, a senzorna prihvatljivost je poboljšana.	Silva et al., 2022.
UF-Feta sir	Slobodan ekstrakt semenki grožđa (SE) i mikroinkapsulirani ekstrakt (MSE)	UF-Feta sir – prehrambena matrica; nosač: kukuruzni skrob, alginat i ulje repice	Mikroinkapsulacija emulzionom tehnikom; zatim dodatak SE ili MSE u sir	Efikasnost mikroinkapsulacije bila je 53,86%. Dodatak SE i MSE smanjio je oksidaciju masti i nije značajno uticao na pH, kiselost ni broj starter kultura; senzorne ocene MSE sira bile su najniže među ispitivanim uzorcima.	Sekhvatizadeh et al., 2023.
Mešani jogurt sa kulturama <i>Lactobacillus casei</i>	Hidrolizat proteina semenki grožđa (GPH)	Mešani probiotski jogurt – prehrambena matrica	Direktna inkorporacija GPH u jogurt	Dodatak GPH povećao je pH, viskozitet i čvrstoću tekture, smanjio kiselost i sinerezu i usporio pad vitalnosti <i>L. casei</i> tokom čuvanja; svi tretmani bili su senzorno prihvatljivi.	Samadi Varedesara et al., 2021.
Jogurt	Slobodan i mikroinkapsulirani ekstrakt semenki grožđa (GSE)	Nosač: koncentrat proteina surutke (WPC) i guma arabika (3:2); jogurt - prehrambena matrica	Ultrazvučna homogenizacija i sprej-sušenje mikroinkapsulata, zatim dodatak u	Efikasnost inkapsulacije iznosila je 95,9%. Jogurt sa inkapsuliranim GSE imao je približno trostruko viši sadržaj ukupnih fenola i četverostruko višu antioksidativnu aktivnost od kontrole, uz bolju	Yadav et al., 2018.

			mleko pre fermentacije	stabilnost polifenola i senzorna svojstva u odnosu na neinkapsulirani GSE; broj starter kultura nije promjenjen.	
Petit Suisse sir	Liofilizovani nusproizvod vinifikacije (pretežno pokožica i pulpa, uz manji udeo semenki)	Petit Suisse sir od A2A2 kravljeg mleka sa probiotskom kulturom – prehrambena matrica	Direktna inkorporacija 10% liofilizovanog nusproizvoda	Dodatak nusproizvoda povećao je sadržaj pepela, lipida i ugljenih hidrata, smanjio vlagu i proteine, nije narušio stabilnost probiotskih brojeva ni teksturu tokom čuvanja i poboljšao funkcionalna svojstva sira.	Weis et al., 2024.
Funkcionalni sastojak (prah za obogaćivanje hrane)	Vodeni ekstrakt semenki komine grožđa sorte Prokupac (SE), bogat fenolnim jedinjenjima	Termički tretirano obezmašćeno kozje mleko – matrica i potencijalni nosač fenolnih jedinjenja	Dodatak SE u termički tretirano obezmašćeno kotje mleko	Utvrđene su interakcije fenolnih jedinjenja sa mlečnim proteinima, naročito procijanidina sa kompleksima proteina surutke/kazeina; dodatak ekstrakta značajno je poboljšao ispitana antioksidativna svojstva.	Milinčić et al., 2021b.
Funkcionalni sastojak (prah za obogaćivanje hrane)	Ekstrakt semenki komine grožđa sorte Prokupac (SE)	Termički tretirano obezmašćeno kozje mleko – prehrambena matrica/potencijalni nosač	Dodatak SE u termički tretirano obezmašćeno kotje mleko	Nakon digestije oporavak ukupnih fenola, flavan-3-ola i fenolnih kiselina iznosio je 18,11%, 24,54% i 1,17%. Nizak oporavak je povezan sa interakcijama proteina i fenola; digestovani obogaćeni uzorak imao je bolja antioksidativna svojstva od digestovanog mleka (osim kapaciteta heliranja Fe^{2+}).	Milinčić et al., 2022.
Funkcionalni sastojak (prah za obogaćivanje hrane)	Fenolna jedinjenja komine crvenog grožđa (RGP)	Ispitani nosači uključivali su: maltodekstrin (MD), obezmašćeno mleko u prahu (SMP), koncentrat proteina surutke (WPC) i	Mikroinkapsulacija sprej-sušenjem	MD/SMP sistem dao je najveći prinos sušenja i najbolju stabilnost polifenola među ispitanim matricama. Mikroinkapsulacija je poboljšala očuvanje fenolnih	Lingua et al., 2025.

		kukuruzni skrob (S); najbolji sistem bio je MD/SMP (1:1), 300 g/L		jedinjenja i in vitro antioksidativnog kapaciteta tokom 120 dana čuvanja; 15 od 22 jedinjenja bilo je biodostupno, a procenjeno je da je 6,6% potencijalno apsorbovano.	
Funkcionalni sastojak (prah za obogaćivanje hrane)	Vodeni (AE) i polisaharidni (PE) ekstrakti <i>A. blazei</i> Murrill (ABM)	Netretirano i termički tretirano kozje mleko i kazeini termički tretiranog (TCN) i netretiranog (CN) mleka –proteinske matrice	Direktno mešanje/restitucija proteina i ekstrakata	Smeše su pokazale ζ-potencijal negativniji od –41,1 mV. Dodatak ABM ekstrakata povećao je srednji prečnik čestica samo u termički tretiranom mleku (sa 194 na 225 nm), a FTIR je ukazao na promene sekundarne strukture proteina i polisaharid/protein interakcije.	Popović Minić et al., 2023.
Napitak obogaćen proteinima	Polisaharidi <i>T. fuciformis</i> (TP)	5 % rastvor izolata proteina surutke (WPI) – proteinska matrica	WPI obogaćen sa TP	Formiranje WPI–TP kompleksa u rastvoru ; TP je povećao stabilnost 5% WPI rastvora i doveo do uređenije mikrostrukture kompleksa; <i>in vitro</i> brzina digestije WPI–TP bila je niža nego za WPI; mogućnost uticaja na pražnjenje želuca i osećaj sitosti.	Hu et al., 2019.
Jogurt	Liofilizovani prah <i>Pleurotus ostreatus</i>	Jogurt od ovčijeg mleka – prehrambena matrica	Direktna inkorporacija 1, 3 ili 5% praha gljive	Sa porastom udela gljive smanjivali su se vlaga i mast, a povećavali proteini, ugljeni hidrati, kiselost, viskoznost, kapacitet vezivanja vode i tvrdoća. Varijanta sa 1% gljive imala je najbolju senzornu ocenu među obogaćenim uzorcima i bila je slična kontroli.	ALKaisy et al., 2023a.

Jogurt	Sirovi vodorastvorljivi polisaharidi (cWSP) izolovani iz <i>P. ostreatus</i>	Čvrsti jogurt od kravljeg mleka – prehrambena matrica	Direktna fortifikacija mleka sa 0,1–0,5% cWSP pre fermentacije	Sa porastom cWSP povećani su tvrdoća i lepljivost (do približno 7–8 puta u odnosu na kontrolu), ali i sinereza (~10–50%); antioksidativni kapacitet je blago porastao (do ~12% u FRAP testu i ~23% u ABTS testu).	Radzki et al., 2023.
Kefir sa smanjenim sadržajem laktoze	Rastvorljiva frakcija polisaharida (SFP) iz <i>P. ostreatus</i>	Kazein–glukonatna matrica kefira sa smanjenim sadržajem laktoze	Direktno dodavanje SFP (0,5% m/v) rastvorenog u vodi ili mleku pre fermentacije	Kefiri sa rastvorenim SFP u mleku imali su veću čvrstoću, kohezivnost i konzistenciju; smanjena je spontana sinereza surutke i sprečene su promene kapaciteta vezivanja vode. SFP je takođe smanjio osećaj peckanja i svojstva oblaganja u ustima.	Cais-Sokolińska et al., 2018.
Jogurt	Ekstrakt <i>A. blazei</i> bogat ergosterolom	Komercijalni jogurt – prehrambena matrica	Direktna fortifikacija jogurta ekstraktom	Ekstrakt je <i>in vitro</i> pokazao antioksidativni i antimikrobni potencijal bez utvrđene hepatotoksičnosti; dodatak ekstrakta jogurtu povećao je antioksidativna svojstva, bez značajne promene nutritivnog sastava i profila masnih kiselina.	Corrêa et al., 2018.
Instant-supa	Sveža gljiva <i>Agaricus bisporus</i>	Koncentrovana surutka od sira – sastojak/matrica supe	Kuvanje gljive sa koncentrovanom surutkom i sprej-sušenje radi dobijanja instant-praha	Prah se dobro rekonstituisao nakon kuvanja u vodi. Tokom skladištenja menjala su se pojedina fizičko-hemijska svojstva, a rekonstituisana supa je nakon osam meseci na 30 °C imala ukupnu ocenu prihvatljivosti od 7,1.	Singh et al., 2003.

Krem sir	Liofilizovani prah plodonosnog tela <i>A. aegerita</i>	Krem sir od kravljeg mleka – prehrambena matrica	Direktno mešanje 3 g praha gljive sa 100 g krem sira	Metanolni ekstrakt gljive pokazao je antioksidativnu aktivnost. Krem sir obogaćen prahom <i>A. aegerita</i> bio je senzorno prihvatljiviji od kontrolnog sira (prosečna ocena 4,39 naspram 3,86)	Petrović et al., 2015.
Beli sir sličan Feta siru	Ekstrakt <i>A. bisporus</i> bogat fenolima (PRE)	UF-retentat za Feta-tip sira – prehrambena matrica	Direktno dodavanje PRE (0, 50, 100 i 200 µg/mL retentata) tokom proizvodnje sira	PRE je <i>in vitro</i> pokazao koncentraciono zavisnu antioksidativnu i antibakterijsku aktivnost; u siru je smanjio ukupan broj bakterija, plesni i kvasaca u odnosu na kontrolu; autori su 100 µg/mL predložili kao koristan nivo dodatka za poboljšanje mikrobiološkog kvaliteta i roka održivosti	Osman & Abd El-Wahed, 2019
Probiotski jogurt sa β-glukanom (imuno jogurt)	β-glukani iz <i>Ganoderma lucidum</i>	Jogurt – prehrambena matrica	Direktno dodavanje 350 mg β-glukana u jogurt	β-glukani pokazali imunomodulatorno delovanje; randomizovano, dvostruko slepo, placebo-kontrolisano ispitivanje kod dece uzrasta 3–5 godina pokazalo je viši apsolutni broj ukupnih, CD3+, CD4+ i CD8+ limfocita; intervencija je bila bezbedna i dobro podnošljiva.	Duque Henao et al., 2018

2.9 *In vitro* digestija i biodostupnost bioaktivnih komponenata u složenim matriksima na bazi proteina kozjeg mleka

Da bi fenolna jedinjenja ispoljila biološke efekte u organizmu, jedan od preduslova je njihovo oslobađanje (biodostupnost) iz kompleksnog matriksa hrane tokom digestije i prisustvo u frakciji potencijalno dostupnoj za intestinalnu apsorpciju. Biodostupnost je prvi ograničavajući faktor ukupne biološke raspoloživosti ovih komponenata (Anson et al., 2009). *In vitro* simulacija gastrointestinalne digestije (GID) predstavlja pouzdan i često korišćen pristup za procenu *in vitro* biodostupnosti fenolnih jedinjenja. Ova metoda oponaša uslove koji vladaju u različitim delovima ljudskog digestivnog trakta (usna duplja, želudac, tanko crevo, a ponekad i debelo crevo) primenom odgovarajućih enzima, žučnih soli, odgovarajućeg pH i temperature. Na taj način moguće je pratiti koliko se određeno fenolno jedinjenje ili grupa jedinjenja oslobađa iz hrane tokom varenja i ostaje stabilna ili postaje dostupna za apsorpciju. Taj procenat oslobođene komponente definiše biodostupnost u uslovima simulirane digestije (Wojtunik-Kulesza et al., 2020). Biodostupnost fenolnih jedinjenja zavisi od hemijske strukture jedinjenja, njihove koncentracije u matriksu, sastava matriksa hrane, interakcije sa drugim komponentama, stabilnosti pri različitim pH vrednostima i od prisustva digestivnih enzima (Wojtunik-Kulesza et al., 2020; Kostić et al., 2021).

Matriks kozjeg mleka može značajno uticati na zaštitu i oslobađanje bioaktivnih ekstrakata tokom simulirane gastrointestinalne digestije. Proteini kozjeg mleka imaju sposobnost da vezuju fenolna jedinjenja putem nekovalentnih interakcija (hidrofobne interakcije, vodonične veze i sl.), pri čemu na intenzitet vezivanja utiču pH, temperatura, i struktura polifenola (Ma et al., 2024). U model sistemu obezmašćenog kozjeg mleka obogaćenog polenom (bogat flavonoidima i fenolnim kiselinama), nakon kompletne *in vitro* digestije stepen oporavka ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja iznosio je svega 30,71 %, uz veći oporavak fenolnih kiselina (40,10 %) nego flavonola (28,30 %) (Kostić et al., 2021). Smanjena biodostupnost ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja se često objašnjava njihovom tendencijom da interaguju sa proteinima mleka i/ili digestivnim enzimima, smanjenom solubilizacijom u digestivnom koktelu, i ograničenom stabilnošću u gastrointestinalnim uslovima. Milinčić et al. (2022) su kod termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka u prahu obogaćenog ekstraktom semenki komine grožđa utvrdili da je nakon *in vitro* digestije stepen oporavka ukupno kvantifikovanih fenolnih jedinjenja iznosio 18,11 %, flavan-3-ola 24,54 %, a fenolnih kiselina 1,17 %. Autori navode više mogućih razloga za nizak ili odsutan oporavak pojedinih jedinjenja: smanjenu stabilnost i transformaciju u digestivnom koktelu, degradaciju ili interakcije sa komponentama digestivnog sistema i moguće zadržavanje u nerastvorljivoj frakciji. Elektroforezom je u rastvorljivoj digestovanoj frakciji potvrđena hidroliza mlečnih proteina. Usled odsustva fenolnih jedinjenja u digestovanoj frakciji, autori ukazuju na mogućnost prisustva ovih jedinjenja u nerastvornoj/nedigestovanoj frakciji koja dalje podleže digestiji u kolonu, gde se mogu ova jedinjenja osloboditi i dalje transformisati (Milinčić et al., 2022). Takodje, autori su uočili da digestovana frakcija analiziranog uzorka pokazuje niži antioksidativni kapacitet i nižu redukujuću moć od nedigestivanog uzorka (Milinčić et al., 2022). Važno je napomenuti da se tokom digestije proteini mleka razlažu enzimima, što može dovesti do delimičnog oslobađanja vezanih fenolnih jedinjenja u kasnijim fazama (intestinalnoj) digestije. Međutim, kada se fenolna jedinjenja oslobode, oni su izloženi alkalnoj pH i enzimima creva, što može dovesti do njihove degradacije ili transformacije (Kostić et al., 2021; Milinčić et al., 2022). Sa druge strane, neka jedinjenja poput fenolnih kiselina mogu biti čak i generisana ili transformisana tokom digestije. Ferreira-Santos et al. (2024) su, u ekstraktu komine grožđa, tokom digestije zabeležili povećanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i biotransformaciju visokomolekularnih fenolnih jedinjenja (flavonoida, anticijanina i resveratrola) u jednostavnije fenolne kiseline, povećavajući njihovu biodostupnost.

Polisaharidi iz ekstrakata (npr. β -glukan iz gljiva) ponašaju se drugačije od fenolnih jedinjenja. Oni nisu podložni razgradnji delovanjem ljudskih digestivnih enzima, zbog čega u najvećoj meri prolaze

nepromenjena kroz želudac i tanko crevo. U prisustvu mlečnih proteina, ovi polisaharidi mogu uspostaviti interakcije koje mogu da utiču na mikrostrukturu proizvoda (Ma et al., 2024). U studiji Tu et al. (2021), keksovi od sirka su obogaćeni prahom gljiva *Lentinula edodes*, *Auricularia auricula* i *Tremella fuciformis* (5–15%). Nakon *in vitro* digestije u gastričnom i intestinalnom supernatantu većine obogaćenih uzoraka, utvrđeni su viši sadržaji fenolnih jedinjenja i veća antioksidativna aktivnost u odnosu na kontrolu, dok su u nedigestovanoj frakciji ostali veći udeli fenolnih jedinjenja i β -glukana. Na osnovu sastava nedigestovane frakcije autori su procenili da deo β -glukana i vezanih fenolnih jedinjenja potencijalno može dospeti do kolona (Tu et al., 2021). Drugi primer je istraživanje gde je liofilizovani ostatak nakon hidroalkoholne ekstrakcije *A. blazei* (MAR) dodat u mleko. Nakon *in vitro* digestije ovaj uzorak je imao viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i veći antioksidativni kapacitet meren FRAP, ABTS i DPPH testovima u odnosu na mleko bez MAR. Ovi rezultati ukazuju na to da su fenolne komponente i antioksidativna aktivnost bile očuvane i nakon digestije uzorka sa MAR (Vital et al., 2017). U sistemima na bazi kozjeg mleka, interakcije između proteina i polifenola, kao i njihova hemijska stabilnost, promene tokom digestije i prisustvo drugih komponenti, mogu značajno uticati na *in vitro* iskorišćenje i biodostupnost fenolnih jedinjenja (Kostić et al., 2021; Milinčić et al., 2022; Ma et al., 2024). Za polifenole povezane sa dijetetskim vlaknima i nedigestovanu frakciju β -glukana pretpostavlja se da mogu dospeti do donjih delova gastrointestinalnog trakta, gde mogu biti dalje transformisani delovanjem mikrobiote debelog creva (Tu et al., 2021; Fernandes et al., 2023). Biodostupnost fenolnih jedinjenja zavisi od matriksa i uslova digestije, pa se odgovarajućim izborom nosača može se delimično prevazići problem niske biodostupnosti. U prisustvu nosača poput mlečnih proteina, fenolna jedinjenja mogu biti zaštićena od degradacije, međutim proteini mleka takođe mogu značajno uticati na njihovu apsorpciju (Milinčić et al., 2022).

3 MATERIJAL I METODE

3.1 Priprema polaznih sirovina i ekstrakata

3.1.1 Priprema vodenog ekstrakta gljive

Plodonosno telo gljive *A. aegerita* je sakupljeno na području Ade Ciganlije u Beogradu tokom 2022. godine. Identifikaciju je izvršio dr Dejan Stojković, viši naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu (dalje u tekstu IBISS), na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Nakon identifikacije, plodonosno telo je liofilizovano (*LH Leybold, Lyovac GT2*, Frankendorf, Švajcarska) i usitnjeno u laboratorijskom blenderu. Takođe, u kolekciji Mikološke laboratorije IBISS-a sačuvan je i vaučer primerak plodonosnog tela, pod šifrom Aa_IBISS_2022. Fino usitnjen prah plodonosnog tela gljive, čuvan na 4 °C, zaštićen od svetlosti je predstavljao polaznu sirovinu za dobijanje vodenog ekstrakta.

Vodeni ekstrakt gljive (ME) je dobijen prema modifikovanoj metodologiji koju su prethodno opisali Vamanu & Nita (2013). Uzorak (10 g) liofilizovanog praha gljive je ekstrahovan sa 200 mL milliQ vode tokom 90 min, primenom ultrazvučnog kupatila (*Vabsonic SB-10LP*) na sobnoj temperaturi. Ekstrakt gljive je nakon ekstrakcije filtriran primenom (*Whatman No. 4*) filter papira, dok je ostatak ponovo ekstrahovan, dva puta po istom postupku. Kombinovani ekstrakt gljive je potom liofilizovan (*LH Leybold, Lyovac GT2*, Frankendorf, Švajcarska) i skladišten na 4 °C do dalje upotrebe.

3.1.2 Priprema ekstrakta semenke grožđa

Komina Prokupca se sakupljala odmah nakon fermentacije i odvajanja vina. Uzorci komine su zamrznuti i doprmljeni do laboratorije. Komina je uzeta iz vinarije "Vinska kuća Milinčić" iz Aleksandrovca. Semenke grožđa su ručno odvojene iz fermentisane komine, osušene i samlevene u mlinu za kafu (*Bosch MKM 6003 UC, BSH Hausgeräte GmbH*, Minhen, Nemačka). Dobijeni fini prah je pakovan u vakuum kese i skladišten u zamrzivaču do dalje upotrebe.

Ekstrakt semenki grožđa (GPE) je pripreman kako je prethodno opisano u radu Pešić et al. (2019). Prah semenki (1 g) je ekstrahovan tri puta sa 10 mL smeše metanola/vode (80/20) i 0,1 % HCL. Nakon toga, ekstrakcija je vršena na sobnoj temperaturi 1 sat, korišćenjem mehaničke mešalice (*Thys 2, MLW Labortechnik GmbH*, Seelbach, Nemačka). Nakon ove faze ekstrakcije, ekstrakti su skladišteni u frižideru na 5 °C, tokom 22 sata, filtrirani primenom (*Whatman No. 42*) filter papira i sakupljeni. Kombinovani supernatanti su zatim upareni do suvog ostatka pomoću rotacionog vakuum uparivača (*Heidolph, Laborota 4000*, Schwabach, Nemačka) na temperaturi 40 °C. Nakon uparavanja, suvi ostatak je rastvoren u 15 mL MilliQ vode i ovi rastvori su potom liofilizovani i korišćeni za dalju karakterizaciju.

3.1.3 Priprema termički tretiranog obezmašćenog mleka, kazeinske frakcije i frakcije serum proteina

Sveže kozje mleko je nabavljeno od lokalne mlekare "Select Milk" iz Indije, Srbija i odmah obezmašćeno. Ukratko, sirovo kozje mleko je inkubirano u vodenom kupatilu na 30°C tokom 30 min, zatim centrifugirano pri 3000 x g tokom 30 min, na 5 °C. Nakon toga, mleko je prebačeno u ledeno kupatilo na 30 min.

Lipidna frakcija je uklonjena, a odmašćeno mleko je podvgnuto termičkom tretmanu na 90° C, 10 min prema metodologiji koju su prethodno opisali Pešić et al. (2012). Uzorci mleka (TM) su dalje sprej-sušeni, koristeći laboratorijski uređaj Mini B-290 (*Büchi Labortechnik AG*, Flawil, Švajcarska),

uz primenu sledećih parametara: ulazna temperatura 130 °C; izlazna temperatura 70 °C; protok vazduha 600 L/h; protok tečnosti 8mL/min; pritiskom atomizera 0,55 bar. Po završetku procedure, uzorci su čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

Kazeini termički tretiranog i netretiranog mleka dobijeni su izoelektričnom precipitacijom kazeina na pH 4,2 korišćenjem 1 M rastvora HCl. Precipitirani kazeini su odvojeni od serum faze mleka centrifugiranjem na 4000 × g tokom 20 min. Kazein je zatim rastvoren dodatkom Milli-Q vode, a pH vrednost je podešena na 6,7 pomoću 1 M rastvora NaOH (Popović Minić, 2023). Dobijeni rastvor izliven je u posude, zamrznut na -20 °C i nakon toga liofilizovan. Serum faza mleka, preostala nakon izoelektrične precipitacije kazeina takođe je zamrznuta na -20°C i nakon toga liofilizovana.

Za potrebe ove doktorske disertacije pripremljenu su sledeći uzorci kozjeg mleka: TM (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko); TCN (termički tretirani kazeini kozjeg mleka); TWP (termički tretirani proteini surutke kozjeg mleka).

3.2 Karakterizacija polaznih ekstrakata

3.2.1 Karakterizacija vodenog ekstrakta gljive

3.2.1.1 Određivanje ukupnog sadržaja proteina

Ukupan sadržaj proteina u ispitivanih uzorcima ekstrakta gljive određeni su Bradford metodom (Bradford, 1976), koristeći albumin goveđi serum (BSA) kao standard. Uzorak (100 µL) dodat je u 5 mL Bradfordovog reagensa, a dobijena smeša je homogenizovana vorteksiranjem i inkubirana 20 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, apsorbanca je spektrofotometrijski određena pri talasnoj dužini od 596 nm. Koncentracije proteina izražene su kao g BSA ekvivalenta na 100 g liofilizovanog uzorka (g BSA/100 g).

3.2.1.2 Određivanje sadržaja ukupnih glukana

Sadržaj α- i ukupnih glukana u vodenom ekstraktu gljive određen je korišćenjem Megazim enzimskog kita (*Megazyme*, Bray, Wicklow, Irska), prema specifikaciji proizvođača. Sadržaj β-glukana određen je kao razlika između ukupnog sadržaja glukana i sadržaja α-glukana. Apsorbanca je merena pri 510 nm, a rezultati su izraženi kao g glukanske frakcije na 100 g uzorka (Popović Minić et al., 2022).

3.2.1.3 Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određen korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa, kako je prethodno opisano u radu Milinčić et al. (2021b). Ukratko, alikvot razblaženog uzorka (70 µL) je pomešan sa 300 µL Follin-ovog reagensa i 230 µL 7 % Na₂CO₃, nakon čega je usledila inkubacija tokom 90 min na sobnoj temperaturi. Apsorbancija rastvora je merena spektrofotometrijski na 765 nm. Rezultati su izraženi kao g ekvivalenta galne kiseline na 100 g uzorka (g GAE/100 g).

3.2.1.4 Antioksidativna svojstva

3.2.1.4.1 Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona (redukujuća moć) (FRP)

Redukujuća moć uzoraka je sprovedena po metodi koju su prethodno opisali Pešić et al. (2019). Ukratko, alikvot razblaženog uzorka (250 µL) je pomešan sa 0,2 M fosfatnim puferom, pH 6,6 (250 µL) i 1 % rastvorom kalijum fericijanida (250µL), nakon čega je smeša inkubirana 20 min, na 50 °C. Nakon toga, dodat je 10 % rastvor TCA (250µL), a dobijena smeša je centrifugirana na 17000 x g (*Sigma 201M Centrifuge*, Osterode am Harz, Nemačka) tokom 5 min. Dobijeni supernatant (500 µL) je pomešan sa 500 µL MilliQ vode i 0,1 % rastvora FeCl₃ (100 µL) i inkubiran 10 min, nakon čega je izmerena apsorbancija na 700 nm (*UV-1800*, Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). Rezultati su izraženi kao µg ekvivalenta askorbinske kiseline po mL uzorka (µg AA/mL).

3.2.1.4.2 Sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} radikal katjona (ABTS^{•+} test)

Sposobnost sakupljanja slobodnih radikala određena je prema postupku koji su opisali Milinčić et al. (2021a). Osnovni rastvor (7mM vodeni rastvor ABTS (2,2-azino-bis/3-etil-benotiazolin-6-sulfonska kiselina) pomešan sa 2,45 mM kalijum-persulfatom), inkubiran je u mraku 16 h. Radni rastvor ABTS^{•+} pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora metanolom da bi se dobila apsorbancija između 0,7 i 0,8 na 734 nm. Nakon toga, 10 µL uzorka pomešano je sa 1 mL radnog rastvora ABTS^{•+}, a nakon 7 min merena je apsorbancija na 734 nm (*UV-1800*, Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). Vrednosti su izračunate prema jednačini koju su opisali Pešić et al. (2019):

$$\text{ABTS}^{\bullet+} (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (1)$$

gde je A_c apsorbancija radnog rastvora ABTS^{•+}, A_s je apsorbancija uzorka ili standardnog rastvora pomešan sa radnim rastvorom ABTS^{•+}.

Za kreiranje kalibracione krive korišćeni su rastvori askorbinske kiseline u rasponu od 10 do 100 µg/mL. Rezultati su izraženi kao µg ekvivalenata askorbinske kiseline po mL uzorka (µg AA/mL).

3.2.1.4.3 Sposobnost sakupljanja DPPH• radikala (DPPH• test)

DPPH• test je sproveden prema postupku koji su prethodno opisali Milinčić et al. (2021a). Ukratko, uzorci (105 µL) su pomešani sa radnim rastvorom DPPH• (840 µL), izmešani na vorteksu i inkubirani na mračnom mestu 30 min. Nakon toga je merena apsorbancija na 515 nm (*UV-1800*, Shimadzu USA Manufacturing Inc., Canby, OR, USA). Kontrola se sastojala od mešavine DPPH• radnog rastvora i milliQ vode. Procenat sakupljenih radikala je izračunata prema jednačini:

$$\text{DPPH}^{\bullet} (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (2)$$

gde je A_c apsorbancija radnog rastvora DPPH• pomešanog sa milliQ vodom, A_s je apsorbancija uzorka ili rastvora standarda pomešanog sa DPPH• radnim rastvorom.

Vrednosti su izražene kao µg/mL ekvivalenata Troloksa po mL uzorka (µg TE/mL).

3.2.1.4.4 Sposobnost heliranja Fe²⁺ jona (CHE)

Sposobnost heliranja jona gvožđa je određena prema metodi koju su prethodno opisali Pešić et al. (2019). Ukratko, alikvot uzorka (200 µL) je pomešano sa 740 µL milliQ vode i 20 µL 2mM FeSO₄. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodato 200 µL 5mM ferozina. Nakon 10 min merena je apsorbancija reakcione smeše na 562 nm u odnosu na slepu probu koja sadrži milliQ vodu umesto alikvota uzorka. CHE je izračunat prema jednačini:

$$\text{CHE} (\%) = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (3)$$

gde je A_c apsorbancija slepe probe, A_s je apsorbancija uzorka.

Vrednosti su izražene kao µg ekvivalenata EDTA (etilendiaminotetrasirćetne kiseline) po mL uzorka (µg EDTA/mL).

3.2.1.5 Proteinski profil vodenog ekstrakta gljive (elektroforetska analiza)

SDS poliakrilamidna gel elektroforeza u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE) je izvedena prema postupku koji su prethodno opisali Pešić et al. (2012) na sledeći način: gelovi za razdvajanje (12,5 % w/v; pH = 8,85) i gelovi za koncentrisanje (5 % w/v; pH = 6,8), sa radnim Tris-glicinskim puferom (0,05 M Tris, pH 8,5; 0,19 M glicin; 0,1% (w/v) SDS). Uzorci (50mg) su rastvoreni u 1 mL pufera

koji sadrži 0,055 M Tris-HCl (pH = 6,8), 2 % (w/v) SDS, 7 % (v/v) glicerola, 0,0025 % (w/v) bromfenol plavog i 5 % β -merkaptotetanol. Alikvoti uzoraka (50 μ L) su odmereni u bunariće gela, nakon čega je elektroforeza sprovedena pri struji od 30 mA tokom prvih 30 min, a zatim je struja povećana na 60 mA, uz maksimalni napon od 500 V. Elektroforetska separacija trajala je ukupno 3 h. Nakon razdvajanja, gelovi su obojeni rastvorom Coomassie blue boje (0,23 g/100 g Coomassie brilliant blue R250, 3,90 g/100 g trihlorsirćetne kiseline (TCA), 6 mL/100 mL sirćetne kiseline i 17 mL/100 mL metanola) tokom 45 min. Po isteku vremena, gelovi su odbojeni, skenirani i analizirani pomoću softvera GelAnalyzer 19.1 softver. Molekulska težina detektovanih polipeptidnih traka je procenjena korišćenjem standarda molekulske težine kao što je prethodno opisano od strane Pešić et al. (2012).

3.2.1.6 ATR-FTIR spektroskopija

Dobijeni ekstrakti su analizirani korišćenjem IRAffinity-1 spektrometra opremljenog sa ATR jedinicom (Shimadzu, Kyoto, Japan). Spektri su prikupljeni u opsegu talasnih brojeva od 4000-600 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} , nakon 100 skeniranja.

3.2.1.7 Fenolni profil (hromatografska analiza)

Liofilizovani vodeni ekstrakti *A. aegerita* su ekstrahovani sa 80 % metanolom koji sadrži 0,1 % HCL. Uzorci su energično mešani 60 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su centrifugirani na 17,000 x g tokom 5 min i filtrirani kroz filtere od 0,45 μ m. Sakupljeni supernatanti su korišćeni za dalju hromatografsku analizu.

Karakterizacija i identifikacija bioaktivnih jedinjenja izvršene su na *Agilent 1290 Infinity* UHPLC (tačna hromatografija ultra-visokih performansi) uređaju koji je spregnut sa kvadrupolnom masenom spektrometrijom vremena proleta (6530C QToF-MS) (*Agilent Technologies, Inc.*, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Hromatografsko razdvajanje je izvršeno prema postupku opisanom u radu Milinčić et al. (2024b), na koloni Zorbax C18 (2,1 x 50 mm, 1,8 μ m) na 40 °C. Smeše mobilnih faza sastojale su se od (A) ultračiste vode i (B) acetonitrila (MS čistoće) pri čemu su i faza A i faza B sadržale 0,1 % mravlje kiseline. Brzina protoka mobilne faze bila je podešena na 0,3 mL min^{-1} , a zapremina injektovanja na 5 μ L. Program gradijentnog eluiranja započet je sa 2 % rastvarača B tokom prva 2 min, zatim je tokom narednih 17 min, udeo rastvarača B dostigao 98 %, a tokom sledećih 5 min gradijent je vraćen na početne uslove (2 % B) radi ponovnog uspostavljanja ravnoteže u koloni i pripreme za ponovno injektovanje. QToF-MS sistem je bio opremljen Agilent Jet Stream elektrosprej jonizacionim izvorom (ESI), koji radi u pozitivnom (ESI +) i negativnom (ESI -) režimu jonizacije. Sva identifikovana jedinjenja (organske kiseline, fenolne kiseline i drugi derivati) potvrđena su u režimu negativne jonizacije, korišćenjem Auto MS/MS akvizicije (m/z = 100 – 1500, brzina skeniranja 5 spektara/s) pri čemu je energija sudara bila podešena na 30 eV. Radni ESI parametri su bili: pritisak nebulizatora (45 psi), temperatura gasa za sušenje (225 °C) i brzina protoka (8 L/min), temperatura „sheath” gasa (300 °C) i brzina protoka ovog gasa (10 L/min), kapilarni napon (2500 V), energija fragmentora (175 V), napon skimera (65 V) i RF peak napon na oktopolu (750 V). QToF-MS sistem je beležio spektre u m/z opsegu od 100-1700 sa brzinom skeniranja od 2 Hz. *Agilent Mass Hunter* softver (*Mass Hunter Workstation za LC/QtoFM5960AA*) korišćen je za obradu i analizu podataka. Organske kiseline i fenolna jedinjenja identifikovani su na osnovu tačne m/z vrednosti, karakterističnih MS fragmenata i dostupnih podataka iz literature. Tačne mase jedinjenja izračunate su pomoću softvera ChemDraw (verzija 12.0, *CambridgeSoft*, Kembriđž, MA, USA).

3.2.2 Karakterizacija ekstrakta semenke grožđa

3.2.2.1 UHPLC QToF-MS karakterizacija fenolnih jedinjenja

Karakterizacija i identifikacija fenolnih jedinjenja je sprovedena i analizirana na isti način kako je opisano u prethodnom poglavlju 3.2.1.7. Radni UHPLC, ESI i Q-ToF parametri su bili isti; kao i princip identifikacije fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenke grožđa.

3.2.2.2 Antioksidativna svojstva

Antioksidativna svojstva (sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaj ukupnih flavonoida i sadržaj ukupnih proantocijanidina) u vodenom ekstraktu semenke su određena prema metodama koje su detaljno opisali Pešić et al. (2019). Ukratko, sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određen mešanjem vodenog ekstrakta semenke sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom i 7,5 % Na_2CO_3 . Nakon 1 sat i 30 min, merena je apsorbanca na 765 nm, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenti galne kiseline (GAE) po g suve materije (s.m.) uzorka. Za određivanje sadržaja ukupnih flavonoida je korišćen test baziran na formiranju flavonoid-aluminijum kompleksa. Vodeni ekstrakt semenke je prvo mešan sa milliQ vodom i 5 % NaNO_2 , a zatim su u mešavinu dodati 10 % AlCl_3 posle 6 min i 1M NaOH nakon 5 min. Nakon toga, merena je apsorbanca na 510 nm, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenti katehina (CE) po g suve materije (s.m.) uzorka. Sadržaj ukupnih proantocijanidina je određen korišćenjem butanol-HCl testa. Vodeni ekstrakt semenke je mešan sa butanol-HCl reagensom i 2 % $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ u 2 mol/L HCl, intenzivno vorteksovani i inkubirani 40 min, na 90 °C. Apsorbanca je merena na 510 nm, a rezultati su izraženi kao mg PA po g SM uzorka i izračunati prema jednačini koju su dali Lavelli et al. (2014). Sva očitavanja apsorbanca su određena na UV-1800 Shimadzu spektrofotometru (USA Manufacturing Inc, UR, USA).

3.2.3 Karakterizacija proteinskih frakcija kozjeg mleka

3.2.3.1 Tehno-funkcionalna svojstva

3.2.3.1.1 Emulgujuća svojstva

Odmereno je 0,1 g svake frakcije mleka i rastvoreno u 50 mL destilovane vode. pH je podešen na 6,7 uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici. Svi uzorci su potom mešani na mehaničkoj mešalici tokom 2 h, nakon čega je proverena. pH vrednost je proverena i po potrebi podešena na 6,7. Uzorci su dopunjeni do 100 mL destilovanom vodom.

Emulgujuća svojstva su određena primenom turbidimetrijske metode (Pearce & Kinsella, 1978). Emulzije su pripremane tako što je 15 mL suncokretovog ulja pomešano sa 45 mL 0,1 % rastvora proteina mleka (pH 6,7) i homogenizovano (Ultraturax) pri najvećoj brzini u trajanju od 1 min. Sa dna posude uzeto je 100 μL emulzije, koja je potom raspodeljena u dve epruvete sa po 5 mL 0,1% rastvora SDS-a. Nakon toga, sadržaj epruveta je homogenizovan intenzivnim vorteksovanjem, a nakon uklanjanja mehurića vazduha, apsorbanca rastvora merena je na 500 nm (A_0). Nakon isteka 10 min postupak je ponovljen od momenta formiranja emulzije (A_{10}).

Indeks stabilnosti emulzije (ESI) izračunat je prema obrascu:

$$\text{ESI (min)} = A_0 \times \Delta t / \Delta A \quad (4)$$

pri čemu je: Δt – vremenski interval između dva merenja apsorbanca (10 min); ΔA – razlika između vrednosti apsorbanca u momentu formiranja emulzije i nakon 10 min ($A_0 - A_{10}$).

Indeks aktivnosti emulzije (EAI) izračunat je prema sledećem obrascu:

$$\text{EAI (m}^2\text{/g)} = 2T (A_0 \times F) / *C \times \phi \times 10.000 \quad (5)$$

Pri čemu je: T = 2,203; F – faktor razblaženja (100); C – koncentracija proteina mleka izražena kao masa proteina mleka po jedinici zapremine rastvora (gml^{-1}); $\phi = 0,25$.

3.2.3.1.2 Peniva svojstva

Za određivanje penivih svojstava, uzorci mleka su pripremani tako što je odmereno 2 g svake frakcije mleka i rastvoreno u 50 mL destilovane vode. pH vrednost je podešena na 6,7, a zatim je dobijena smeša podvrgnuta homogenizaciji na mehaničkoj mešalici u trajanju od 2h. Nakon homogenizacije proverena je pH vrednost, i po potrebi podešena na 6,7 i dopunjena do 100 mL destilovanom vodom. Peniva svojstva mleka određena su prema metodi Barać et al. (2010) uz modifikaciju. Odmereno je 30 mL (V_0) 2 % rastvora protein mleka i sipano u graduisanu kolonu. Pri protoku od $6 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ rastvor je uveden vazduh kroz uređaj za degaziranje postavljen na dno kolone u trajanju od 1 min. Neposredno nakon uvođenja vazduha u rastvor, očitana je zapremina do koje se podigla pena u koloni (V_1). Zatim je ponovo očitavan nivo pene nakon 3 min (V_3).

Kapacitet pene (KP) je izračunat prema sledećem obrascu:

$$\text{KP (\%)} = V_1 - V_0 / V_0 \times 100 \quad (6)$$

a stabilnost pene (SP) je izračunata prema obrascu:

$$\text{SP (\%)} = V_3 - V_0 / V_0 \times 100 \quad (7)$$

3.2.3.2 Elektroforetska analiza proteina

Za analizu proteinskih profila kozjeg mleka i proteinskih frakcija (kazeina i serum proteina) korišćena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza u redukujućim (SDS-R-PAGE) uslovima, koja je detaljno opisana u radu Pešić et al. (2012).

3.3 Dizajn eksperimenta i optimizacija formulacija mikroinkapsulata

Eksperimentalni dizajn predstavlja pogodnu i efikasnu metodologiju za proučavanje složenih procesa i optimizaciju eksperimentalnih uslova u prehrambenoj industriji (Mazzara et al., 2021; Lučić et al., 2023). Primena statističkih metoda u planiranju eksperimenata omogućila je efikasnije ispitivanje istovremenih efekata više faktora, kao i određivanje optimalnog odnosa formulacije između tri glavne komponente (npr. ekstrakt semenke grožđa, ekstrakt gljive i matrice na bazi kozjeg mleka). Da bi se testirao uticaj ekstrakta gljive i sadržaj ekstrakta semenke grožđa na funkcionalna svojstva formulacije, ova dva faktora su ispitana korišćenjem metodologije odgovora površina (RSM - *Response Surface Methodology*). RSM predstavlja skup statističkih i matematičkih tehnika koje se koriste za modeliranje i optimizaciju procesa u kojima više nezavisnih promenljivih utiče na određeni odgovor (Ponnusamy, 2019). Uticaj eksperimentalnih parametara na svojstva formulacije mikroinkapsulata je ispitivan korišćenjem centralnog kompozitnog dizajna (CCD) kao pristupa metodologiji odgovora površina (RSM).

Ispitani faktori su testirani na tri nivoa (nizak, srednji i visok). Nivoi faktora u CCD-u za proizvod na bazi proteina kozjeg mleka sa ekstraktom gljive i ekstraktom semenke grožđa prikazani su u tabeli 3.1, a odabrani su na osnovu ranijih istraživanja opisanih u Milinčić et al. (2021b; 2025b). Primenom statističkog softvera MINITAB (Release 16, Minitab Inc., State College, PA), za dva ispitivana parametra i centralni kompozitni dizajn dobijena je matrica sa rasporedom nivoa faktora, odnosno matrica sa eksperimentalnim uslovima, kao što je prikazano u tabeli 3.2.

Tabela 3.1. Ekperimentalni faktori i nivoi faktora.

Faktor	-1 (Nizak)	0 (Srednji)	+1 (Visok)
w (ME), % (m/m)	0,1	0,3	0,5
w (GPE), % (m/m)	0,1	0,3	0,5

Dobijena matrica predstavlja potpuni faktorski dizajn koji je obuhvatao ukupno 13 eksperimenata, od kojih je 4 na stranicama kocke, 5 centralnih tačaka i 4 aksijalne tačke (sa aksijalnim rastojanjem $\alpha = 1$) (Tabela 3.2.). Kako bi se smanjila verovatnoća da nekontrolisani faktori utiču na rezultat, eksperimenti su izvođeni nasumičnim redosledom. Eksperimentalna merenja svih zavisnih varijabli (TPC, ABTS⁺, DPPH[•], FRP i CHE) izvršena su u tri ponavljanja, a kao odgovor je uzeta njihova srednja vrednost.

Tabela 3.2. Centralni kompozitni dizajn stvarne vrednosti

Broj eksperimenata	w (ME), %	w (GPE), %
1	0,3	0,1
2	0,1	0,1
3	0,5	0,1
4	0,1	0,3
5	0,5	0,5
6	0,3	0,3
7	0,3	0,3
8	0,1	0,5
9	0,3	0,5
10	0,3	0,3
11	0,3	0,3
12	0,5	0,3
13	0,3	0,1

3.3.1 Priprema različitih formulacija mikroinkapsulata

Prah termički tretiranog kozjeg mleka dobijen sprej sušenjem, rekonstituisan je milliQ vodom (1:10 w/v , 10 %), a pH vrednost je podešena na 6,5. Uzorci su u prvoj fazi liofilizacije zamrzavani primenom temperature u opsegu od -90 °C do -40 °C. Zatim je, pod vakuumom, pri odgovarajućoj temperaturi i pritisku od 10 Pa, rastvarač uklonjen sublimacijom, čime su dobijeni liofilizovani uzorci. Nakon toga, prema faktorskom dizajnu (Tabela 3.2.), predložene količine liofilizovanog ekstrakta pečurke i liofilizovanog ekstrakta semenke grožđa dodate su u pripremljeno mleko. Nakon dodavanja ekstrakta semenke grožđa i ekstrakta gljive, pH vrednost je praćena pomoću kalibrisanog pH metra i podešena na 6,5 pomoću 1M HCl. Dobijene smeše su homogenizovane 1 h na mehaničkoj mešalici (MX-RD-E, DLAB Scientific Co., Ltd., Peking, Kina), nakon čega su korišćene za dalje analize. Optimalni nivoi ekstrakta gljive i ekstrakta semenke grožđa određeni su na osnovu modelovanih odgovora primenom funkcije ukupne poželjnosti, a detalji i rezultati dati su u poglavlju 4.4.1.

3.3.2 Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativna svojstva pripremljenih formulacija mikroinkapsulata

Ukratko, za određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, 35 μL odgovarajuće razblaženih uzoraka pomešano je sa Folin-Ciocalteu reagensom (150 μL) i 7,5 % natrijum karbonatom (115 μL). Reakciona smeša je ostavljena da reaguje 1h i 30 min na tamnom mestu, a apsorbanca rastvora je nakon inkubacije merena na 765 nm. TPC je izražen kao mg ekvivalenta galne kiseline na 100 mL (mg GAE/100 mL). Antioksidativni testovi, kao što su FRP, ABTS^{•+}, DPPH[•], i CHE pripremljenih smeša su određeni kao što su prethodno opisali (Milinčić et al., 2021b; Kostić et al., 2021; Pešić et al., 2019). Za ABTS^{•+} test, 15 μL uzorka pomešano je sa 300 mL radnog rastvora ABTS^{•+}. Nakon 7 min mešanja, apsorbanca je izmerena na 734 nm. Za DPPH[•] test, 40 μL uzorka je pomešano sa 260 μL radnog rastvora DPPH[•], a nakon inkubacije u mraku, apsorbanca je izmerena na 515 nm posle 30 min. FRP vrednost je određena nakon mešanja uzorka (250 μL) sa 250 μL 0,2 M fosfatnog pufera, pH 6,6, i 250 μL 1 % rastvora kalijum fericijanida. Smeša je zatim inkubirana na 50 °C tokom 20 min. Nakon toga, dodato je 250 μL 10 % TCA, a smeša je centrifugirana na 17000 x g tokom 5 min. Nakon toga, 135 μL supernatanta je pomešano sa 135 μL milliQ vode i 30 μL 0,1 % feri hlorida. Nakon 10 min, apsorbanca je izmerena na 700 nm. Rezultati za ABTS^{•+}, DPPH[•], i FRP su izraženi kao mg ekvivalenta Troloksa na 100 mL smeše (mg Troloksa/100 mL). Za CHE korišćena je metoda sa ferozinom (Pešić et al., 2019). Rezultati za CHE su izraženi kao mg ekvivalenta EDTA na 100 mL smeše (mg EDTA/100 mL). Za sva merenja je korišćen Plate Reader (ELISA Plate Reader).

Primenom statističkog softvera MINITAB, analizirani su rezultati određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnih svojstava u 13 mešavina pripremljenih prema tabeli 3.2. Za svako ispitivano svojstvo optimizovane formulacije mikroinkapsulata dobijen je odgovarajući matematički model, koji je upotrebljen za multiparametarsku analizu (Akteke-Öztürk et al., 2025; Lučić et al., 2023). Primenom funkcije poželjnosti, definisan je optimalni sastav liofilisane formulacije mikroinkapsulata (TM/ME/GPE) koji je potom korišćen za dalje analize.

3.4 Fizičko-hemijska karakterizacija optimizovane formulacije mikroinkapsulata

3.4.1 Određivanje sadržaja glukana

Sadržaj glukana u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata procenjen je korišćenjem Megazyme β -Glucan Assay Kit (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irska) (Yeast and Mushroom), koji je pogodan za indirektno merenje 1,3:1,6- β -glukana u preparatima kvasca i gljiva (šifra proizvoda: K-YBGL). Postupak za određivanje sadržaja ukupnih glukana i α -glukana sporeveden je prema upustvima proizvođača. Dobijene vrednosti su izračunate korišćenjem softverskog alata Mega-Calculator (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irska), dostupnog na web stranici za obradu sirovih podataka.

3.4.2 ATR-FTIR analiza

Dobijena optimizovana formulacija mikroinkapsulata i kontrolni uzorak (TM) snimljeni su pomoću IRAffinity-1 spektrometra opremljenog sa ATR jedinicom (Shimadzu, Kyoto, Japan). Spektri su prikupljeni u opsegu od 4000-600 cm^{-1} , sa 100 skeniranja po spektru i rezoluciji od 4 cm^{-1} .

3.4.3 Raman spektroskopija

U cilju dodatne karakterizacije optimizovane formulacije mikroinkapsulata korišćena je Ramanova spektroskopija u sprezi sa hemometrijom. Korišćen je konfokalni Raman mikroskop alpha 300 R (Witec, Nemačka). Merenja su sprovedena korišćenjem lasera talasne dužine 785 nm, objektiva

uvećanja 50 puta (Zeiss, NA 0,8), sa snagom podešenom na 5 mW kako bi se sprečilo termičko oštećenje uzorka. Dužina ekspozicije podešena je na 2 s dok je broj akumulacija bio 200. Energija rasejanih fotona detektovana je CCD (charge-coupled-device) detektorom, a rezolucija spektara je $1,32 \text{ cm}^{-1}$. Kalibracija instrumenta je obavljena korišćenjem silicijuma koji pokazuje traku na $520,47 \text{ cm}^{-1}$. Snimljeni spektri su hemometrijski obrađeni sprovođenjem korekcije bazne linije (uklanjanje pozadinskog signala) primenom polinomske funkcije, nakon čega je primenjen Savitzky-Golay filter sa prozorom od 10 tačaka radi usrednjavanja i smanjenja šuma. Obrada spektara obavljena je u softveru WITec Project Plus (Witec, Nemačka). Poseban fokus je na delu spektra od $1000\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$, koji se odlikuje karakterističnim trakama koje se mogu pripisati proteinima.

3.4.4 DLS merenja zeta (ζ) potencijala i veličina čestica

Veličina čestica i ζ -potencijal optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog TM (termički tretirano kozje mleko dobijeno sprej-sušenjem) uzorka određeni su merenjem dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS), korišćenjem uređaja Horiba NanoPartica SZ-100 (Horiba Ltd., Kyoto, Japan). Pre analize, oba praha su rekonstituisana u milliQ vodi da bi se pripremili 0,1 % rastvori. Merenje je obavljeno na 25°C i izvršeno u polidisperznom režimu, u 5 ponavljanja, pod uglom rasejanja svetlosti od 90°C . Raspodele veličine čestica prikazane su kao raspodele ponderisane prema intenzitetu.

3.4.5 Elektroforetska analiza

SDS-PAGE u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE) korišćen je za karakterizaciju proteinskog profila optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog uzorka TM, kao što su prethodno detaljno opisali Pešić et al. (2012) i Milinčić et al. (2021b). SDS-R-PAGE je izveden na gelu za razdvajanje koncentracije 12,5 % w/v (pH 8,85) i gelu za koncentrisanje koncentracije 5 % w/v (pH 6,8), uz primenu Tris-glicinskog radnog pufera koji je sadržao 0,05 M Tris (pH 8,5), 0,19 M glicin i 0,1 % w/v SDS. Uzorci su pripremljeni rastvaranjem 4 mg liofilisane optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog TM uzorka u SDS-R-PAGE puferu koji sadrži 0,055 M Tris-HCL (pH = 6,8), 2 % (w/v) SDS, 7 % (v/v) glicerola, 0,0025 % (w/v) bromfenol plavog i 5 % β -merkaptetanola. Za sve elektroforetske analize, alikvoti uzoraka od $25 \mu\text{L}$ su stavljeni u bunariće. Nakon analize, odnosno razdvajanja, gelovi su obojeni rastvorom Coomassie blue boje tokom 1h, zatim su odbojeni, skenirani i analizirani pomoću SigmaGel softvera (*SigmaGel* softver, verzija 1.1., Jandal Scientific, San Rafael, CA, USA).

3.4.6 SEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija liofilisane optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog uzorka kozjeg mleka (TM) je snimljena skenirajućom elektronskom mikroskopijom (JEOL JSM-6390LV, Tokyo, Japan) pri naponu od 30 kV. Pre snimanja, prahovi su pričvršćeni za metalne stubiće i napareni zlatom pomoću komore za raspršivanje BALTEC SCD 005 (New York, USA) u trajanju od 100 s, pri jačini struje od 30 mA.

3.4.7 UHPLC-Q-ToF-MS analiza

Liofilisana optimizovana formulacija mikroinkapsulata pomešana je sa 80 % metanola koji sadrži 0,1 % HCL (1:10 w/v) i homogenizovan 1 sat na mehaničkoj mešalici. Nakon toga, smeša je centrifugirana pri $17000 \times g$ tokom 10 min. Dobijeni supernatanti su filtrirani kroz filtere od $0,22 \mu\text{m}$ i korišćeni za dalju hromatografsku analizu.

Analize su sprovedene na *Agilent 1290 Infinity* UHPLC-QToF-MS sistemu (Agilent Technologies, Inc., CA, SAD) koristeći iste UHPLC parametre (brzinu protoka, mobilne faze, zapreminu

injektovanja, elucioni gradijent), ESI i Q-ToF parametre kako je opisano u podpoglavlju 3.2.1.7. Za prepoznavanje potencijalnih jedinjenja primenjena je data-dependent akvizicija (akvizicija zavisna od podataka DDA), koristeći Auto MS/MS režim akvizicije (m/z 100-1700, pri brzini skeniranja od 1 spektar/ s^{-1}) pri konstantnoj kolizionoj energiji od 30 eV. Za skrining, ekstrakciju relevantnih podataka (retenciono vreme, monoizotopska masa i površina pika) kao i za naknadnu evaluaciju, analizu i prikaz MS podataka korišćen je *Agilent MassHunter* Softver, (MassHunter Qualitative Analysis, verzija 10.0; Agilent Technologies, Inc., CA, USA), u kombinaciji sa softverom MS-DIAL (verzija 4.60; <http://prime.psc.riken.jp/>). Bioaktivna jedinjenja su identifikovana na osnovu njihove m/z vrednosti, karakterističnih MS fragmenata, u skladu sa prethodno objavljenim podacima iz literature (Pešić et al., 2019; Šuković et al., 2020; Milinčić et al., 2021a; Angeloni et al., 2025; Delić et al., 2025). Kvantifikacija identifikovanih fenolnih jedinjenja izvedena je korišćenjem dostupnih standarda, a rezultati su izraženi u $\mu g/g$ liofilizovanog praha. Zbog nedostatka pojedinih specifičnih standarda, neke od identifikovanih fenolnih jedinjenja su semikvantifikovana korišćenjem strukturno sličnih dostupnih standarda i izražena u ekvivalentima odgovarajućih i usko specifičnih standarda. Tabela S1 prikazuje jednačine regresije i prateće parametre za standarde koji su korišćeni za kvantifikaciju ili semikvantifikaciju (okvirno) identifikovanih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu optimizovane formulacije mikroinkapsulata.

3.4.8 Rastvorljivost prahova

Rastvorljivost optimizovane formulacije mikroinkapsulata je određena prema Kalušević et al. (2017) sa malim modifikacijama. Prah (0,1 g) je suspendovan u 1 g destilovane vode na 30 °C. Suspenzija je potom mešana 30 min, a zatim centrifugirana pri 9500 o/min tokom 10 min. Supernatant je dekantiran u čašu i sušen na 105 °C do konstantne mase. Rastvorljivost praha je određena iz mase dobijene nakon sušenja i početne mase uzorka. Rastvorljivost je izražena kao g/100 g suvog uzorka.

3.4.9 Sadržaj vode

Sadržaj vode je određen standardnom gravimetrijskom metodom sušenjem u sušnici na 105 °C do konstantne mase (AOAC, 2005).

3.4.10 Aktivnost vode (a_w vrednost)

Aktivnost vode, definisana kao odnos između napona pare vode u materijalu i napona pare čiste vode na istoj temperaturi, određena je pomoću instrumenta *LabSwift*-aw Novasina (Švajcarska) na 25 °C prema upustvima proizvođača. Ukratko, kapsule su ravnomerno raspoređene i napunjene uzorkom do oznake u posudi za uzorak. Napunjena posuda za uzorak je držana u mernoj komori *LabSwift* merača. Merenje je završeno kada je vrednost a_w na displeju bila stabilna.

3.4.11 Kvašljivost prahova

Kvašljivost prahova je određena prema metodi koju su opisali Martinić et al. (2022).

3.4.12 Nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost prahova

Nasipna gustina (ρ_B) je izračunata kao odnos između mase inkapsulata i zapremine koju zauzimaju u čaši.

Tapkana gustina (ρ_T) je izračunata kao odnos između mase inkapsulata i njihove zapremine nakon 500 tapkanja (European Pharmacopeia, 2014).

Protočnost i kohezivnost prahova su određena prema proceduri koju su opisali Jinapong et al. (2008). Ova svojstva prahova se mogu odrediti preko indeksa kompresibilnosti i Hausnerovog koeficijenta. Indeks kompresibilnosti (CI) i Hausnerov koeficijent (HR) izračunati su korišćenjem sledećih jednačina:

$$CI (\%) = (\rho_T - \rho_B) / \rho_T \times 100 \quad (8)$$

$$HR = \rho_T / \rho_B \quad (9)$$

3.5 Tehno-funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

3.5.1 Emulgujuća i peniva svojstva

Emulgujuća svojstva su određena prema metodi koju su opisali Wen et al., (2020). Čisto suncokretovo ulje (3 mL) i 9 mL vodenog rastvora uzorka (0,1 g/100 g optimizovane formulacije mikroinkapsulata odnosno kontrolnog praha, pri pH 6,7) dodati su u čašu, nakon čega je zabeležena početna zapremina smeše – V_1 . Smeša uzorka je zatim homogenizovana pri 10.000 o/min, a zapremina emulzije je zabeležena kao V_2 . Nakon 10 min, zapremina emulzije je zabeležena kao V_3 , a nakon 30 min, kao V_4 . Indeks aktivnosti emulzije (EAI) i indeks stabilnosti emulzije (ESI) izračunati su na sledeći način:

$$EAI = V_2 / V_1 \quad (10)$$

$$ESI_{10min} = V_3 / V_1 \quad (11)$$

$$ESI_{30min} = V_4 / V_1 \quad (12)$$

Peniva svojstva su određena prema metodi koju su opisali Wen et al. (2020). Ukratko, rastvori od 15 mL (0,1 g/100 g vodenih rastvora optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrole, pri pH 6,7), zabeleženi kao V_1 , mešani su pri 10.000 o/min, a zapremina uzorka je zabeležena kao V_2 . Nakon 10 min, zapremina uzorka je zabeležena kao V_3 . Peniva svojstva su izračunata i izražena u procentima kao kapacitet pene (FC) i stabilnost pene (FS), prema sledećim formulama:

$$FC = (V_2 - V_1) / V_1 \times 100 \quad (13)$$

$$FS = (V_3 - V_1) \times 100 \quad (14)$$

3.5.2 Kapacitet zadržavanja vode/ulja

Kapacitet zadržavanja vode/ulja je određen prema Wani et al. (2013) sa malim modifikacijama. Ukratko, 1 g uzorka je pomešan sa 10 mL dejonizovane vode/ulja, a zatim mešan 1 min. Uzorak je potom ostavljen da odstoji 30 min na sobnoj temperaturi a zatim je centrifugiran pri 2000 x g tokom 30 min. Izmerena je količina dobijenog supernatanta. Kapacitet apsorpcije vode/ulja je izračunat kao razlika između početne zapremine vode/ulja i zapremine supernatanta izražena kao grami apsorbovane vode/ulja na 100 g suvog uzorka.

3.6 Funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

3.6.1 Antioksidativna svojstva i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Antioksidativna svojstva (FRP, ABTS⁺ test, DPPH[•] test, i CHE) i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) su određena prema metodama koje su opisane u 3.2.1.3 i 3.2.1.4 odeljku.

3.7 Antimikrobna svojstva

3.7.1 Mikroorganizmi

Testirane su sledeće Gram (+) bakterije: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (izolat iz hrane), i *Listeria monocytogenes* (NCTC 7974), *L. monocytogenes* (ATCC 13932), *L. monocytogenes* (ATCC 15313), *L. monocytogenes* (ATCC 19111) i *L. monocytogenes* (ATCC 35152), kao i sledeće Gram (-) bakterije: *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715), *Y. enterocolitica* (ATCC 9610), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* (ATCC 11775), *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728), *Enterobacter cloacae* (ATCC 45040) i *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 13311. Za ispitivanje antifungalnog delovanja, korišćene su sledeće makromicete: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus versicolor* (ATCC 117340), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane) i *Trichoderma viride* (IAM 5061). Za ispitivanje efekta uzoraka na kvasnice korišćeni su sledeći sojevi: *Candida albicans* 475/15, *C. albicans* 14/15, *C. albicans* 17/15, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis*, ATCC 750 i *C. krusei* H1/18. Svi mikroorganizmi su deponovani u Mikrobiološkoj laboratoriji Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, Srbija.

3.7.2 Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska ispitivanja izvedena su modifikovanom mikrodilucionom metodom (CLSI, 2009). Bakterijski sojevi su kultivisani preko noći na 37 °C u *Tryptic Soy Broth* (TSB) podlozi, a zatim su sterilnim fiziološkim rastvorom podešeni do koncentracije od $1,0 \times 10^5$ CFU/mL. Uzorci rastvoreni u 30 % etanolu dodati su u TSB medijum (100 µL) sa bakterijskim inokulumom ($1,0 \times 10^4$ CFU po bunaru). Nakon inkubacije (24 h na 37 °C) u svaki bunar je dodat *p*-jononitrotetrazolijum hlorid (40 µL, $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$), nakon čega su uzorci inkubirani dodatnih 60 min, na 37 °C radi razvoja boje. Najniže koncentracije koje su pokazale izrazito smanjenje intenziteta boje pod binokularnom lupom - svetlo crvenu boju u odnosu na intenzivno crvenu boju u kontrolnom bunaru (bez dodatih jedinjenja) ili odsustvo boje - definisane su kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Minimalne baktericidne koncentracije (MBK) su određene serijskom subkultivacijom 2 µL u bunariće koji su već sadržali 100 µL bujona, sa dodatnom inkubacijom od 24 h na 37 °C. Najniža koncentracija bez vidljivog rasta je definisana kao MBC, što ukazuje na 99,5 % uništavanja originalnog inokuluma. Konzervansi E211 (natrijum benzoat) i E224 (kalijum metabisulfit) su korišćeni konzervansi kao pozitivne kontrole kod bakterijskih sojeva, a ketokonazol kod sojeva roda *Candida*.

3.7.3 Antifungalna aktivnost

Za potrebne ispitivanja antifungalne aktivnosti mikrodilucionom metodom, spore makromiceta su spirane sa površine agar ploča sa sterilnim 0,85 % fiziološkim rastvorom koji sadrži 0,1 % Tween 80 (v/v). Spore su izbrojane Neubauer hemocitometrom, a koncentracija je podešena sterilnim fiziološkim rastvorom na $1,0 \times 10^5$ ćelija/mL. Uzorci rastvoreni u 30 % etanolu su dodati u bujon, nakon čega je dodat inokulum testiranih mikromiceta. Ploče su inkubirane na 25 °C tokom 5 dana. Najniže koncentracije sa vidno smanjenim rastom micelije pod binokularnom lupom definisane su kao MIK, dok su MFK određene serijskom reinokulacijom 10 µL inokulisane podloge iz bunarčića

gde nije zabeležen rast mikromiceta u 100 µL sterilne hranljive malt agar podloge i ponovnom inkubacijom u trajanju od 72 h na 25 °C. Inokulisani medijum bez dodatog ekstrakta je korišćen kao negativna kontrola. Ekesperiment je izveden u tri ponavljanja.

3.8 Biodostupnost fenolnih jedinjenja u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata

3.8.1 Simulirana *in vitro* gastrointestinalna digestija i biodostupnost fenolnih jedinjenja

Optimizovana formulacija mikroinkapsulata podvrgnuta je statičkoj *in vitro* gastrointestinalnoj digestiji (GID) prema prethodno objavljenom protokolu od strane Batinić et al. (2024), sa ciljem procene biodostupnosti fenolnih jedinjenja. Ukratko, liofilizovani prah (1 g) najpre je podvrgnut oralnoj fazi digestije mešanjem sa 15 mL milliQ vode, 10 mL 0,85 % rastvora NaCl i rastvorom pljuvačne amilaze (50 U), pri čemu je pH podešen na 6,9. U ovoj fazi, smeša je mućkana na orbitalnom šejkeru (120 o/min) i inkubirana na 37 °C tokom 5 min. Nakon toga, celokupna količina oralnog bolusa je pomešana sa 4,5 mL 150 mM HCl i 1 mL pepsina (2 mg/mL). U gastričnoj fazi, pH smeše je podešen na 2,5, nakon čega je kontinuirano mućkana na 37 °C tokom 2 sata. Po isteku ovog vremena, gastrični himus je pomešan sa 4 mL rastvora žučnih kiselina (deoksiholna i holna kiselina), 4 mL rastvora pankreatina (18,75 mg/mL) i 1 mL mucina, a pH je odmah podešen na 7,0 u uzorku. U intestinalnoj fazi, smeša je inkubirana na 37 °C tokom 3 sata. Na kraju digestije, smeši je dodata milliQ voda da bi se postigla konačna zapremina od 45 mL. Nakon toga, digestirane smeše su centrifugirane (4000 o/min., 10 min), a pre hromatografske analize dobijeni supernatanti su filtrirani kroz filtere od 0,45 µm i propušteni kroz SPE ketridže (CLEAN-UPR, C18 ekstrakcione kolone, unendcappedPKG50, UCT, Bristol, UK), radi uklanjanja nečistoća i koncentrovanja fenolnih jedinjenja. SPE ketridž je prethodno kondicioniran ispiranjem sa 5 mL zakišljenog metanola i milliQ vode, dok su apsorbovana bioaktivna jedinjenja eluirana sa 1 mL zakišljenog metanola koji je sadržao 0,1 % HCl. Liofilisana optimizovana formulacija mikroinkapsulata (1 g), ekstrahovana sa 45 mL 80 % metanola koji je sadržao 0,1 % HCl, korišćena je kao kontrola, bez prethodno sprovedene *in vitro* gastrointestinalne digestije.

3.8.2 UHPLC QToF-MS analiza digestovanih uzoraka

Razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija/polukvantifikacija fenolnih jedinjenja pre i posle digestije izvršeni su korišćenjem UHPLC Q-ToF-MS analize kao što je prethodno opisano u odeljku 3.4.6. Biodostupnost pojedinačnih i ukupno identifikovanih fenolnih jedinjenja (BI %) izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$\text{Biodostupnost (BI), \%} = \frac{\sum \text{PC}_d}{\sum \text{PC}_c} \times 100 \quad (15)$$

gde je PC_d sadržaj (µg/g liofilisanog praha) svakog identifikovanog fenolnog jedinjenja u digestovanim uzorcima, a PC_c sadržaj (µg/g liofilisanog praha) svakog identifikovanog fenolnog jedinjenja u kontrolnim uzorcima.

3.8.3 Antioksidativna svojstva nakon *in vitro* GID

Antioksidativna svojstva (FRP, ABTS⁺ test, TFC, i CHE) i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) optimizovane formulacije mikroinkapsulata su određena prema metodama koje su opisane u 3.2.1.3. i 3.2.1.4 odeljku.

3.8.4 Antimikrobna aktivnost nakon *in vitro* GID

Antimikrobna aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata je određena prema metodi koja je opisana u odeljku 3.7.

3.8.5 Elektroforetska analiza nakon *in vitro* GID

Za analizu proteinskih profila optimizovane formulacije mikroinkapsulata korišćena je elektroforetska tehnika SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza u redukujućim (SDS-R-PAGE) uslovima prema metodi opisanoj u odeljku 3.4.5. Kontrola TM/ME/GPE uzorak (kontrola digestije) je pripremana rastvaranjem 4 mg praškastog uzorka u 1 mL pufera za uzorke. Digestovani uzorak je mešan sa puferom za uzorke u odnosu 1:1 v/v.

3.9 Model dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Radi ispitivanja svojstava optimizovane formulacije mikroinkapsulata u prehrambenom proizvodu, prah je integrisan u model dehidrisane supe (Pravilnik o kvalitetu supa, sosova, dodataka jelima i srodnih proizvoda, Službeni list SRJ, 41/93 i Službeni list SCG, 56/2003 i 4/2004). Sastojci za supu su bili sledeći: beli luk u prahu (Spice Chef, Maxi, Srbija); crni luk u prahu (Premia, Maxi, Srbija); crni biber (Začin C, Nestlé, Srbija); morska so (Kristal So doo, Srbija); skrob (Dr. Oetker, Srbija), bez dodatka biljnog ulja (Sugumar & Guha, 2020).

Sastav dehidrisane supe (S) bio je sledeći: 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % optimizovane formulacije mikroinkapsulata.

Kontrolna supa (C) je bila sastavljena od sledećih sastojaka: 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka.

Komercijalna supa (CS) je bila Quik e-free instant supa od povrća bez masti, Aleva, Srbija. Sastav komercijalne instant supe, prema deklaraciji, je bio sledeći: maltodekstrin; kuhinjska so 18 %; sušeno povrće do 14 % (šargarepa, crni luk, paškanat, paradajz, praziluk, celer); modifikovani kukuruzni skrob; dekstroza, pojačivači ukusa: mononatrijum glutamat 5,5 %; dinatrijum 5'-ribonukleotidi; hidrolizovani sojini proteini; ekstrakt kvasca; začini; soja sos; ekstrakt povrća; šećer; ulje uljane repice i arome. Energetska vrednost: 90 kJ (21,5 kcal) na 10 g proizvoda; prosečna nutritivna vrednost: proteini 0,65 g/10 g; ugljeni hidrati 5,4 g/10 g; masti 0,022 g/10 g.

Čvrsti sastojci su pomešani u datim proporcijama za supe S i C, dok je komercijalna supa pripremljena prema uputstvu. Uzorci S i C su rastvoreni u vodi u odnosu 1:20 w/v, a zatim su podvrgnuti kuvanju na 95 °C tokom 5 min, prema Sugumar & Guha, (2020).

3.9.1 Fizičko-hemijska karakterizacija funkcionalne dehidrisane supe

U okviru fizičko-hemijske karakterizacije funkcionalne dehidrisane supe, određeni su sledeći parametri: sadržaj vlage; rastvorljivost u vodi; kvašljivost prahova; nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost prema već opisanim metodama u odeljcima 3.4.7; 3.4.8.; 3.4.10.; 3.4.11.

3.9.2 Senzorna analiza funkcionalne dehidrisane supe

Senzornu analizu supe sproveo je 10 obučanih ocenjivača, koristeći test „ukupna ocena kvaliteta”, dok je test „ocena prihvatljivosti od strane potrošača” procenjivalo 28 potencijalnih potrošača (17 žena i 11 muškaraca). Senzorna analiza je sprovedena u skladu sa Kodeksom profesionalne etike Univerziteta u Beogradu (SUBg, 2016). Upitnici, pripremljeni za senzornu analizu, u skladu su sa opštom uredbom o zaštiti podataka Evropske unije. Na početku senzornog ispitivanja, svi učesnici su dali pismenu saglasnost za učešće i bili su svesni da mogu da se povuku iz studije u bilo kom trenutku, da su njihovi odgovori poverljivi, da će se odgovori koristiti u naučne svrhe, kao i da podaci učesnika i njihovi odgovori neće biti objavljeni bez njihovog znanja. Pre senzornog ocenjivanja, učesnici su bili u potpunosti informisani o zahtevima studije. Testirani uzorci su bili bezbedni za konzumaciju. Uzorci supe su pripremljeni za senzornu analizu kao što je prethodno opisano u poglavlju 3.9. i servirani u staklene čaše. Supe su pripremljene neposredno pre senzorne analize. Uzorci su zagrejani na temperaturi od $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Svaki uzorak je označen jednocifrenim brojem. Degustacija je vršena plastičnim kašičicama.

3.9.2.1 Ukupna ocena kvaliteta

Senzorna analiza, putem ukupne ocene kvaliteta sprovedena je sistemom bodovanja na skali od 0 do 5, gde je: odličan kvalitet (ocena kvaliteta $> 4,5$); veoma dobar kvalitet ($3,5 < \text{ocena} \leq 4,5$); dobar kvalitet ($2,5 < \text{ocena} \leq 3,5$); loš/nezadovoljavajući kvalitet ($1,5 < \text{ocena} \leq 2,5$); veoma loš kvalitet ($\text{ocena} \leq 1,5$) (Stanojević et al., 2020). Panelisti su dobili tabelu za bodovanje sa rasponom skale i zamoljeni su da ocene parametre: ukus, boju, miris, teksturu i ukupnu prihvatljivost. Takođe su trebali i posebno da ocene parametre ukusa: slano, slatko, gorko, kiselo i prisustvo umami osećaja.

3.9.2.2 Ocena prihvatljivosti od strane potrošača

Senzorna analiza je sprovedena ocenom prihvatljivosti od strane potrošača na preferencijalnoj skali od 1 do 9, gde je: 1 = izuzetno ne volim; 2 = veoma ne volim; 3 = umereno ne volim; 4 = malo ne volim; 5 = niti volim/niti ne volim; 6 = malo volim; 7 = umereno volim; 8 = veoma volim i 9 = izuzetno volim (Pešić et al., 2023). Panelisti su dobili tabelu za ocene sa rasponom skale i zamoljeni su da ocene parametre: ukus, boju, miris, teksturu, osećaj u ustima i ukupnu prihvatljivost.

3.10 Statistička analiza

Da bi se dobila odgovarajuća interpretacija, sve analize vezane za karakterizaciju polaznih sirovina, semenki grožđa i gljive (UV-VIS spektrofotometrija, denzitometrija i tehno-funkcionalna svojstva); optimizovane formulacije mikroinkapsulata (fizičko-hemijska karakterizacija, tehno-funkcionalna svojstva, funkcionalna svojstva i biološka svojstva), kao i fizičko-hemijska karakterizacija funkcionalne supe, izvedene su u tri ponavljanja, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Za studije optimizacije, primenjena je analiza varijanse (ANOVA) povezana sa metodologijom odgovora površina kako bi se procenila značajnost ispitivanih faktora i adekvatnost razvijenih modela. Značajnost razlika između srednjih vrednosti testirane su korišćenjem Studentovog *t*-testa pri $p < 0,05$ (StatSoft Co., Tulsa, OK, USA) za tehno-funkcionalna svojstva proteinskih frakcija kozjeg mleka, tehno-funkcionalna i funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata. Pre primene parametarskih testova, procenjene su normalnost i homogenost varijanse. Ovaj pristup je primenjen na indeks stabilnosti emulzije (ESI) i fizičko-hemijska svojstva kontrolne i funkcionalne supe. Podaci senzorne evaluacije analizirani su korišćenjem neparametarskog Kruskal-Wallis-ovog testa ($p < 0,05$), a zatim Dunn-ovim *post hoc* testom kako bi se utvrdile razlike između uzoraka supe za svaki senzorni atribut. Podaci predstavljeni u radar dijagramima, izraženi kao srednje vrednosti. Svi grafikoni su generisani korišćenjem softvera GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA).

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja vodenog ekstrakta gljive

4.1.1 Ukupan sadržaj proteina u liofilisanom vodenom ekstraktu *A. aegerita*

Gljive predstavljaju značajan izvor proteina, pri čemu njihova plodonosna tela često sadrže sve esencijalne aminokiseline (Kumar et al., 2021; Das et al., 2021; Gariboldi et al., 2023; Singh et al., 2025).

Prema dobijenim rezultatima, ukupan sadržaj proteina u vodenom ekstraktu *A. aegerita* (ME) iznosio je $1,84 \pm 0,02$ g BSA/100 g suve materije. U radu Petrović et al. (2015) utvrđen je sadržaj proteina iste gljive od 6,68 g/100 g. Razlike u sadržaju proteina između rezultata ovog istraživanja i literaturnih podataka mogu biti posledica različitosti ispitivanog materijala, uključujući vrstu i soj gljive, deo plodonosnog tela, uslove i supstrat njenog uzgajanja, kao i fazu razvoja i vreme berbe, primenjeni postupak ekstrakcije i dr (Kalač, 2013). Niži ukupan sadržaj proteina u vodenim ekstraktima gljive mogao bi se pripisati uticaju polisaharida prisutnih u uzorcima. Pokazano je da se polisaharidi vezuju za Coomassie Blue G boju koja se koristi u Bradford-ovom testu, pri čemu ne doprinose apsorbanciji, što dovodi do smanjenja ukupnog sadržaja proteina (Petrović et al., 2024). Pored toga, fenolne kiseline (najčešća fenolna jedinjenja u ekstraktima gljiva; Tabela 4.3) interaguju sa proteinima, menjajući njihovu strukturu i narušavajući njihova svojstva (Masoumi et al., 2024; Petrović et al., 2024).

4.1.2 Ukupan sadržaj α - i β -glukana u liofilisanom vodenom ekstraktu *A. aegerita*

Polisaharidi poreklom iz gljiva privukli su značajnu pažnju zbog svojih različitih bioloških aktivnosti, naročito imunomodulatornog i antiinflamatornog delovanja, što ukazuje na njihov potencijal za primenu naročito nakon hemioterapije, infekcija i dr. Dobijeni rezultati su pokazali visok udeo polisaharida u vodenom ekstraktu gljive. Glukani, naročito β -tip, takođe su pokazali zaštitne efekte kod kardiovaskularnih bolesti, kao i kod dijabetesa ili u održavanju lipidne homeostaze (Cerletti et al., 2021). Kod *A. bisporus* (beli šampinjon), sadržaj ukupnih glukana iznosio je 10,05 g/100 g suve mase u plodonosnom telu i 14,96 g/100 g suve mase u dršci. Kod *Cantharellus cibarius* (lisičarka) sadržaj ukupnih glukana u plodonosnom telu iznosio je 25,31 g/100 g suve mase, dok je u dršci iznosio 28,47 g/100 g suve mase. U uzorku *Pleurotus* spp. (bukovača) ove vrednosti su redom iznosile 18,26 i 25,64 g/100 g suve mase plodonosnog tela (Sari et al., 2017). Utvrđen sadržaj ukupnih glukana ukazuje na značajan udeo ovih polisaharida u suvoj materiji *A. aegerita*, što doprinosi njenoj nutritivnoj i funkcionalnoj vrednosti.

β -glukani predstavljaju $11,10 \pm 2,79$ % mase vodenog ekstrakta *A. aegerita* (što je oko 44 % od njenih ukupnih glukana), dok α -glukani čine $14,36 \pm 0,57$ % mase vodenog ekstrakta *A. aegerita*, što predstavlja više od polovine (~ 56 %) ukupnih glukana u ekstraktu. Za razliku od ovih vrednosti, u ispitivanim jestivim gljivama koje su prethodno opisali Sari et al. (2017), sve gljive su pokazale veći sadržaj β -glukana u odnosu na sadržaj α -glukana.

U istom tipu uzorka i primenom iste analitičke metode, Petrović et al. (2024) su za vodene ekstrakte *A. bisporus* i *L. sulphureus* utvrdili $4,77 \pm 0,09$ % i $4,65 \pm 0,05$ % β -glukana, dok je sadržaj ukupnih glukana redom iznosio $7,32 \pm 0,07$ % i $6,92 \pm 1,45$ %. Poredeći vodene i polisaharidne ekstrakte tri ispitivane vrste, oba ekstrakta *A. aegerita* su imala najviši sadržaj ukupnih glukana i β -glukana, dok je najveći sadržaj α -glukana utvrđen u polisaharidnom ekstraktu *A. bisporus* ($12,64 \pm 1,82$ %), u poređenju sa *A. aegerita* ($9,34 \pm 0,86$ %) i *L. sulphureus* ($0,74 \pm 0,03$ %) (Petrović et al., 2024).

Tabela 4.1. Sadržaj ukupnih, α - i β -glukana u liofilisanim vodenim ekstraktima *A. aegerita* izražen kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija

Uzorak	Ukupan sadržaj glukana (%)	α - glukani (%)	β - glukani (%)
Vodeni ekstrakt <i>A. aegerita</i>	25,47 $\pm$ 2,22	14,36 $\pm$ 0,57	11,10 $\pm$ 2,79

4.1.3 Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u liofilisanom vodenom ekstraktu *A. aegerita*

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC) u vodenom ekstraktu *A. aegerita* je iznosio 23,72 $\pm$ 0,02 g GAE/100 g suve materije. Prisustvo fenolnih jedinjenja u vodenom ekstraktu je važno sa aspekta biološke aktivnosti, jer su jedinjenja ove grupe pokazala antioksidativno, antimikrobno, kardioprotektivno dejstvo, kao i brojne druge efekte na zdravlje (Petrović et al., 2014; Petrović et al., 2015; Landi et al., 2017; Das et al., 2021).

4.1.4 Procena antioksidativnih svojstava

Rezultati antioksidativne aktivnosti prikazane kroz različite testove (ABTS⁺⁺ test, FRP, CHE i DPPH[•] test) su dati u Tabeli 4.2 i pokazuju visok antioksidativni potencijal *A. aegerita*. Dobijeni rezultati ukazuju da vodeni ekstrakt gljive ima odlična antioksidativna svojstva.

Tabela 4.2. Antioksidativna aktivnost vodenog ekstrakta *A. aegerita*

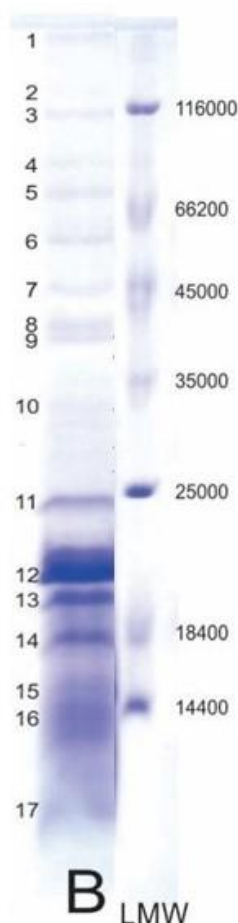
Uzorak	ABTS ⁺⁺ (g Trolox/100 g)	FRP (μ g AA/mL)	CHE (μ g EDTA/mL)	DPPH [•] (mg Trolox/g)
Vodeni ekstrakt <i>A. aegerita</i>	21,97 $\pm$ 0,47	43,56 $\pm$ 1,21	48,25 $\pm$ 1,83	35,78 $\pm$ 0,55

Antioksidativni potencijal *A. aegerita* je poznat od ranije. Visoka ABTS⁺⁺ aktivnost utvrđena za ekstrakt *A. aegerita* (21,97 $\pm$ 0,47 g Trolox/100 g) može se povezati sa prisustvom fenolnih jedinjenja i drugih jedinjenja sa antioksidativnim potencijalom u gljivi, što je u skladu sa nalazima Lo & Cheung (2005). Vrednost DPPH[•] aktivnost ispitnog vodenog ekstrakta *A. aegerita* iznosi 35,78 $\pm$ 0,55 mg Trolox/g, dok redukujuća moć vodenog ekstrakta iznosila je 43,56 $\pm$ 1,21 μ g AA/mL. U neprečišćenom metanolnom ekstraktu i njegovim frakcijama dobijenim iz plodonosnog tela *A. aegerita* var. *alba* utvrđena je značajna pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i ABTS⁺⁺/DPPH[•] aktivnosti, što ukazuje da fenolna jedinjenja mogu značajno doprineti neutralizaciji slobodnih radikala (Lo & Cheung, 2005). Pored toga, Du et al. (2022) su pokazali da i neprečišćeni polisaharidni ekstrakt *A. aegerita* ispoljava koncentraciono zavisnu DPPH[•] i ABTS⁺⁺ aktivnost. Pri koncentraciji polisaharida od 0,16 mg/mL inhibicija DPPH[•] radikala iznosila je 26,03%. Ovaj nalaz ukazuje da i polisaharidna frakcija može doprineti ukupnom antioksidativnom potencijalu ispitivane gljive. U ispitivanju etanolnih ekstrakata pet vrsta roda *Pleurotus*, svi ekstrakti su pokazali antioksidativnu aktivnost, pri čemu su se aktivnosti ABTS⁺⁺, DPPH[•], i FRAP kretale od 0,56 do 1,03 (za ABTS⁺⁺), 0,40 do 1,08 (za DPPH[•]) i 0,43 do 1,18 mg (za FRAP) Trolox/g suve mase uzorka (Kumla et al., 2025). U obezmašćenom kozjem mleku obogaćenom ekstraktom *A. aegerita* Milinčić et al. (2025b) su za optimizovani ME/M sastojak eksperimentalno dobili 77,79 mg Trolox/100 mL za ABTS⁺⁺, 16,15 mg Trolox/100 mL za DPPH[•], 45,34 mg Trolox/100 mL za FRP i 211,80 mg

EDTA/100 mL za CHE. Ovi rezultati pokazuju da ekstrakt zadržava antioksidativna i helirajuća svojstva i nakon dodavanja u mleko (Milinčić et al., 2025b). Kupradit et al. (2023) su, na primer, za alkalne ekstrakte *P. ostreatus* i *V. volvacea* dobili $66,13 \pm 1,63$ i $63,76 \pm 0,51$ mg EDTA ekvivalenata/g ekstrakta, dok su Venkata Krishna et al. (2023) za metanolni ekstrakt *P. florida* i acetonski ekstrakt *P. flabellatus* zabeležili 7,74 i 6,72 mg EDTA ekvivalenta/g ekstrakta. Sveukupno, dobijeni rezultati, zajedno sa podacima iz literature, ukazuju na izražen antioksidativni potencijal *A. aegerita*. Potvrđena antioksidativna aktivnost u različitim testovima ukazuje na prisustvo jedinjenja koja mogu doprineti neutralizaciji slobodnih radikala, redukciji oksidovanih oblika gvožđa i vezivanju metalnih jona, pri čemu se intenzitet aktivnosti razlikuje u zavisnosti od primenjenog testa i ispitivanog ekstrakta.

4.1.5 Proteinski profil vodenog ekstrakta *A. aegerita*

Kako bi se dobio uvid u polipeptidni sastav vodenog ekstrakta gljive, izvedena je SDS-R-PAGE analiza u redukujućim uslovima. Kao što se može videti na elektroforegramu (Slika 4.1) analizirani vodeni ekstrakti *A. aegerita* su imali karakterističan polipeptidni profil, sa specifičnim trakama kao jedinstvenim markerima za njihovu autentifikaciju.

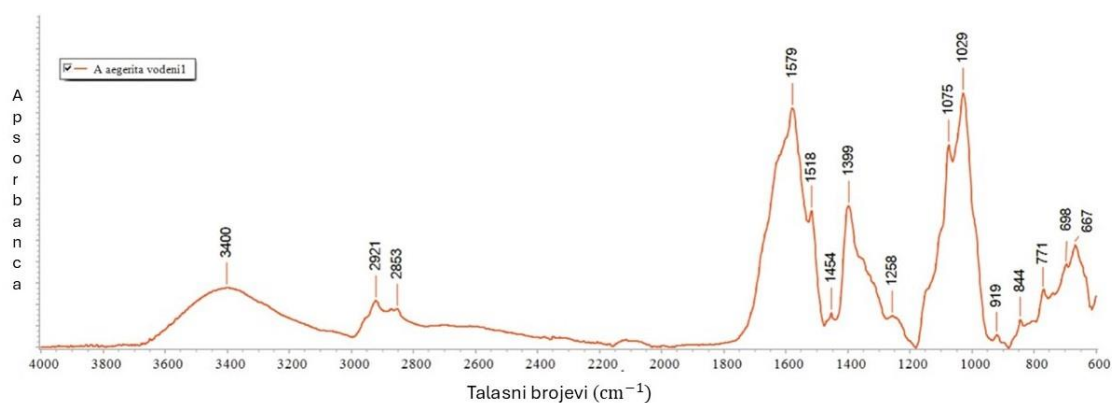


Slika 4.1. SDS-PAGE elektroforetski profil vodenog ekstrakta gljive *A. aegerita*. Oznake: B – vodeni ekstrakt gljive *A. aegerita*; LMW – standard molekulske mase. Mali brojevi na elektroforetskom profilu označavaju trake specifičnih polipeptida detektovanih u analiziranom uzorku. LMW i polipeptidni sastav detektovanih traka određeni su pomoću GelAnalyser 19.1 i prikazani su u Tabeli S1.

U SDS-PAGE uzorcima vodenog ekstrakta *A. aegerita* ukupno je detektovano 17 polipeptidnih traka (leva margina Slike 4.1. za pozicije ovih polipeptida). Ove trake su dalje analizirane denzitometrijom (Tabela S2). Većina traka se mogla jasno uočiti kod ekstrakta, uz nekoliko difuznih traka ispod 25 kDa. Radi lakše interpretacije dobijenih rezultata, relativni sastav detektovanih polipeptida izražen je kroz četiri polipeptidna opsega: <66,2 kDa, 66,2-35 kDa, 35-14,4 kDa i <14 kDa. Glavne polipeptidne frakcije potvrđene su u MW opsegu od 35-14,4 kDa i <14 kDa, čineći više od 80 % rastvorljivih polipeptida (Tabela S2). ME je sadržao pet glavnih traka sa molekulskim masama 19,7; 18,9; 17,9; 16,9; i ~14,4 kDa. Slične rezultate za porodicu *Agaricaceae* registrovali su Bauer Petrovska et al. (2004), identifikujući od 13-16 proteinskih traka u SDS-PAGE uzorcima, pri čemu su dominirale trake od 30 kDa ili manje. Prisustvo proteina u ekstraktima gljiva može biti prilično važna s obzirom na njihovu sposobnost da doprinesu biokativnim svojstvima, što su pokazali Tehrani et al. (2012).

4.1.6 ATR-FTIR spektroskopija vodenog ekstrakta *A. aegerita*

Rezultati ATR-FTIR analize su prikazani na Slici 4.2. Analizirani spektar pokazuje široku traku u opsegu od ~3600-3000 cm^{-1} (iz O-H i N-H grupa) i trake slabog intenziteta u opsegu od ~3000 do 2700 cm^{-1} (C-H); oko 1650 cm^{-1} (COO); 1030-1020 cm^{-1} (C-O); 1080-1070 cm^{-1} (C-H); i oko 1150 cm^{-1} (C-O-C). Identifikovane trake ukazuju na prisustvo polisaharida i proteina u vodenim ekstraktima gljive.



Slika 4.2. ATR-FTIR spektri vodenog ekstrakta gljive *A. aegerita*

Široka i intenzivna traka pri ~3400 cm^{-1} ukazuje na vodonično vezane hidroksilne i amino grupe, karakteristične za polisaharide (glukane) i proteine. Pojava traka oko 2921 cm^{-1} i 2853 cm^{-1} ukazuje na asimetrične i simetrične C-H istežuće vibracije, koji su često zastupljeni kod polisaharida i lipidnih komponenti. U amidnom regionu I (istežuće vibracije C=O) traka na 1650 cm^{-1} nije jasno diferencirana, ali su primećene trake na 1579 cm^{-1} i 1518 cm^{-1} . Ove trake se mogu pripisati N-H i C-N istežućim vibracijama (amidni region II) u proteinskim strukturama. Talasni brojevi od oko ~1643 cm^{-1} -1650 cm^{-1} objašnjavaju istežuće C=O vibracije peptidnih amida i predstavljaju tipične trake u analizama proteinskih matriksa (Bikmurzin et al., 2022; Milinčić et al., 2025b;). Traka zabeležena na 1258 cm^{-1} se može pripisati proteinskim vibracijama (amid III region), vibracijama fosfatnih grupa ili vibracijama polisaharidnih komponenti. Ovo područje (1250-800 cm^{-1}) u literaturi obično označava razne C-O vibracije iz polisaharida (Bikmurzin et al., 2022). Intenzivne trake na 1075 cm^{-1} i 1029 cm^{-1} tipični su za vibracije C-O i C-O-C grupa polisaharida (Popović Minić et al., 2023). Region IV (ugljeno-hidratni region, ispod regiona otiska prsta) obuhvata trake na 919, 844, 771, 698, 667 cm^{-1} . Trake slabog intenziteta ispod 950 cm^{-1} mogu se pripisati glukanim u analiziranom ekstraktu (Gonzaga et al., 2013; Kostić et al., 2017).

4.1.7 UHPLC-QToF-MS karakterizacija bioaktivnih jedinjenja u vodenom ekstraktu *A. aegerita*

Bioaktivna jedinjenja identifikovana u vodenom ekstraktu *A. aegerita* su prikazana u Tabeli 4.3. Biomolekuli su identifikovani na osnovu tačne mase (m/z), MS/MS fragmentacije, dostupnih standarda i podataka iz literature. Sva identifikovana jedinjenja mogu se klasifikovati u dve različite grupe: (I) organske kiseline i njeni derivati (11 jedinjenja); i (II) fenolne kiseline i njeni derivati (7 jedinjenja). Prisustvo jabučne, limunske i fumarne kiseline u ekstraktima *A. aegerita* prethodno je takođe objavljeno u drugim studijama (Petrović et al., 2014; Petrović et al., 2015). Sa druge strane, oksalna kiselina, koja je u navedenim istraživanjima takođe identifikovana u koncentraciji od 0,09 g/100 g suve mase, u ovom istraživanju nije detektovana primenom UHPLC-QToF-MS analize. Jedinjenje identifikovano kao 13-hidroksi-9,11-oktadekadienska pronađeno u analiziranom uzorku su takođe prethodno identifikovali u studiji Ye et al. (2023) u gljivi *Auricularia cornea*. Ostali detektovani derivati organskih kiselina u vodenom ekstraktu *A. aegerita* su identifikovani kao čilibarna kiselina, pimelinska kiselina, azelainska kiselina, dietil-3-hidroksiglutarat, sebačna kiselina, pinelinska kiselina i 9-hidroksi-13-okso-10-oktadecenska kiselina. Osim organskih kiselina i njihovih derivata, u vodenom ekstraktu *A. aegerita* su takođe nadjene fenolna jedinjenja, koja prvenstveno pripadaju fenolnim kiselinama i njihovim derivatima. Od fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu *A. aegerita* identifikovane su hidroksibenzoeva kiselina, izomeri kumarnske kiseline, dihidrokumarinska kiselina, sinapinska kiselina, kao i metoksi derivati benzoeve kiseline (*p*-Anisinska kiselina i veratrilna kiselina). Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima, u kojima je prisustvo sličnih derivata fenolnih kiselina takođe utvrđeno u različitim vrstama gljiva (Petrović et al., 2014; Nowacka et al., 2014; Quintero-Cabello et al., 2021; Kumla et al., 2025; Silva et al., 2025). Studija Lin et al. (2017) su takođe analizirali fenolna jedinjenja u vodenom ekstraktu *A. aegerita*, a među identifikovanim jedinjenjima su bila: galna, protokatehinska, hlorogenska i ferulinska kiselina. Dok su u metanolnom ekstraktu *A. aegerita* identifikovane dve fenolne kiseline: *p*-hidroksibenzoeva i *p*-kumarinska kiselina, kao i cimetna kiselina (Petrović et al., 2014).

Zabeleženi profili prisutnih jedinjenja mogu doprineti daljem razumevanju antioksidativnih i bioloških svojstava analiziranog ekstrakta gljive, budući da fenolne kiseline i njeni derivati, kao i organske kiseline, mogu doprineti ukupnoj biološkoj aktivnosti gljive. Dobijeni rezultati o prisustvu fenolnih kiselina važni su, ako se uzme u obzir da je testirana gljiva jestiva, i da njena bioaktivna jedinjenja najčešće doprinose zdravlju i njihovoj daljoj primeni (Kiokias & Oreopoulou, 2021).

Tabela 4.3. Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja u vodenom ekstraktu *A. aegerita* korišćenjem UHPLC-QToF-MS. U Tabeli su prikazana sva uslovno identifikovana jedinjenja, kao i njihovo retenciono vreme (RT), molekulska formula, izračunata masa, *m/z* tačna masa, odstupanje od tačne mase (mDa) i MS/MS fragmenti.

RT, min.	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Izračunata masa	<i>m/z</i> tačna masa	mDa	MS fragmenti (% , glavni fragment)
<i>Organske kiseline i derivati</i>						
0,73	Fumarna kiselina	C ₄ H ₃ O ₄ [−]	115,00368	115,00491	-1,23	/
0,73	Jabučna kiselina	C ₄ H ₅ O ₅ [−]	133,01425	133,01571	-1,46	115,0050 (100)
0,83	Limunska kiselina	C ₆ H ₇ O ₇ [−]	191,01973	191,02299	-3,26	111,0093 (100); 112,01131
0,94	Ćilibarna kiselina	C ₄ H ₅ O ₄ [−]	117,01933	117,02020	-0,87	/
6,27	Pimelinska kiselina (6-Karboksiheksanoat)	C ₇ H ₁₁ O ₄ [−]	159,06628	159,06686	-0,58	115,07504 (100); 116,08119; 118,04377
8,49	Azelainska kiselina	C ₉ H ₁₅ O ₄ [−]	187,09758	187,09846	-0,88	123,0813 (100); 125,0971
8,56	Dietil-3-hidroksiglutarat	C ₉ H ₁₅ O ₅ [−]	203,09250	203,09342	-0,92	113,0977 (100); 129,0912; 141,0931; 147,0154
9,31	Sebacinska kiselina	C ₁₀ H ₁₇ O ₄ [−]	201,11323	201,11399	-0,76	139,1132 (100); 111,0815; 137,0974; 183,1025; 184,1039
10,58	Pinelinska kiselina	C ₁₈ H ₃₃ O ₅ [−]	329,23335	329,23534	-2,00	171,1047 (100); 139,1139; 183,1382; 201,1145; 211,1345; 229,1449
13,41	9-hidroksi-13-okso-10- oktadekanska kiselina	C ₁₈ H ₃₁ O ₄ [−]	311,22278	311,22509	-2,31	201,1138 (100); 127,1115; 139,1125; 171,1032; 183,1325; 197,1195
15,84	13-hidroksi-9,11-oktadekadienska kiselina	C ₁₈ H ₃₁ O ₃ [−]	295,22787	295,22894	-1,07	127,1132 (100); 111,0818; 171,1024; 183,1032
<i>Fenolna jedinjenja i derivati</i>						
4,30	<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	C ₇ H ₅ O ₃ [−]	137,02390	137,02649	-2,59	/
4,31	4-Metoksibenzoeva kiselina (<i>p</i> -Anisinska kiselina)	C ₈ H ₇ O ₃ [−]	151,04007	151,04025	-0,18	108,0219 (100); 107,0389; 109,0327
4,44	3,4-Dimetoksibenzoat (veratrinska kiselina)	C ₉ H ₉ O ₄ [−]	181,05063	181,05262	-1,98	134,0381 (100); 107,0569; 135,0427; 137,0216; 119,0531
6,19	Kumarinska kiselina izomer I	C ₉ H ₇ O ₃ [−]	163,04007	163,04142	-1,35	117,0338 (100); 118,0352; 119,0237
7,28	<i>p</i> -hidroksi-hidrocinetna kiselina (Dihidroksimarinska kiselina)	C ₉ H ₉ O ₃ [−]	165,05572	165,05574	-0,02	119,0504 (100); 117,0343; 147,0475

7,81	Sinapinska kiselina	$C_{11}H_{11}O_5^-$	223,06120	223,06138	-0,18	164,0408 (100); 117,0675; 133,0661; 163,0411; 179,0703, 193,0171
9,77	Kumarinska kiselina izomer II	$C_9H_7O_3^-$	163,04007	163,04023	-0,17	117,0357 (100); 119,0454; 145,9088

4.2 Karakterizacija bioaktivnih jedinjenja ekstrakta semenke grožđa

4.2.1 UHPLC-QToF-MS karakterizacija fenolnih jedinjenja ekstrakta semenke Prokupca

U Tabeli 4.4. dat je prikaz karakterizacije fenolnih jedinjenja identifikovanih u ekstraktu semenke Prokupca (GPE). Identifikovano je ukupno 78 fenolnih jedinjenja, koja se mogu klasifikovati u sedam različitih grupa: (I) hidroksibenzoeva kiselina i derivati (23 jedinjenja); (II) hidroksicimetna kiselina i derivati (6 jedinjenja); (III) flavan-3-oli i derivati (13 jedinjenja); (IV) procijanidini i proantocijanidini (14 jedinjenja); (V) flavonoli i derivati (13 jedinjenja); (VI) stilbenoidi i derivati (7 jedinjenja); i (VII) druga detektovana fenolna jedinjenja (2 jedinjenja).

Prethodna istraživanja koja su analizirala fenolni profil semenki grožđa, uključujući autohtonu sortu Prokupac, pokazala su da su hidroksibenzoeve kiseline (poput galne i njenih derivata), flavan-3-oli (pre svega katehin i epikatehin) zajedno sa procijanidinima, među najdominantnijim jedinjenjima u ekstraktima semenke (Yu & Ahmedna, 2013; Feei Ma & Zhang, 2017; Zdunić et al., 2019; Lucarini et al., 2020; Milinčić et al., 2021a; Milinčić et al., 2021b; Dabetić et al., 2022; Karastergiou et al., 2024). Derivati hidroksibenzoeve kiseline su bili najbrojniji među detektovanim jedinjenjima, pre derivati galne kiseline uključujući njegove metil- etil-, izoamil, i glicerol estre, derivate sa šikiminskom kiselinom, i glikozilovane forme. Svi derivati galne kiseline pokazuju tipične fragmente na 169/168 m/z i/ili 125/124 m/z koji odgovaraju deprotonovanoj galnoj kiselini i njenoj dekarboksilovanoj formi ($-CO_2$). Osim navedenih derivata galne kiseline, posebna pažnja je usmerena na detekciju elaginske kiseline (dimer derivat galne kiseline), kao i njenih derivata, uključujući glikozide i galoil-HHDP-heksozu. Jedinjenje galoil-HHDP-heksoza pripada elagitaninima, i pokazuje tipične fragmente na 301 m/z (deprtonovana HHDP grupa) i 169 m/z (deprtonovana galna kiselina). Galna kiselina i elaginska kiselina su među dominantno identifikovanim fenolnim jedinjenjima u semenki Prokupca (Pešić et al., 2019; Milinčić et al., 2021).

Pored navedenih jedinjenja, identifikovani su izomeri hidroksibenzoeve, dihidroksibenzoeve kiseline, i heksozidi vanilinske kiseline. Pomenuta izomerna jedinjenja pokazuju identične tačne mase i formule; slične fragmente, ali različita retenciona vremena, koja doprinose njihovoj identifikaciji. Prema dosadašnjim u literaturi dostupnim kvantitativnim podacima, u ekstraktima semenke grožđa, pokazan je visok sadržaj galne kiseline (Pantelić et al., 2016; Zdunić et al., 2019; Milinčić et al., 2021a; Natić et al., 2021; Elkatry et al., 2022; Dabetić et al., 2022, Milinčić et al., 2025c). Osim ferulinske kiseline i heksozida kafeinske kiseline, ostale hidroksicimetne kiseline su detektovane u formi estara, prvenstveno vezane sa vinskom kiselinom (kutarna, kaftarna i fertarna kiselina). Ova jedinjenja su tipično i predominantno nađena u vinu i vinskoj komini, o čemu su predhodno sugerisali drugi autori (Milinčić et al., 2021; Šuković et al., 2020).

Veliki broj različitih flavan-3-ol derivata je nađen u analiziranim semenkama Prokupca, što je očekivano jer su semenke bogat izvor upravo flavan-3-ola i njihovih polimernih pro(anto)cijanidina. Osim glavnih monomernih predstavnika (katehin, epikatehin i epigalokatehin) detektovani su njihovi monoheksozidi i derivati sa galnom kiselinom, kumarnom kiselinom, halkanima, kao i etil/metil dimerne forme. Svi identifikovani derivati pokazuju tipičan fragment na 289 m/z koji odgovara deprotonovanom monomernoj jedinici (katenihu ili epikatehinu). Procijanidini su nađeni u formi dimera (577 m/z), trimera (865 m/z), tetramera (1153 m/z) ili konjugata sa galnom kiselinom. Za svaki od navedenih procijanidina (osim tetratmner forme) je identifikovano dva ili više izomernih formi, koji imaju sličnu/identičnu fragmentaciju i formulu, ali različito retenciono vreme.

Tabela 4.4. Identifikacija i karakterizacija bioaktivnih jedinjenja ekstrakta semenke grožđa korišćenjem UHPLC-QToF-MS. U Tabeli su prikazana uslovno identifikovana jedinjenja, kao i retenciono vreme (RT), molekulska formula, izračunata masa, m/z tačna masa, srednje odstupanje masa (mDa) i MS/MS fragmenti za svako identifikovano jedinjenje.

RT	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Izračunata masa	m/z tačna masa	mDa	MS fragmenti (% , glavni fragment)
<i>Hidroksibenzojeva kiselina i derivati</i>						
4,92	Hidroksibenzojeva kiselina iz. I	$C_7H_5O_3^-$	137,0239	137,0257	-1,84	108,0221(100) ; 109,0273
8,42	Hidroksibenzojeva kiselina iz. II	$C_7H_5O_3^-$	137,0239	137,0264	-2,47	108,0185(100) ; 109,0254
5,32	Dihidroksibenzojeva kiselina iz. II	$C_7H_5O_4^-$	153,0188	153,0205	-1,73	107,0161(100) ; 108,0205
2,85	Dihidroksibenzojeva kiselina iz. I	$C_7H_5O_4^-$	153,0188	153,0215	-2,69	108,0220(100) ; 109,0300
1,41	Galna kiselina	$C_7H_5O_5^-$	169,0137	169,0156	-1,89	125,0247(100) ; 124,0170
5,98	Metil galat	$C_8H_7O_5^-$	183,0293	183,0327	-3,36	124,0177(100) ; 125,0211
7,48	Etil galat	$C_9H_9O_5^-$	197,0450	197,0493	-4,34	124,0175(100) ; 125,0238; 169,0142
10,58	Izoamil galat	$C_{12}H_{15}O_5^-$	239,0919	239,0937	-1,77	124,0173(100) ; 125,0239; 169,0149
3,30	Glicerin galat	$C_{10}H_{11}O_7^-$	243,0505	243,0529	-2,41	124,0167(100) ; 125,0237; 169,0150
7,82	Elaginska kiselina	$C_{14}H_5O_8^-$	300,9984	301,0014	-3,02	301,0014(100) ; 145,0303; 173,0254, 185,0260; 229,01581; 245,0110, 257,0107; 283,9984
2,83	Heksozid ihidroksibenzojeve kiseline	$C_{13}H_{15}O_9^-$	315,0716	315,0771	-5,46	108,0224(100) ; 109,0296; 152,0126; 153,0194
3,44	Galoilšikiminska kiselina	$C_{14}H_{13}O_9^-$	325,0560	325,0601	-4,09	125,0251(100) ; 111,0466; 124,0169; 155,0375; 168,0072; 169,0152
3,77	Heksozid vanilinske kiseline iz. I	$C_{14}H_{17}O_9^-$	329,0873	329,0914	-4,11	108,0225(100) ; 123,0457; 152,0125; 167,0362
5,31	Heksozid vanilinske kiseline iz. II	$C_{14}H_{17}O_9^-$	329,0873	329,0919	-4,61	123,0457(100) ; 124,0491; 167,0369
2,62	Heksozid galne kiseline	$C_{13}H_{15}O_{10}^-$	331,0665	331,0719	-5,42	125,0251(100) ; 169,0153
4,85	Metil-galat heksozid	$C_{14}H_{17}O_{10}^-$	345,0822	345,0870	-4,77	168,0075(100) ; 124,0173; 125,0204; 169,0102; 183,0313
6,87	Heksozid siringinske kiseline	$C_{15}H_{19}O_{10}^-$	359,0978	359,0984	-0,57	197,0470(100)
7,58	Pentozid elaginske kiseline	$C_{19}H_{13}O_{12}^-$	433,0407	433,0466	-5,92	299,9927(100) ; 301,0002; 433,0471
5,93	Digaloil heksozid iz. II	$C_{20}H_{19}O_{14}^-$	483,0775	483,0828	-5,32	169,0156(100) ; 125,0249; 211,0266, 271,0479; 313,0594; 331,0684
2,35	Digaloil heksozid iz. I	$C_{20}H_{19}O_{14}^-$	483,0775	483,0800	-2,51	169,0146(100) ; 125,0245; 331,0719

1,55	Diheksozid galne kiseline iz. I	$C_{19}H_{25}O_{15}^-$	493,1193	493,1254	-6,09	169,0152(100) ; 125,0252; 313,0605; 331,0697
2,42	Diheksozid galne kiseline iz. II	$C_{19}H_{25}O_{15}^-$	493,1193	493,1249	-5,55	313,0594(100) ; 125,0249; 169,0149; 331,0712
6,54	Galoil-HHDP-heksoza	$C_{27}H_{21}O_{18}^-$	633,0728	633,0790	-6,15	301,0013(100) ; 169,0136; 463,0490; 633,0789
<i>Hidroksicimetna kiselina i derivati</i>						
6,60	Ferulinska kiselina	$C_{10}H_9O_4^-$	193,0501	193,0523	-2,18	134,0389(100) ; 117,0359; 133,0294
9,77	Etil kafeat (Etil kafeinske kiseline)	$C_{11}H_{11}O_4^-$	207,0657	207,0687	-3,02	133,0301(100) ; 134,0370; 135,0459; 161,0249; 179,0350
6,06	Kumaroil vinska kiselina (Kotarna kiselina)	$C_{13}H_{11}O_8^-$	295,0454	295,0499	-4,46	119,0508(100) ; 163,0413
4,65	Kafeoil vinska kiselina (Kaftarna kiselina)	$C_{13}H_{11}O_9^-$	311,0403	311,0455	-5,16	135,0459(100) ; 179,0356
6,66	Feruloil vinska kiselina (Fertarna kiselina)	$C_{14}H_{13}O_9^-$	325,0560	325,0645	-8,52	134,0384(100) ; 135,0422; 149,0619; 178,0291; 193,0531
6,06	Heksozid kafeinske kiseline	$C_{15}H_{17}O_9^-$	341,0873	341,0904	-3,06	161,0260(100) ; 135,0463; 179,0368
<i>Flavan-3-oli i derivati</i>						
6,40	Katehin	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,0712	289,0754	-4,19	123,0462(100) ; 109,0307; 125,0256; 137,0258; 151,0411; 161,0605; 203,0728; 221,0842
7,06	Epikatehin	$C_{15}H_{13}O_6^-$	289,0712	289,0759	-4,70	123,0458(100) ; 109,0303; 125,0252; 137,0250; 149,0255; 151,0410; 159,0463; 161,0602; 187,0421; 203,0727; 221,0834
3,37	Epigalokatehin	$C_{15}H_{13}O_7^-$	305,0661	305,0708	-4,72	125,0255(100) ; 109,0303; 137,0253; 139,0412; 165,0197; 167,0370; 219,0678
9,37	(Epi)katehin 3-O-kumarat	$C_{24}H_{19}O_8^-$	435,1080	435,1163	-1,91	145,0303(100) ; 109,0307; 125,0255; 137,0257; 165,0188; 179,0365; 203,0738; 205,0530; 245,0838; 287,0205; 289,0746
8,62	Amurensisin	$C_{22}H_{15}O_{10}^-$	439,0665	439,0718	-5,34	287,0228 ; 243,0318; 259,0269; 274,0142; 288,0274; 439,0718

7,92	(-)-Epikatehin galat	$C_{22}H_{17}O_{10}^-$	441,0822	441,0879	-5,71	169,0158(100) ; 125,0253; 245,0835; 289,0742
5,93	(-)-Epikatehin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{21}H_{23}O_{11}^-$	451,1240	451,1282	-4,16	289,0749(100) ; 290,0782; 203,0727; 245,0842
5,46	Katehin -3- <i>O</i> -heksozid	$C_{21}H_{23}O_{11}^-$	451,1240	451,1295	-5,46	289,0739(100) ; 290,0773; 137,0250; 203,0721; 245,0840
8,08	(Epi)galokatehin 3- <i>O</i> -galat metil etar	$C_{23}H_{19}O_{11}^-$	471,0927	471,1014	-8,71	125,0248(100) ; 169,0151; 269,0469; 287,0552; 303,0519; 313,0364
7,01	Halkon-flavan 3-ol dimer iz. II	$C_{30}H_{27}O_{12}^-$	579,1503	579,1542	-3,92	289,0743(100) ; 125,0252; 137,0252; 179,0361; 205,0523; 245,0844
6,33	Halkon-flavan 3-ol dimer iz. I	$C_{30}H_{27}O_{12}^-$	579,1503	579,1552	-4,89	289,0750(100) ; 290,0783; 109,0302; 125,0252; 137,0256; 179,0363; 205,0528; 245,0844
9,77	Etil (epi)katehin-(epi)katehin (Epikatehin etil dimer)	$C_{32}H_{29}O_{12}^-$	605,1659	605,1717	-5,81	315,0905(100) ; 316,0916; 137,0240; 163,0425; 205,0534; 245,0835; 289,0738
6,74	(Epi)katehin-metil-(epi)galokatehin	$C_{31}H_{27}O_{13}^-$	607,1452	607,1481	-2,95	125,0241(100) ; 161,0259; 243,0351; 287,0579; 405,0716; 424,0778; 452,0826
<i>Procijanidini i proantocijanidini</i>						
6,80	Procijanidin dimer B-tip iz. II	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,1346	577,1425	-7,95	289,0743(100) ; 109,0303; 205,0523; 245,0845
6,20	Procijanidin dimer B-tip iz. I	$C_{30}H_{25}O_{12}^-$	577,1346	577,1435	-8,93	289,0747(100) ; 109,0305; 125,0255; 137,0254; 179,0367; 205,0526; 245,0847
8,62	Proantocijanidin A	$C_{31}H_{27}O_{12}^-$	591,1503	591,1538	-3,45	289,0742(100) ; 109,0305; 125,0254; 137,0244; 215,0743; 245,0853; 257,0828; 301,0755; 439,1087
6,27	Procijanidin A4	$C_{30}H_{23}O_{13}^-$	591,1139	591,1228	-8,93	259,0270(100) ; 260,0301; 125,0245; 137,0246; 139,0044; 151,0058; 161,0251; 271,0275; 289,0710; 423,0753
7,41	Procijanidin dimer B-tip galat iz. I	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,1457	729,1549	-9,20	407,0822(100) ; 125,0254; 169,0157; 271,0641; 289,0747; 425,0929; 441,0878; 451,1097; 577,1376

8,42	Procijanidin dimer B-tip galat iz. II	$C_{37}H_{29}O_{16}^-$	729,1457	729,1547	-9,00	407,0815(100) ; 125,0247; 169,0153; 245,0548; 271,0647; 289,0738; 441,0875; 451,1085; 577,1350
8,76	Feruloil procijanidin dimer B-tip	$C_{40}H_{33}O_{15}^-$	753,1819	753,1934	-11,50	407,0818(100) ; 125,0253; 137,0252; 289,0754; 425,0899; 451,1104; 577,1408; 601,1442
9,97	Procijanidin dimer B-tip dimetil-galat	$C_{39}H_{33}O_{16}^-$	757,1770	757,1824	-5,42	315,0907(100) ; 169,0151; 289,0745; 441,0880; 467,1054; 605,1505
3,64	Procijanidin trimer iz. I	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,1980	865,2074	-9,34	287,0594(100) ; 289,0740; 125,0253; 407,0823; 425,0921; 451,1088; 575,1260; 577,1414; 695,1486; 713,1593
6,60	Procijanidin trimer iz. II	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,1980	865,2100	-11,95	287,0592(100) ; 289,0747; 125,0257; 407,0822; 425,0923; 451,1075; 575,1268; 577,1417; 695,1495; 713,1591
7,27	Procijanidin trimer iz. III	$C_{45}H_{37}O_{18}^-$	865,1980	865,2102	-12,15	287,0593(100) ; 289,0750; 125,0252; 407,0820; 413,0925; 425,0924; 451,1067; 575,1260; 577,1413; 695,1472; 713,1595
8,76	Procijanidin dimer B tip digalat iz. II	$C_{44}H_{33}O_{20}^-$	881,1565	881,1711	-14,60	407,0831(100) ; 125,0244; 269,0486; 287,0583; 289,0761; 559,1237; 577,1265; 711,1448; 729,1540
7,82	Procijanidin dimer B tip digalat iz. I	$C_{44}H_{33}O_{20}^-$	881,1565	881,1715	-14,95	407,0810(100) ; 125,0254; 169,0152; 287,0603; 289,0736; 559,1269; 560,1329; 577,1323; 729,1544
7,41	Procijanidin tetramer	$C_{60}H_{49}O_{24}^-$	1153,2614	1153,2743	-12,87	1153,2748(100) ; 1154,2767; 125,0242; 287,0598; 413,0936; 425,0925; 575,1273; 576,1299; 577,1403; 865,2023
<i>Flavonoli i derivati</i>						
10,37	Kampferol	$C_{15}H_9O_6^-$	285,0399	285,0427	-2,84	285,0427(100) ; 143,0500; 159,0459; 185,0620; 187,0416; 211,0413; 229,0520; 239,0360
9,53	Kvercetin	$C_{15}H_9O_7^-$	301,0348	301,0363	-1,53	151,0045(100) ; 107,0147; 121,0301; 178,9990; 187,0427; 245,0461

10,51	Izoramnetin	$C_{16}H_{11}O_7^-$	315,0505	315,0557	-5,17	300,0304(100) ; 301,0332; 151,0053; 164,0126; 227,0358; 243,0316; 255,0317; 271,0270; 283,0277
10,38	Siringetin	$C_{17}H_{13}O_8^-$	345,0610	345,0658	-4,82	315,0185(100) ; 316,0215; 259,0275; 287,0228; 329,0328; 330,0418; 331,0453
8,29	Kampferol 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{21}H_{19}O_{11}^-$	447,0927	447,0987	-5,99	284,0360(100) ; 285,0414; 227,0375; 255,0326; 327,0552
7,95	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{21}H_{19}O_{12}^-$	463,0877	463,0927	-4,96	300,0313(100) ; 301,0375; 151,0051; 179,0004; 255,0322; 271,0283
7,88	Kvercetin 3- <i>O</i> -heksuronid	$C_{21}H_{17}O_{13}^-$	477,0669	477,0715	-4,61	301,0395(100) ; 302,0424; 151,0049; 179,0002
8,36	Izoramnetin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{22}H_{21}O_{12}^-$	477,1033	477,1055	-2,18	314,0471(100) ; 315,0518; 151,0060; 243,0327; 300,0302
7,48	Miricetin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{21}H_{19}O_{13}^-$	479,0826	479,0890	-6,42	316,0265(100) ; 317,0315
8,01	Laricitrin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{22}H_{21}O_{13}^-$	493,0982	493,1066	-8,39	287,0594(100) ; 288,0639; 151,0054; 272,0366; 285,0424; 315,0211; 330,0427; 331,0498
8,36	Siringetin 3- <i>O</i> -heksozid	$C_{23}H_{23}O_{13}^-$	507,1139	507,1195	-5,60	301,0753(100) ; 286,0518; 327,0555; 328,0575; 344,0571; 345,0654
10,24	Izoramnetin 3- <i>O</i> -(6''-kumaroil)heksozid	$C_{31}H_{27}O_{14}^-$	623,1401	623,1486	-8,54	271,0640(100) ; 272,0677; 297,0440; 298,0476; 315,0552
9,84	Laricitrin 3- <i>O</i> -(6''-kumaroil)heksozid	$C_{31}H_{27}O_{15}^-$	639,1350	639,1496	-14,60	331,0501(100) ; 287,0595; 313,0391
<i>Stilbenoidi i derivati</i>						
9,64	Resveratrol	$C_{14}H_{11}O_3^-$	227,0708	227,0751	-4,28	143,0513(100) ; 157,0673; 181,0666; 185,0618
8,48	Resveratrol 3- <i>O</i> -glukozid	$C_{20}H_{21}O_8^-$	389,1236	389,1296	-5,99	227,0729(100) ; 185,0614; 228,0751
10,17	Resveratrol dimer	$C_{28}H_{21}O_6^-$	453,1338	453,1375	-3,69	225,0581(100) ; 226,0648; 227,0696; 197,0629; 333,0810; 346,0875; 347,0945; 435,1272; 453,1397
10,47	Resveratrol dimer (kao Gneafrikanin A)	$C_{29}H_{23}O_8^-$	499,1393	499,1472	-7,86	453,1374(100) ; 454,1406; 225,0548; 226,0671; 347,0978; 359,0952; 411,1226; 435,1288
10,31	Resveratrol trimer	$C_{42}H_{31}O_9^-$	679,1968	679,2029	-6,09	679,2049(100) ; 335,0941; 345,0841; 451,1247; 573,1648;

						585,1637
9,84	Resveratrol tetramer iz. I	$C_{56}H_{41}O_{12}^-$	905,2598	905,2605	-0,74	905,2726(100) ; 906,2742; 357,0811; 358,0873; 359,0975; 451,1248; 717,1832; 811,2276; 812,2307
11,19	Resveratrol tetramer iz. II	$C_{56}H_{41}O_{12}^-$	905,2598	905,2711	-11,32	905,2707(100) ; 906,2768; 359,0977; 799,2329; 887,2618
<i>Druga detektovana fenolna jedinjenja</i>						
9,30	Eriodiktol 7,3'-dimetil etar	$C_{17}H_{15}O_6^-$	315,0869	315,0886	-1,71	109,0297(100) ; 123,0461; 151,0403; 163,0378; 177,0529; 187,0425; 203,0664
7,61	Moreloflavon acetil-heksozid	$C_{38}H_{31}O_{17}^-$	759,1561	759,1592	-3,09	287,0582(100) ; 288,0635; 125,0246; 269,0484; 303,0524; 405,0651; 437,0882; 575,1253

Rezultati ove karakterizacije potvrđuju kompleksan procijanidinski profil semenke sorte Prokupac, na šta su predhodno ukazali Pešić et al., (2019), analizirajući takođe vodeni ekstrakt ove sorte na UHPLC-MS/MS Orbitrap-u. Flavonoli nisu tipična jedinjenja semenke grožđa; već su uglavnom prisutna u pokožici. Njihovo prisustvo (detekcija) u ekstraktu semenke može biti zbog tragova pokožice u brašnu semenke ili njihove apsorpcije na površine semenke usled kontakta sa vinom tokom fermentacije. Flavonoli su identifikovani u obliku aglikona (kvercetin, kampferol, izoramnetin i siringentin), kao i monoglikozida, heksuronida ili acil-glikozida. Glikozilovane forme pripadaju derivatima kampferola, kvercetina, miricetina, laricitrina, izormanetina i siringetina. Osim navedenih klasa, identifikovani su i stilbenoidi, odnosno resveratrol, resveratrol 3-*O*-glukozid, i njegovi polimerni oblici (dimer, trimer i tetramer kompleksi), kao tipična jedinjenja nađena u grožđu, vinu i komini (Šuković et al., 2020; Milinčić et al., 2021).

Konačno, fenolni profil ekstrakta semenki sorte Prokupac, utvrđen u okviru ove doktorske disertacije, u velikoj meri je u skladu sa rezultatima ranijih istraživanja koja su bila fokusirana na analizi fenolnih profila ove i srodnih sorti.

4.2.2 Procena antioksidativne aktivnosti ekstrakta semenke Prokupca

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i ukupnih proantocijanidina su prikazani u Tabeli 4.5. Dobijeni rezultati pokazuju da je semenska Prokupca dobar izvor fenolnih jedinjenja, prvenstveno flavan-3-ola i proantocijanidina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora koji su ispitivali semenke ove iste sorte grožđa (Gođevac et al., 2010; Pantelić et al., 2016; Pešić et al., 2019; Zdunić et al., 2019; Milinčić et al., 2021b). Štaviše, spektrofotometrijski rezultati su u saglasnosti sa UHPLC-QToF-MS karakterizacijom koja je pokazala da su jedinjenja iz klase flavan-3-ola i procijanidina, pored hidroksibenzoeve kiseline i njenih derivata, najčešće identifikovani u ispitivanom ekstraktu Prokupca.

Tabela 4.5. Spektrofotometrijska karakterizacija ekstrakta semenke Prokupca*

Metode	Rezultati
Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (mg GAE/g s.m.)	56,01 ± 1,43
Sadržaj ukupnih flavonoida (mg CE/g s.m.)	17,13 ± 0,06
Sadržaj ukupnih proantocijanidina (mg PA/g s.m.)	68,52 ± 0,86

*rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija. GAE – ekvivalent galne kiseline; CE – ekvivalent katehina; PA – ekvivalent proantocijanidina; SM – suva masa uzorka.

Istraživanja na različitim sortama grožđa pokazala su da vrednosti fenolnih jedinjenja u semenkama mogu značajno varirati, čemu na njihove utvrđene koncentracije snažno utiču sorta grožđa, faktori životne sredine, faza zrenja, način vinifikacije i naročito uslovi ekstrakcije (Lopes et al., 2025). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan sadržaj bioaktivnih fenolnih jedinjenja u semenkama sorte Prokupac, što dalje sugeriše da imaju potencijal kao izvor jedinjenja sa funkcionalnim svojstvima. Padilla-González et al. (2022) su dali pregled o hemijskoj raznovrsnosti flavan-3-ola u semenki grožđa, gde se naglašava da su semenke bogat izvor monomera, oligomera i polimera flavan-3-ola, pre svega B-tip procijanidina, katehina i epikatehina, što je takođe potvrđeno UHPLC-QToF-MS analizom (Tabela 4.4). Junior et al. (2023) su na obezmašćenim semenkama grožđa *Vitis labrusca* L., pri ekstrakciji 60% etanolom i različitim odnosima čvrste faze i rastvarača, zabeležili TPC u opsegu 2747–3623 mg GAE/100g uzorka.

Slično tome, Di Stefano et al. (2022) su za obezmašćeno brašno semenki crvenog grožđa sa Sicilije, uz ekstrakciju smešom metanol/voda (80:20, v/v), utvrdili $20,69 \pm 0,13$ mg GAE g^{-1} brašna semenki. Nasuprot tome, Ivanov et al. (2025a) su za suve 70 % etanolne ekstrakte semenki sorti Pinot Noir i Marselan prijavili 111,22 i 103,24 mg GAE/g suve materije ekstrakta. Chengolova et al. (2023) su pokazali da je TPC ekstrakata pokožice bio približno 2–3 puta niži od TPC ekstrakata semenki istih sorti, pri čemu su autori utvrdili i povezanost fenolnog sastava sa antioksidativnim kapacitetom i ukazali na potencijal ekstrakata grožđa kao izvora prirodnih antioksidanasa za prehrambenu i farmaceutsku primenu. Međutim, visok sadržaj ukupnih proantocijanidina ekstrakta semenke Prokupca od $68,52 \pm 0,86$ mg PA/g SM, jasno ukazuje da su proantocijanidini tipična grupa fenolnih jedinjenja zastupljena u semenkama Prokupca.

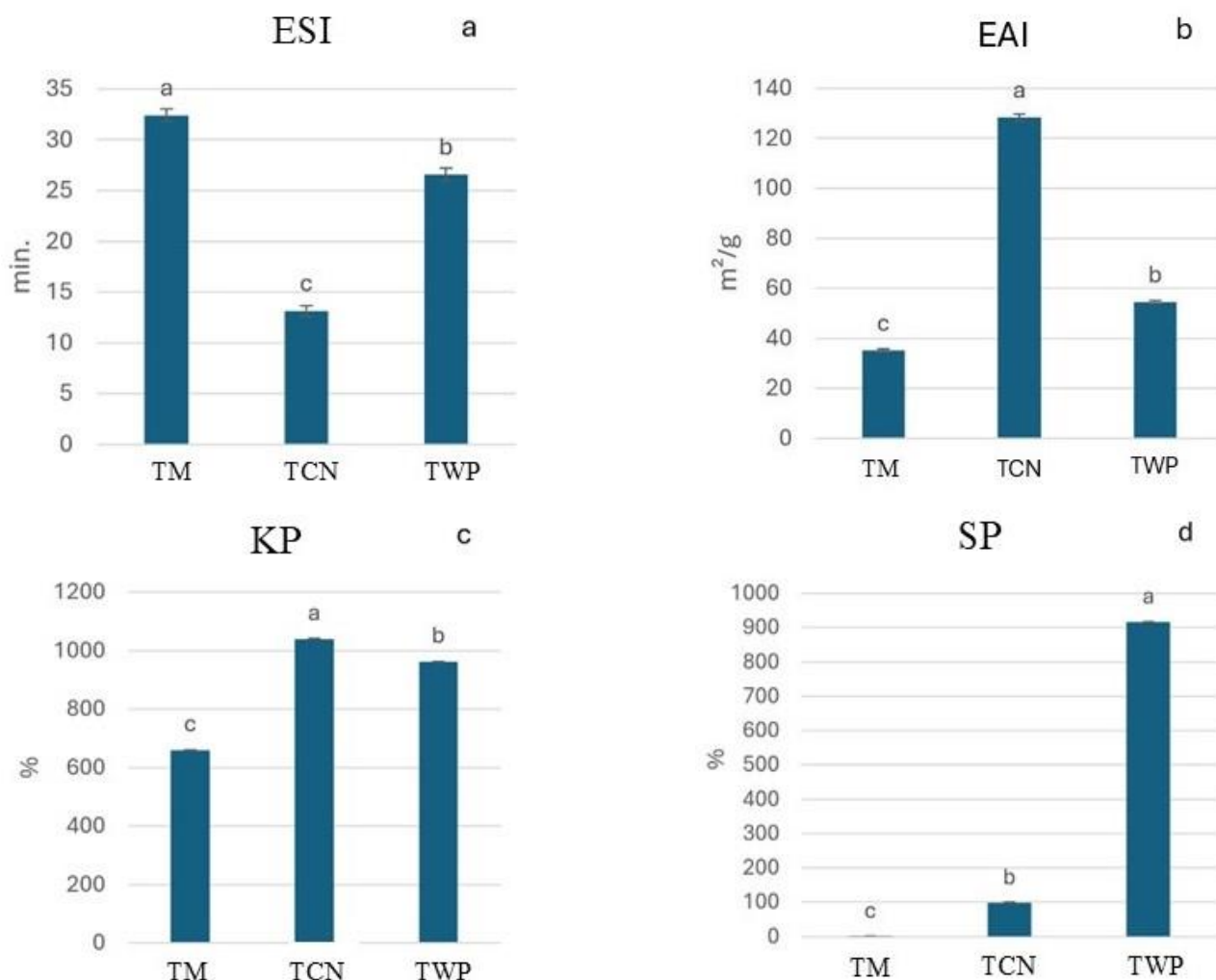
4.3 Karakterizacija termički tretiranog i sirovog kozjeg mleka i njihovih proteinskih frakcija

4.3.1 Tehno-funkcionalna svojstva obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka i njegovih frakcija

Izbor proteinskog matriksa koji bi se dalje koristio u dizajnu i optimizaciji funkcionalne formulacije mikroinkapsulata bazirala se na rezultatima emulgujućih i penivih svojstava različitih frakcija kozjeg mleka.

Na grafičkom prikazu (Slika 4.3.a) može se primetiti da je najveću vrednost indeksa stabilnosti emulzije imala emulzija koju formira 0,1 % rastvor obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka (TM) ($ESI = 32,42 \pm 0,62$ min). Ova vrednost je bila značajno viša od vrednosti koje su dobijene za rastvor termički tretiranih kazeina ($TCN = 13,14 \pm 0,54$ min) i termički tretiranih serum proteina ($TWP = 26,54 \pm 0,64$ min). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u radu Jakšić (2018). Rezultati ukazuju na to da TM formira najstabilniju emulziju. Literaturni podaci su pokazali zajednički doprinos kazeina i serum proteina u mleku na formiranje i stabilizacije emulzije (ALKaisy et al., 2023b; Silva et al., 2021). Proteini surutke se brzo adsorbuju na granici ulje/voda zbog visoke površinske aktivnosti, dok kazeini formiraju mrežu oko dispergovanih kapljica ulja (ALKaisy et al., 2023b). Takođe je utvrđeno da su upravo αS_1 , αS_2 , β i κ kazeini glavni proteini na granici ulje/voda, koji dodatno redukuju veličinu kapljica i održavaju stabilnost emulzije (ALKaisy et al., 2023b).

U slučaju TM serum proteini su ravnomerno distribuirani po kazeinskoj miceli, što zajedno sa slobodnim serum proteinima omogućava formiranje kompaktne i uniformne mreže oko kapljice ulja i doprinosi visokoj vrednosti ESI. Nasuprot tome, TCN sam po sebi daje slabu stabilnost, kao što se vidi na slici 4.3.a, ali i rezultatima drugih autora pokazuju da kazeinska frakcija poseduje visok kapacitet formiranja pene (Slika 4.3.c) ali znatno niži indeks stabilnosti emulzije (Qin et al., 2021a). Usled precipitacije dolazi do delimičnog „ogoljavanja“ kazeinske micle, čime se narušava kompaktna struktura termički tretiranih kazeina, a samim tim i njihova emulgujuća stabilnost. Najveću vrednost indeksa aktivnosti emulzije (Slika 4.3.b) je pokazao TCN ($EAI = 128,26 \pm 1,36$ m^2/g), značajno višu u poređenju sa TM ($EAI = 35,12 \pm 0,62$ m^2/g) i TWP ($EAI = 54,55 \pm 0,65$ m^2/g). Iako TCN ima najveću emulgujuću aktivnost, rastvor ove frakcije daje jako nestabilne emulzije. Sa druge strane, TM pokazuje tendenciju za formiranje emulzija, koja ostaje stabilna duži vremenski period, što je od presudnog značaja za njihovu primenu u prehrambenim formulacijama.



Slika 4.3. Grafički prikazi tehno-funkcionalnih svojstava kozjeg mleka i proteinskih frakcija: (a) indeks stabilnosti emulzije – ESI; (b) indeks aktivnosti emulzije – EAI; (c) kapacitet formiranja pene – KP, (d) stabilnost formiranja pene – SP. Skraćenice: TM – obezmaščemo termički tretirano kozje mleko; TCN – termički tretirani kazeini kozjeg mleka; TWP – termički tretirani proteini surutke kozjeg mleka. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija. Poređenje između srednjih vrednosti je označeno malim slovima. Srednje vrednosti sa istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p < 0,05$.

Što se tiče penivosti (Slika 4.3.c,d) TM je pokazao najmanji kapacitet formiranja pene i nikakvu stabilnost formiranja pene ($KP = 658,78 \pm 1,38 \%$, $SP = 1 \pm 0,20 \%$), za razliku od TCN ($KP = 1039,52 \pm 1,12 \%$, $SP = 98 \pm 2 \%$) i TWP ($KP = 961 \pm 1,20 \%$, $SP = 916 \pm 2,00 \%$). TCN frakcija je pokazala najveći kapacitet formiranja pene, dok je TWP frakcija pokazala najveću stabilnost formirane pene. Termički tretirani kazeini se brzo grupišu na međufazi voda/vazduh, međutim delimično „ogoljene” kazeinske micelle imaju šupljine koje sprečavaju formiranje kompaktnog sloja na međufazi, što daje jako nestabilne pene. Sa druge strane, TWP rastvor daje najstabilnije pene, čemu najviše doprinose zaostali serum proteini koji nisu denaturisali i koji nisu u WP/CN kompleksima, kao i agregati koji su se „otkacili” sa kazeinske micelle tokom precipitacije. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su prijavili Qin et al. (2021). Pošto instant supa ne zahteva formiranje pene, već homogenu, stabilnu emulziju i dobru rastvorljivost, nisu strogi zahtevi za peniva svojstva proteina i njegovih frakcija. Naprotiv, izbegavanje pene može biti korisno za ujednačenost supe pri rehidraciji, jer visok sadržaj proteina može usporiti rastvorljivost praha (Jiang et al., 2025).

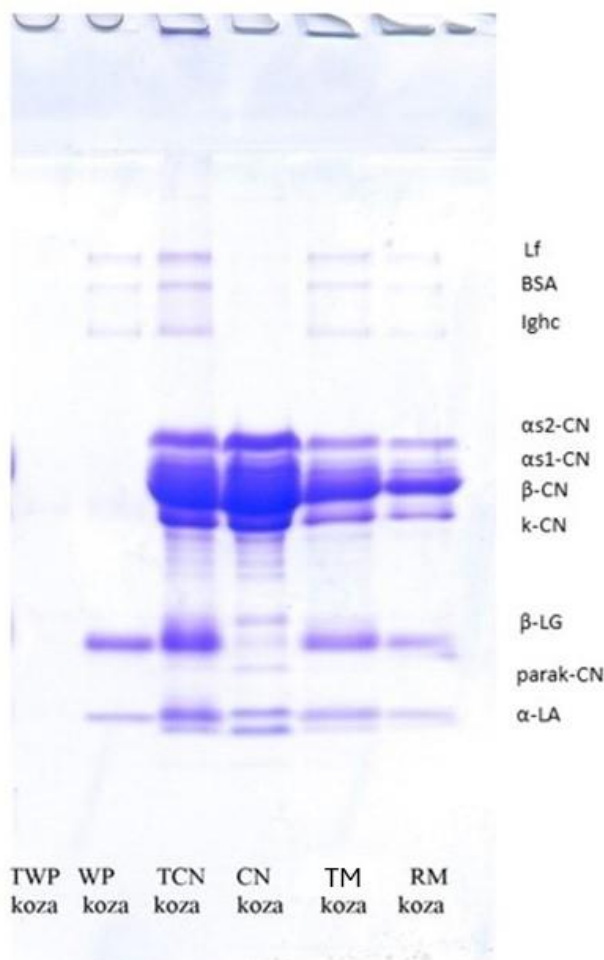
Uzimajući u obzir rezultate tehno-funkcionalnih svojstava, TM se pokazao kao idealan kandidat za dalja ispitivanja i razvoj funkcionalne formulacije. TM daje najstabilniju emulziju (visok ESI) i zadržava odgovarajući emulgujući kapacitet, dok slabija svojstva formiranja pene ne utiču na ciljanu

primenu. Štaviše, TM primena u daljoj optimizaciji i formulaciji u funkcionalnoj supi može obezbediti homogenost i stabilnost proizvoda, što nije slučaj sa analiziranim frakcijama, jer TCN pokazuje slabiju stabilnost emulzije, a TWP stvara previše pene.

4.3.2 Elektroforetska karakterizacija termički tretiranog i sirovog kozjeg mleka i njihovih proteinskih frakcija

Na Slici 4.4. prikazan je SDS-PAGE elektroforetski profil sirovog i termički tretiranog kozjeg mleka i njihovih proteinskih frakcija. Kao što se može videti na Slici 4.4., u frakcijama kazeina (CN/TCN; RM/TM) dominiraju intenzivne trake u zoni tipičnoj za kazeine (25-35 kDa), dok WP ima dominantne niskomolekulske trake koje odgovaraju β -LG (približno 18 kDa) i α -LA (približno 14 kDa), glavnim serum proteinima kozjeg mleka (Milinčić et al., 2021b; Popović Minić et al., 2023). Trake koje odgovaraju β -LG i α -LA nisu identifikovane u TWP uzorku. Usled termičkog tretmana serum proteini su denaturisani i ravnomerno distribuirani na kazeinskoj miceli, odnosno formiraju komplekse sa kazeinima (WP/CN kompleksi). Elektroforetski profili TCN i CN frakcija se razlikuju, prvenstveno u intenzitetu traka koje pripadaju serum proteinima. U ovom slučaju, SDS-R-PAGE doprinosi diferencijaciji frakcija kazeina. Na TCN elektroforegramu trake koje pripadaju serum proteinima su intenzivne, dok su na CN elektroforegramu trake slabog intenziteta i difuzne. Kod termički tretiranih kazeina (TCN), serum proteini su vezani za kazeinsku micelu (posledica termičkog tretmana) i ostaju zadržani na miceli tokom precipitacije. Sa druge strane, prilikom precipitacije kazeina u sirovom mleku, serum proteini su zadržani u WP frakciji. Profili mleka (RM/TM) pokazuju kombinovani obrazac, tj. istovremeno prisustvo kazeinskih traka i traka serum proteina. Na SDS-R-PAGE gelu oba mleka (sirovo i termički tretirano) imaju slične/identične profile, sa jasno diferenciranim kazeinima i serum proteinima, zbog uticaja redukujuće agensa (β -merkaptotanol) koji „razbija” formirane komplekse u TM. Jedina razlika u ovim profilima se može pripisati intenzitetu traka na elektroforegramu. Identične SDS-R-PAGE profile su predhodno prijavili drugi autori, analizirajući uticaj termičkog tretmana na proteine kozijeg mleka (Pešić et al., 2012; Milinčić et al. 2021b). Termički tretman mleka prvenstveno utiče na denaturaciju serum proteina i njihove interakcije (nekovalentne i disulfidne) formirajući β -LG/ κ -kazein kompleks i druge komplekse i agregate (Li et al., 2021). U literaturi se navodi da termički tretman (90 °C/10 min) može indukovati visok stepen denaturacije serum proteina i prvenstveno njihovu agregaciju sa κ -kazeinom (i delimično sa α - i β -kazeinom), što posledično dovodi do intenzivnog formiranja micelarno-vezanih kompleksa sa uniformnom raspodelom denaturisanih serum proteina na kazeinskoj miceli, dok i jako mali udeo „slobodnih” rastvornih kompleksa ostaje u serum fazi (Pešić et al., 2012; Milinčić et al., 2021b; Moatsou, 2023). Na elektroforetskim obrascima WP, TCN, RM, i TM mogu se takođe uočiti trake koje odgovaraju laktoferinima, serum albuminima (BSA) i imunoglobulinima (Ig).

Uzimajući u obzir sve navedeno, kompleksnost proteinskog profila, kazeinsku micelu koja je „obogaćena” serum proteinima i reprezentativna/poželjna tehno-funkcionalna svojstva, TM je izabran za dalju studiju, koja obuhvata optimizaciju proizvodnje funkcionalne formulacije mikroinkapsulata. TM sadrži i kazeine i denaturisane serum proteine vezane u WP/CN komplekse (naročito preko β -LG/ κ -kazein interakcija), što daje stabilniju i tehnološki relevantniju proteinsku matricu za dalju primenu u funkcionalnim formulacijama mikroinkapsulata (Moatsou, 2023; Pešić et al., 2014).



Slika 4.4. SDS-PAGE elektroforetski profil kozjeg mleka i proteinskih frakcija. Oznake: TWP – termički tretirani proteini surutke kozjeg mleka; WP – proteini surutke kozjeg mleka; TCN – termički tretirani kazeini kozjeg mleka; CN – kazeini kozjeg mleka; TM – obezmašćeno termički tretirano kozje mleko; RM – obezmašćeno kozje mleko. Skraćenice: laktoferin (Lf); goveđi serum albumin (BSA); Imunoglobulini (IgG); α_2 -kazein (α_2 -CN); α_1 -kazein (α_1 -CN); β -kazein (β -CN); κ -kazein (κ -CN); β -laktoglobulin (β -LG); parak-kazein (parak-CN); α -laktalbumin (α -LA).

4.4 Dizajn eksperimenta (DoE) i centralni kompozitni dizajn (CCD)

Koncept metodologije odgovora površina (RSM) već je opisan u odeljku 3.3 u okviru materijala i metoda. Osnovna ideja RSM-a je da se, na osnovu dobro postavljenog plana eksperimenta (kao što je CCD), prikupi skup podataka koji omogućava razvoj matematičkog modela (najčešće polinoma drugog reda) (jednačina (1)) kojim se opisuje na koji način promene faktora između ispitivanih nivoa utiču na odgovor (Bezerra et al., 2008). Nakon što se model postavi, mogu se konstruisati površine odgovora (3D grafički prikazi površina ili konturni dijagrami) kako bi se vizuelno ilustrovao odnos između faktora i odgovora, što olakšava identifikaciju optimalnih uslova (Vera Candioti et al., 2014).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (16)$$

U jednačini, y predstavlja zavisno promenljivu (odgovor sistema); x_i i x_j su nezavisne promenljive (i i j mogu biti u opsegu od 1 do k); β su označeni koeficijenti, koji označavaju konstantu (β_0), linearni koeficijent (β_i), koeficijent interakcije (β_{ij}) i koeficijent kvadratnog člana (β_{ii}); k je broj nezavisnih parametara ($k = 2$); a ε je rezidualna greška (Prakash Maran et al., 2013). Praktično, odgovor sistema (zavisno promenljiva) opisuje se jednačinom matematičkog modela (jednačina 1), a regresioni

koeficijenti predstavljaju koeficijente te jednačine. Regresioni koeficijenti se određuju primenom metode najmanjih kvadrata, tako da rezidualna greška (ϵ) bude što manja.

U cilju određivanja optimalnog sastava funkcionalne formulacije mikroinkapsulata, pet svojstava formulacije je ispitivano i predstavljalo odgovore sistema (zavisno promenljive) u funkciji sadržaja ekstrakta semenke grožđa i ekstrakta gljive (kao nezavisno promenljivih) u formulaciji na bazi kozjeg mleka. Analizirana svojstva funkcionalne formulacije obuhvatala su: ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC), sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} i DPPH[•] radikala, redukciona moć (FRP) i sposobnost heliranja Fe²⁺ jona (CHE). Eksperimentalni rezultati su statistički analizirani primenom matematičkog programa MINITAB, konstruisanjem grafika odgovora površine i određivanjem regresionih koeficijenata. Statistički značaj promenljivih, njihovih interakcija i kvadratnog člana regresione jednačine je određen za interval poverenja od 95 % ($p \leq 0,05$). Relativne veličine efekata ispitivanih promenljivih određene su na osnovu efekta faktora i njegovih odgovarajućih p -vrednosti. Adekvatnost i kvalitet matematičkog modela (regresione jednačine), primenjenog za opisivanje eksperimentalnih rezultata, procenjena je analizom varijanse (ANOVA). Analiza varijanse je metoda zaključivanja zasnovana na statističkim polinomnim modelima. Zasniva na principu kojim se ukupan varijabilitet skupa podataka deli na dve komponente: faktorsku (organizovanu) i rezidualnu (slučajnu). Faktorska varijacija je posledica promene ispitivanih parametara između izabranih nivoa. Usled prisustva slučajne greška koja pripada merenju izabranog odgovora sistema nastaje rezidualna varijacija.

Procenjeni efekti i regresioni koeficijenti prikazani u Tabeli S3, zajedno sa analizom varijanse (ANOVA), korišćeni su da bi se utvrdilo kako ispitivani faktori utiču na ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC) u pripremljenim smešama. Poređenjem procenjenih p -vrednosti i utvrđenog kriterijuma ($p < 0,05$), ustanovljeno je da linearni član ekstrakta semenke grožđa značajno utiče na TPC u analiziranim smešama (Slika 4.5a). Dobijeni koeficijent determinacije ($R^2 = 69,93$ %) ukazuje na umeren stepen korelacije između odgovora sistema (TPC) i nezavisno promenljivih. Grafik površine odgovora prikazan na slici 4.5a pokazuje da je najveći ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja određen u proizvodu pripremljenom na maksimalnim ispitivanim nivoima nezavisnih promenljivih $w(\text{ME})$ i $w(\text{GPE})$. Pored toga, neinterpolisani eksperimentalni rezultati nisu bili statistički značajni ($p > 0,05$), što sugerise da je model adekvatno opisao eksperimentalne podatke u okviru ispitivanog eksperimentalnog domena.

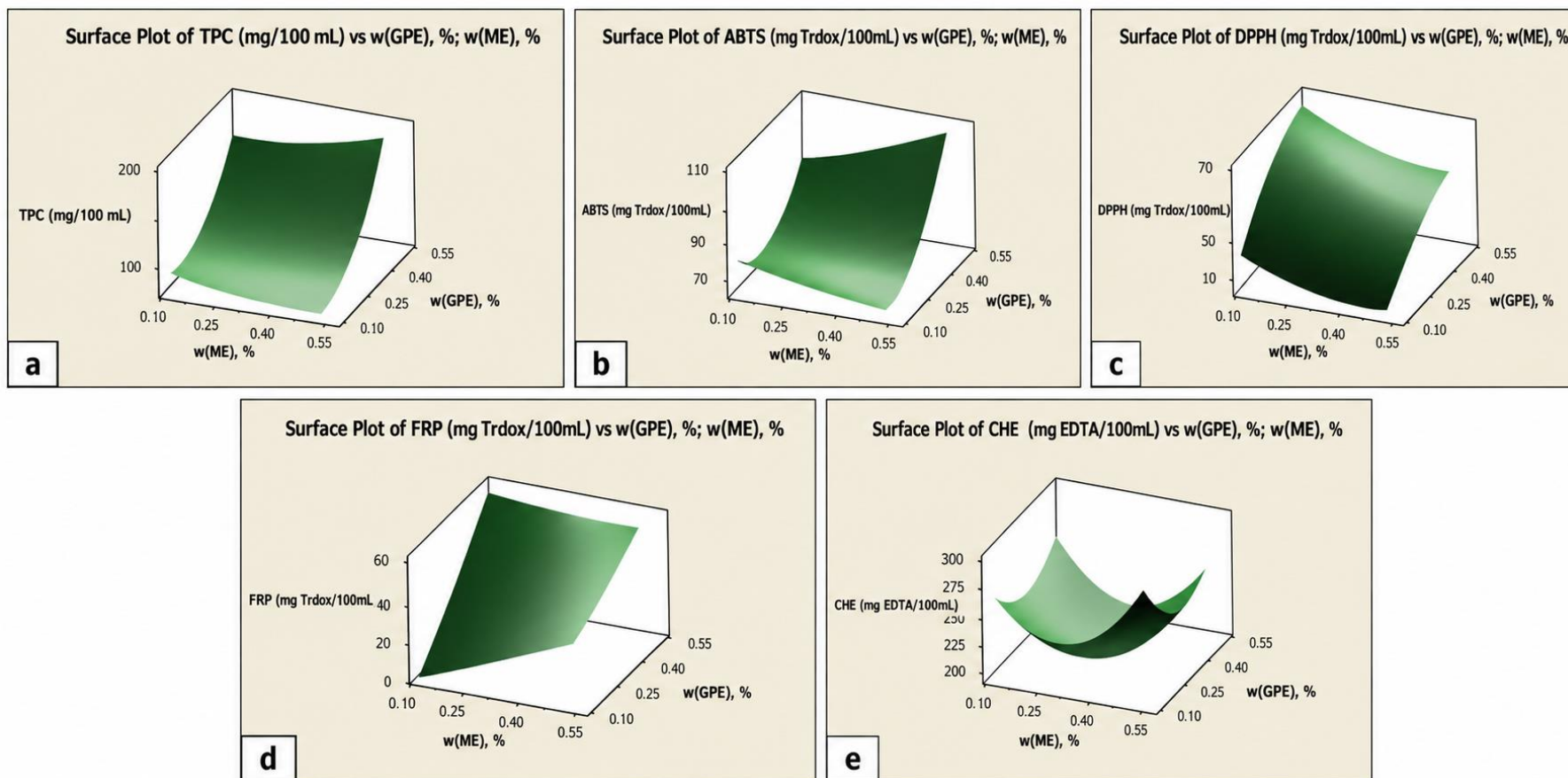
Podaci navedeni u Tabeli S4 su korišćeni za procenu uticaja ekstrakta gljiva i semenke grožđa na sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} radikala u pripremljenim smešama. Prikazani podaci ukazuju na to da je sadržaj ekstrakta semenke grožđa jedini statistički značajan faktor koji utiče na odgovor. Koeficijent determinacije bio je $R^2 = 67,47$ %, što ukazuje na umeren nivo korelacije između zavisne promenljive (odgovora) i nezavisnih faktora. Značaj linearne regresije potvrđen je analizom varijanse uz vrednost $p \leq 0,05$. Na osnovu grafičkog prikaza površine odgovora (Slika 4.5b), uočava se jasan linerani porast antioksidativne aktivnosti sa povećanjem udela ekstrakta semenke grožđa pripremljene smeše. Iako kvadratni član za $w(\text{GPE})$ nije imao statistički značajan uticaj na zavisnu promenljivu, njegova p -vrednost blizu praga značajnosti od 0,05 ukazuje na prisustvo blage zakrivljenosti površine odgovora, što je jasno uočljivo na dijagramu prikazanom na slici 4.5b.

U Tabeli S5 sumirani su rezultati za procenjene regresione koeficijente i analizu varijanse određivanja antioksidativnih svojstava formulacije mikroinkapsulata DPPH[•] testom. Slično kao kod TPC i ABTS^{•+}, antioksidativna aktivnost analizirana DPPH[•] testom je bila pod značajnim uticajem linearnog člana sadržaja GPE. Koeficijent determinacije ($R^2 = 78,74$ %) ukazuje na visok stepen korelacije između zavisne promenljive (odgovora) i nezavisnih faktora, kao i analiza varijanse na statistički značaj linearne regresije ($p = 0,005$). Prisustvo linearne regresije je takođe primećeno na grafičkom prikazu odgovora površina predstavljenom na slici 4.5c. Antioksidativna aktivnost DPPH[•] linearno je

rasla sa povećanjem sadržaja ekstrakta semenke grožđa $w(\text{GPE})$ i dostiže maksimum pri $w(\text{GPE}) = 0,50 \text{ \% (m/m)}$. U slučaju gljive, iz dijagrama odgovora je evidentno da se sa povećanjem sadržaja ekstrakta gljive smanjuje antioksidativna aktivnost, određena DPPH[•] testom.

Uticaj analiziranih parametara na antioksidativnu aktivnost ispitivanu FRP testom procenjen je na osnovu odgovarajućih p -vrednosti (Tabela S6). Dobijeni koeficijent determinacije ($R^2 = 57,29 \text{ \%}$) ukazuje na nizak nivo korelacije što sugeriše da model ima ograničenu prediktivnu sposobnost za ovaj odgovor. Pored toga, neinterpolisani rezultati su statički značajni ($p \leq 0,05$), što dodatno potvrđuje da model ne opisuje adekvatno eksperimentalne podatke. Uprkos tome, linearni član GPE pokazao je statistički značajan efekat na FRP. Dijagram odgovora površina (Slika 4.5d) pokazao je uticaj sadržaja ME i GPE na tendenciju FRP. Iz ovog dijagrama se može videti da antioksidativna aktivnost u slučaju FRP testa raste sa povećanjem sadržaja GPE, pri čemu je najveća antioksidativna aktivnost zabeležena na maksimalnom ispitivanom nivou ovog faktora.

Procenjeni koeficijenti regresije i rezultati analize varijanse predstavljeni u Tabeli S7, pokazale su da ne postoji korelacija između sposobnosti heliranja (CHE) i ispitivanih parametara. Nijedan od analiziranih članova nije imao statistički značajan uticaj. Shodno tome, nije primećena značajna korelacija između odgovora i nezavisnih promenljivih. Najniža sposobnost heliranja, kao što je prikazano na dijagramu odgovora površine (Slika 4.5e), zabeležena je kod smeša pripremljenih sa srednjim ispitivanim sadržajem oba ekstrakta, iako se ovaj trend ne može smatrati statistički pouzdanim zbog nedostatka značajnih članova modela.



Slika 4.5. Dijagram odgovora površine za: (a) ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (TPC); (b) sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} radikala; (c) sposobnost sakupljanja DPPH[•] radikala; (d) Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona (FRP); i (e) Sposobnost heliranja Fe²⁺ jona (CHE).

4.4.1 Multiparametarska optimizacija – funkcija poželjnosti

Optimizacija procesa i/ili proizvoda u prehrambenoj industriji obično obuhvata više karakteristika, odnosno svojstava koji moraju biti zadovoljeni istovremeno prema uspostavljenim kriterijumima. Za optimizaciju više odgovora nekog sistema koriste se multiparametarske analize, a jedna od njih je funkcija poželjnosti. Statistički principi funkcije poželjnosti primenjeni su u cilju dobijanja formulacije mikroinkapsulata, koji je optimizovan uzimajući u obzir rezultate centralnog kompozitnog dizajna. Optimizovana formulacija mikroinkapsulata je potom liofilisana, analizirana i korišćena za pripremu dehidratisanih supa.

Na osnovu centralnog kompozitnog dizajna, tri zavisno promenljive (TPC, ABTS⁺⁺ i DPPH^{*}) odabrane su za istovremenu optimizaciju korišćenjem pristupa funkcije poželjnosti. Pošto je utvrđen nizak stepen korelacije između FRP, odnosno i CHE i ispitivanih parametara, ovi odgovori sistema nisu uzeti u razmatranje. Funkcija poželjnosti je primenjena za određivanje optimalnih nivoa ispitivanih faktora koji istovremeno zadovoljavaju višestruke kriterijume odgovora (Lučić et al., 2023). Regresione jednačine, zajedno sa odgovarajućim koeficijentima korelacije, optimizovanih svojstava formulacija mikroinkapsulata sumirani su u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Polinomske jednačine drugog reda i koeficijent regresije promenljive odgovora

Odgovor	Jednačina regresije	R ² (%)
TPC (mg GAE/100 mL)	$y = 57.18 + 19.48 \cdot w(\text{GPE}) + \varepsilon$	69.93
ABTS ⁺⁺ (mg Trolox/100 mL)	$y = 70.98 + 12.12 \cdot w(\text{GPE}) + \varepsilon$	67.47
DPPH [*] (mg Trolox/100 mL)	$y = 55.92 + 12.95 \cdot w(\text{GPE}) + \varepsilon$	78.74

Skraćenice: ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja - TPC; sposobnost sakupljanja ABTS⁺⁺ radikala- ABTS⁺⁺; sposobnost sakupljanja DPPH^{*} radikala - DPPH^{*}.

Funkcija poželjnosti ima dva koraka: (1) transformaciju svakog pojedinačnog odgovora u pojedinačnu funkciju poželjnosti (d_i) koja se kreće od 0 do 1 ($d_i = 0$ nepoželjan odgovor; $d_i = 1$ poželjan odgovor) i (2) izračunavanje ukupne poželjnosti (D) uzimanjem geometrijskog proseka svih pojedinačnih vrednosti poželjnosti (Vera Candiotti et al., 2014).

Da bi se izračunala ukupna poželjnost, najpre je definisana važnost za svaki od tri razmatrana odgovora (TPC, ABTS⁺⁺ i DPPH^{*}). Svakom odgovoru je dodeljena vrednost važnosti jednaka jedinici, što znači da su svi odgovori smatrani jednako važnim u proračunu ukupne funkcije poželjnosti.

Nakon toga, pojedinačnim odgovorima je definisan relativni značaj, pri čemu je za sva tri razmatrana svojstva formulacije mikroinkapsulata iznosio jedan. Važnost faktora i njegov relativni značaj koji se dodeljuju svakom razmatranom odgovoru, određuju koliko je važno da vrednost d_i bude blizu maksimuma odnosno minimuma. Za TPC i sposobnost sakupljanja ABTS⁺⁺ radikala cilj je bio da odgovor ima što višu vrednost, budući da više vrednosti ukazuju na poboljšana antioksidativna svojstva. Nasuprot tome, za sposobnost sakupljanja DPPH^{*} radikala cilj je bio niža vrednost odgovora, sa ciljem postizanja najveće moguće ukupne poželjnosti sistema. Postupak optimizacije bio je usmeren na pronalaženje uravnoteženog kompromisa između svih analiziranih odgovora, a ne na pojedinačnu maksimizaciju svakog od njih (Akteke-Öztürk et al., 2025). Veći ponder dodeljen je

odgovorima TPC i sposobnosti skupljanja ABTS^{•+} radikala, pri čemu je ABTS^{•+} metoda smatrana pogodnijom za procenu antioksidativnog kapaciteta kompleksnih prehrambenih matriksa koji sadrže i hidrofilna i lipofilna jedinjenja (Gülçin, 2012). Ciljna, najniža i najviša vrednost za proračun pojedinačnih i ukupne funkcije poželjnosti svakog odgovora izabrane su na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata (videti Tabelu 4.7.). Ukupna poželjnost je izračunata kao geometrijska sredina pojedinačnih funkcija poželjnosti. Konačno, prinos je izračunat kao odnos eksperimentalno određene i predviđene vrednosti.

Tabela 4.7. Skup podataka za ukupnu optimizaciju

Odgovor	Vrednost	Niža	Ciljna	Viša
TPC	Maksimum	73	99	99
ABTS ^{•+}	Maksimum	78	109	109
DPPH [•]	Minimum	65	65	74

Skraćenice: ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja - TPC; sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} radikala- ABTS^{•+}; sposobnost sakupljanja DPPH[•] radikala - DPPH[•].

Prema utvrđenom skupu podataka, ukupna poželjnost dobijena za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata bila je $D = 0,9377$ što odgovara smeši koja sadrži 0,50 % (*m/m*) ekstrakta gljive i 0,50 % (*m/m*) ekstrakta semenke grožđa. Predviđene i eksperimentalno dobijene vrednosti odgovora prikazane su u Tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Predviđeni i eksperimentalni rezultati analiziranih odgovora

Odgovor	Individualna poželjnost	Predviđena vrednost	Dobijena vrednost	Prinos, %
TPC (mg GAE/100 mL)	0,852107	95,15	118,6	125
ABTS ^{•+} (mg Trolox/100 mL)	0,967743	108,0	62,78	58
DPPH [•] (mg Trolox/100 mL)	1,000000	59,90	129,0	215

Skraćenice: ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja - TPC; sposobnost sakupljanja ABTS^{•+} radikala- ABTS^{•+}; sposobnost sakupljanja DPPH[•] radikala - DPPH[•].

Primećeno je relativno dobro slaganje između eksperimentalnih i predviđenih vrednosti za ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja. Međutim, zabeležena su značajna odstupanja za antioksidativnu aktivnost merenu ABTS^{•+} i DPPH[•] testovima. Konkretno, eksperimentalna vrednost za DPPH[•] test bila je značajno viša u poređenju sa predviđenom vrednošću, dok je za ABTS^{•+} test zabeležena niža eksperimentalna vrednost od predviđene. Takva odstupanja između predviđenih i eksperimentalnih vrednosti nisu neuobičajena u metodologiji odgovora površina kada regresioni modeli pokazuju umerene koeficijente determinacije. U ovom istraživanju dobijene R^2 vrednosti su se kretale od 67,47 do 78,74 %, što ukazuje da modeli adekvatno opisuju opšte trendove odgovora, ali poseduju ograničenu prediktivnu tačnost za procenu optimalnih vrednosti. Slična odstupanja između predviđenih i eksperimentalnih odgovora su prijavljena u nekoliko RSM studija optimizacije koje se bave fenolnim jedinjenjima i antioksidativnom aktivnošću (Milinčić et al., 2025b; Sady et al., 2019). Sady et al. (2019) su izvestili da se odstupanja koja prelaze 30-40 % mogu javiti kada se validacija modela vrši blizu ili izvan granica eksperimentalnog prostora dizajna. Pored toga, Milinčić et al. (2025b) su primetili neslaganja između predviđenih i eksperimentalnih odgovora antioksidanata, pripisujući ih razlikama u mehanizmima ispitivanja i složenosti matrica hrane. Štaviše, polinomski modeli dobijeni u ovom istraživanju bili su pretežno linearni, što ukazuje na to da su površine odgovora uglavnom određene koncentracijom ekstrakta semenke grožđa. Takvi modeli možda ne

obuhvataju u potpunosti potencijalnu zakrivljenost ili efekte interakcije, što može doprineti odstupanjima između predviđenih i eksperimentalnih vrednosti tokom validacije. Međutim, CCD je uspešno primenjen za optimizaciju formulacije mikroinkapsulata na bazi kozjeg mleka obogaćenog ekstraktom gljive, što je rezultiralo poboljšanim sadržajem fenolnih jedinjenja i antioksidativnom aktivnošću (Milinčić et al., 2025b). Ebrahimi et al. (2025) primenili su CCD za optimizaciju uslova ultrazvučne ekstrakcije polifenola iz listova šećerne repe, čime je dobijen ekstrakt sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja i poboljšanom antioksidativnom aktivnošću. Rezultati ove studije takođe potvrđuje primenljivost CCD pristupa u formulaciji funkcionalnog mikroinkapsulata na bazi proteina kozjeg mleka koji je obogaćen ekstraktom gljive i semenke grožđa, koji sadrže bioaktivna jedinjenja koja doprinose povećanom sadržaju fenolnih jedinjenja i poboljšanim antioksidativnim svojstvima.

4.5 Fizičko-hemijska karakterizacija optimizovane formulacije mikroinkapsulata

4.5.1 Ukupan sadržaj glukana

Rezultati ukupnog sadržaja glukana u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata su prikazani u Tabeli 4.9. Ukupan sadržaj glukana je bio $25,43 \pm 0,18$ % (w/w), dok je pojedinačni sadržaj α - i β -glukana bio redom $1,85 \pm 0,08$ % (w/w) i $23,58 \pm 0,09$ % (w/w). U nedavno objavljenoj studiji, formulacija ME/M (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko obogaćeno ekstraktom gljive) sadržao je 26,62 % ukupnih glukana, 1,94 % α -glukana, i 24,67 % β -glukana (Milinčić et al., 2025b). Kao što se i očekivalo, u kontrolnom uzorku (TM) nisu detektovani glukani, što potvrđuje da inkorporacija ekstrakta gljive primarno doprinosi sadržaju glukana u formulaciji mikroinkapsulata.

Tabela 4.9. Sadržaj glukana u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata (TM/ME/GPE) (% w/w)

Uzorak	Analit	(% w/w)
TM/ME/GPE	Ukupni glukani	$25,43 \pm 0,18$
	α -glukan	$1,85 \pm 0,08$
	β -glukan	$23,58 \pm 0,09$

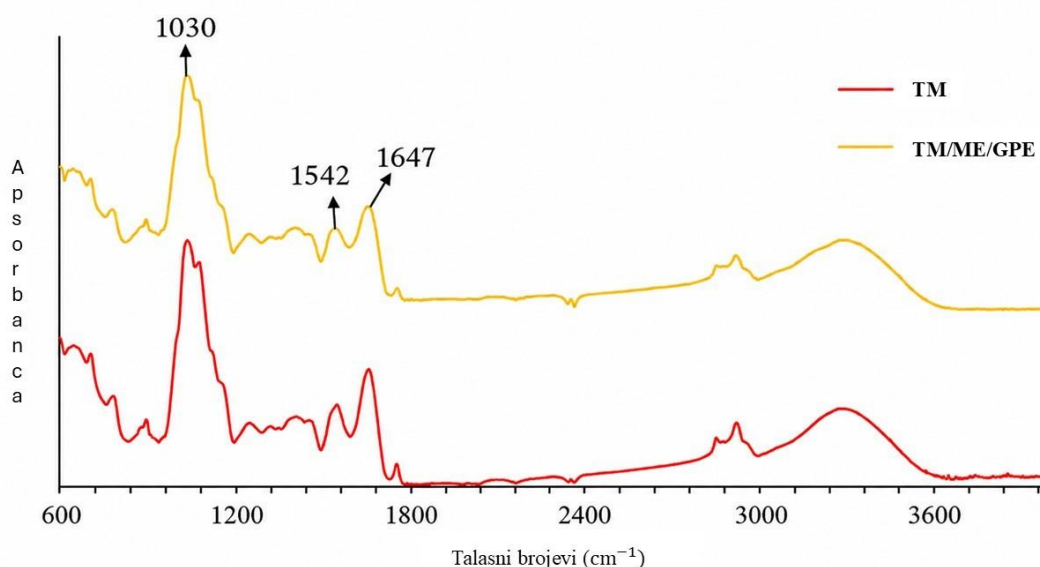
4.5.2 ATR-FTIR analiza optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Uzorci su analizirani ATR-FTIR spektroskopijom kako bi se utvrdile potencijalne promene u hemijskom sastavu koje nastaju usled hemijskih interakcija između bioaktivnih jedinjenja iz ekstrakata gljive i semenke grožđa i proteina mleka, kao i da bi se procenila strukturna stabilnost dobijene formulacije mikroinkapsulata. Kao što se može videti (Slika 4.6), ATR-FTIR spektri optimizovane formulacije mikroinkapsulata veoma su slični kontrolnom uzorku mleka (TM), pri čemu dobijeni spektri dominantno pokazuju trake karakteristične za glavne komponente mleka, provenstveno iz laktoze (trake oko 1030 cm^{-1}) i proteinske frakcije (amidne trake I i II na približno 1647 cm^{-1} i 1542 cm^{-1}) (Slika 4.6). Ovo ukazuje da u celom spektru dominira matrika mleka. U celom spektru ispitivane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nisu primećene nove trake koje bi ukazivale na proteolizu proteina ili na prisustvo fenol-protein interakcija.

Međutim, važno je naglasiti da odsustvo novih traka u ATR-FTIR spektrima ne mora nužno ukazivati na odsustvo međumolekulskih interakcija. U kompleksnim višekomponentnim sistemima, kao što su matrice na bazi mleka obogaćene biljnim ekstraktima, signali (trake) komponenti prisutnih u manjim količinama često su maskirani dominantnim trakama proteina i laktoze, posebno u tzv. regionu otiska prsta. Sličan ATR-FTIR spektar primećen je kod kozjeg mleka u prahu obogaćenog ekstraktima

crvenih i crnih godži bobica, sa dominantnim i jasno diferenciranim trakama koje pripadaju komponentama (jedinjenjima) kozjeg mleka (Milinčić et al., 2025a).

Međutim, Popović Minić et al. (2023) su izvestili o interakciji između polisaharida gljiva i proteina mleka, dok su Milinčić et al. (2024a) primetili interakcije između fenolnih jedinjenja iz ekstrakta semenke grožđa i proteina mleka. U oba slučaja ove interakcije su ispitivane kombinacijom spektroskopskih tehnika, uključujući ATR-FTIR i Raman spektroskopiju, zajedno sa naprednom hemometrijskom analizom, što je omogućilo detekciju „suptilnih” strukturnih modifikacija koje nisu bile jasno razrešene samo konvencionalnom ATR-FTIR analizom i nisu bile vidljive na spektru. Takođe treba napomenuti da su ove studije sprovedene korišćenjem modela koji sadrže jednu vrstu ekstrakta, dok ova optimizovana formulacija mikroinkapsulata obuhvata složeniji matriks koji uključuje ekstrakte gljive i semenke grožđa ugrađene u mleko. Uzimajući ovo u obzir, jasno je da je ova formulacija kompleksna što može dodatno doprineti preklapanju spektralnih traka i smanjenoj detektabilnosti interakcija korišćenjem ATR-FTIR spektroskopije. Stoga, odsustvo izraženih spektralnih promena u ovom istraživanju može se pripisati kombinaciji nekoliko različitih faktora, koji uključuju višekomponentnu prirodu sistema, relativni udeo dodatih ekstrakata i ograničenja ATR-FTIR spektroskopije u uočavanju „suptilnih” (fina pomeranja traka) molekularnih interakcija pod primenjenim uslovima analize. Stoga, da bi se temeljnije procenio efekat dodatih ekstrakata gljive i semenke grožđa u matrici mleka, neophodna je dodatna statistička analiza ATR-FTIR spektra koja bi uključila dekonvoluciju odabranih ATR-FTIR regiona. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da pripremljena formulacija mikroinkapsulata doprinosi formiranju homogenog i strukturno stabilnog praha.

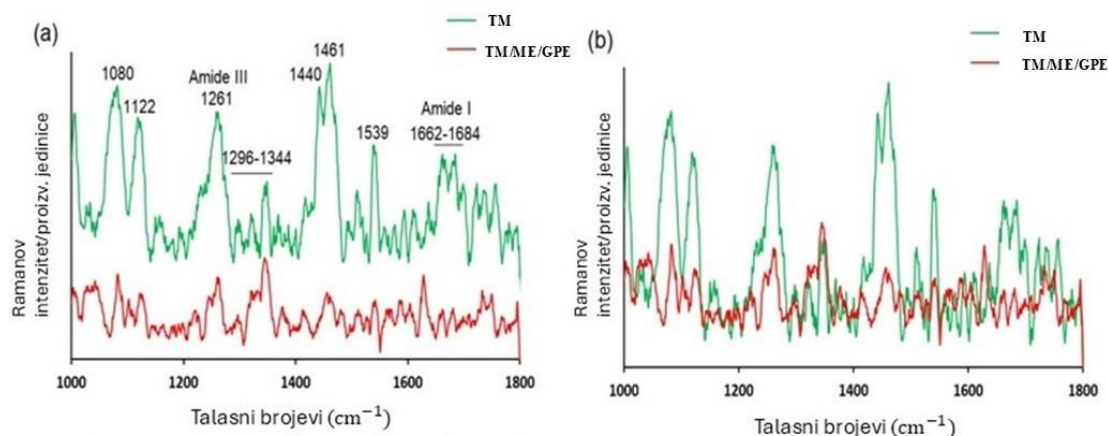


Slika 4.6. ATR-FTIR spektri optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) i kontrolnog mleka u prahu (TM) (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko).

4.5.3 Raman spektroskopija optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Raman spektri su prvenstveno snimani u spektralnom opsegu od 240-1800 cm^{-1} , međutim poseban fokus je bio na spektralnom regionu od 1000-1800 cm^{-1} , koji se odlikuje karakterističnim trakama koje se mogu pripisati proteinima. Ramanova spektroskopija predstavlja vibracionu tehniku koja pruža informacije o molekularnoj strukturi na osnovu vibracija baziranih na polarizaciji molekula, pri

čemu su položaj, oblik i intenzitet Raman traka povezani sa hemijskom strukturom i međumolekulskim interakcijama (Niaura, 2006). Raman karakterizacija optimizovane formulacije mikroinkapsulata je rađena kao svojevrsna potvrda rezultata dobijenih ATR-FTIR analizom. Primena Ramanove spektroskopije za karakterizaciju mlečnih proizvoda dobro je istražena u literaturi, pri čemu je pokazano da se ovom tehnikom mogu pratiti različite komponente mleka, kao i promene u proteinskoj strukturi nastale usled termičke obrade ili interakcija sa drugim komponentama (McGoverin et al., 2010; Almeida et al., 2011; Silva et al., 2021). Na priloženim Ramanovim spektrima se može primetiti sličnost između obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka i optimizovane formulacije mikroinkapsulata. Međutim kao što se može videti u Slici S1, Raman daje slab intenzitet traka u proteinskom regionu, što je u skladu sa primenom ove vibracione tehnike. Sa druge strane, oba ekstrakta (GPE i ME) pokazuju veliki broj intenzivnih traka i šumova, što može biti posledica fluorescencije prilikom ekscitacije na 785 nm. Pojava fluorescencije može se pripisati prisustvu specifičnih komponenti u ovim uzorcima. Iz navedenih razloga, ekstrakt semenke i gljive nisu dalje razmatrani, već je posebna pažnja posvećena spektrima mleka i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (Slika 4.7.a,b).

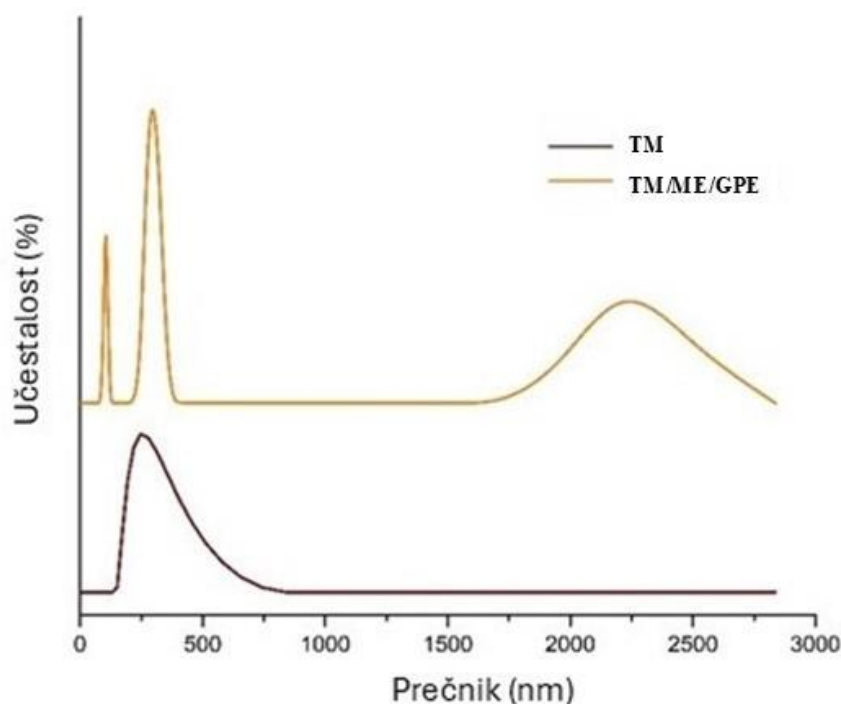


Slika 4.7. Vizuelni prikaz Ramanovih spektara optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) i kontrolnog mleka u prahu (TM) (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko) (a); preklapljeni Ramanovi spektri koji jasnije ukazuju na sličnosti među ovim uzorcima (b).

Spektar uzoraka mleka pokazuje nekoliko specifičnih traka 1080 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 1261 cm^{-1} , $1296\text{--}1344\text{ cm}^{-1}$, 1440 cm^{-1} , 1461 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} , $1662\text{--}1684\text{ cm}^{-1}$, koje odgovaraju amid regionima i vibracijama amino-kiselinskih ostataka (Slika 4.7.a). Nickless & Holroyd (2020) navode da se Amid I region nalazi u regionu od $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$, dok se Amid III region nalazi u regionu spektra od $1235\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$, pri čemu ove trake pružaju informacije o proteinskoj strukturi i konformaciji. Autori su pokazali da se Ramanovom mikroskopijom mogu razlikovati kazeinska i serum proteinska matrica u kompleksnom mlečnom sistemu, upravo na osnovu razlika u Amid I i Amid III regionima. Milinčić et al. (2024a) su u Ramanovim spektrima termički tretiranog kozjeg mleka i mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa identifikovali su pomeranja u Amid I regionu, posebno u području $1612\text{--}1644\text{ cm}^{-1}$, što se može povezati sa izmenjenim vibracijama aminokiselinskih ostataka usled njihove interakcije sa fenolima iz semenke grožđa (flavan-3-olima). Preklapljeni spektri (Slika 4.7.b) jasno ukazuju na sličnost među ovim uzorcima (TM i TM/ME/GPE), i dominantne trake u uzorku optimizovane formulacije mikroinkapsulata koje se mogu pripisati proteinima mleka. Ovi spektri su u saglasnosti sa spektrima koje su prijavili Milinčić et al. (2024a), za isti tip matriksa, odnosno termički tretirano kozje mleko obogaćeno ekstraktom semenke grožđa.

4.5.4 Merenja dinamičkog rasejanja svetlosti – DLS

Iako ATR-FTIR spektroskopija pruža vredne informacije o ukupnom hemijskom „otisku prsta” optimizovane formulacije mikroinkapsulata, ova tehnika ima inherentna ograničenja kada je u pitanju rešavanje „suptilnih” (finskih) strukturnih i konformacionih promena u složenim matricama hrane. Široke i međusobno preklapajuće trake u amidnim i ugljenohidratnim regionima, zajedno sa relativno niskim udelom dodatih ekstrakata u odnosu na dominantnu mlečnu matricu, mogu maskirati fine spektralne razlike povezane sa protein-polifenol interakcijama, delimičnom proteolizom ili promenama u složenom sistemu hrane (Lia et al., 2025; Francis et al., 2025). Zbog toga je ATR-FTIR rezultate najpouzdanije tumačiti u kombinaciji sa komplementarnim fizičko-hemijskim metodama koje mogu direktno ispitati raspodelu veličina čestica i profil proteina (Milinčić et al., 2025b; Popović Minić et al., 2023; Falsafi et al., 2025). DLS analiza kontrole (TM) pokazala je unimodalnu raspodelu veličina čestica, sa prečnikom čestica u opsegu od 276,70 do 316,70 nm (srednja vrednost: $294,40 \pm 16,90$ nm) i indeksom polidisperzije (PI) ispod 0,3 (Slika 4.8), što ukazuje na relativno homogenu disperziju čestica (prvenstveno kazeinskih micela). Ovaj rezultat je u skladu sa literaturnim podacima za praškaste formulacije termički tretiranog mleka, gde kazeinske micelle uglavnom ostaju ujednačene veličine (Popović Minić et al., 2023; Milinčić et al., 2024a).



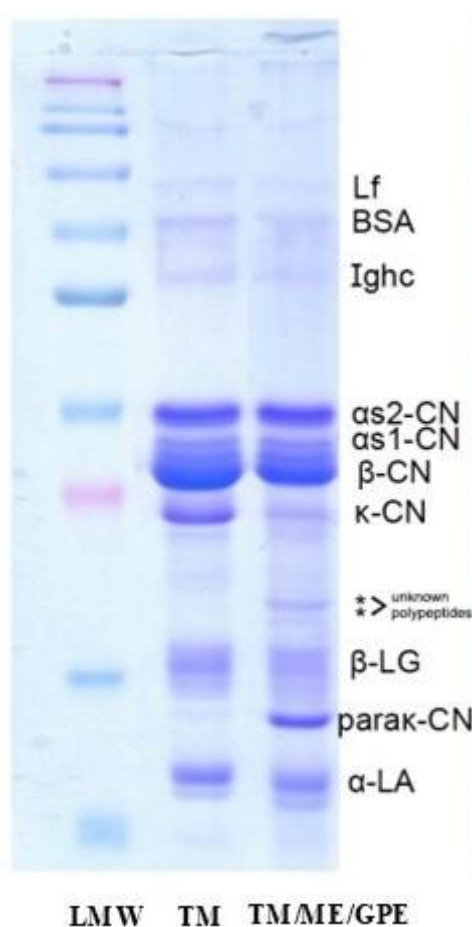
Slika 4.8. Distribucija veličine čestica optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) i kontrolnog mleka u prahu (TM) (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko).

Nasuprot tome, optimizovana formulacija mikroinkapsulata pokazala je polimodalnu raspodelu veličina čestica, sa pikovima oko ~40 nm, ~134 nm, ~218 nm, ~247 nm, ~650 nm i ~2,2 μ m, što ukazuje na prisustvo čestica različitih veličina i složeniju koloidnu organizaciju. Ova formulacija je heterogena, i stoga istovremeno sadrži veoma male nanočestice i znatno veće agregate. DLS analiza otkriva da dodatak ME i GPE u mleko menja raspodelu veličine koloidnih čestica u formulaciji mikroinkapsulata, što je u skladu sa novijim literaturnim nalazima. Uočena polimodalna raspodela može biti posledica narušene strukture proteina, agregacije proteina sa polifenolima i interakcija polisaharida sa proteinima, o čemu su sugerisale neke predhodne studije (Milinčić et al., 2025b; Popović Minić et al., 2023; Chen et al., 2022; Ma et al., 2024). Prisustvo GPE (bogatog polifenolima),

može doprineti formiranju većih agregata, verovatno zbog interakcija između proteina i polifenolnih jedinjenja (Ma et al., 2024). Pored toga, komponente poreklom iz gljive, uključujući proteolitičke enzime i β -glukane, mogu uticati na modifikaciju proteina i formiranje međumolekulskih interakcija, što za posledicu ima širu (neravnomernu) distribuciju veličine čestica (Milinčić et al., 2025b).

4.5.5 Elektroforetska analiza optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Proteinski profili optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog uzorka analizirani su primenom SDS-PAGE u redukujućim uslovima (Slika 4.9). Identifikacija proteina izvršena je korišćenjem standardnih kazeina goveđeg mleka, kao i na osnovu prethodno publikovanih literaturnih podataka za uzorke kozjeg mleka (Pešić et al., 2012; Milinčić et al., 2021b; Popović Minić et al., 2023).



Slika 4.9. Elektroforetski profili TM/ME/GPE - optimizovane formulacije mikroinkapsulata (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) i kontrolnog praha (TM) (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko), analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE). Standard goveđeg kazeina (ST-BCN). Skraćenice: laktoferin (Lf); goveđi serum albumin (BSA); Imunoglobulini (IgGc); α ₂-kazein (α ₂-CN); α ₁-kazein (α ₁-CN); β -kazein (β -CN); κ -kazein (κ -CN); β -laktoglobulin (β -LG); parak-kazein (parak-CN); α -laktalbumin (α -LA). *polipeptidi male molekulske težine; LMW (*low molecular weight*) – standard molekulskih masa.

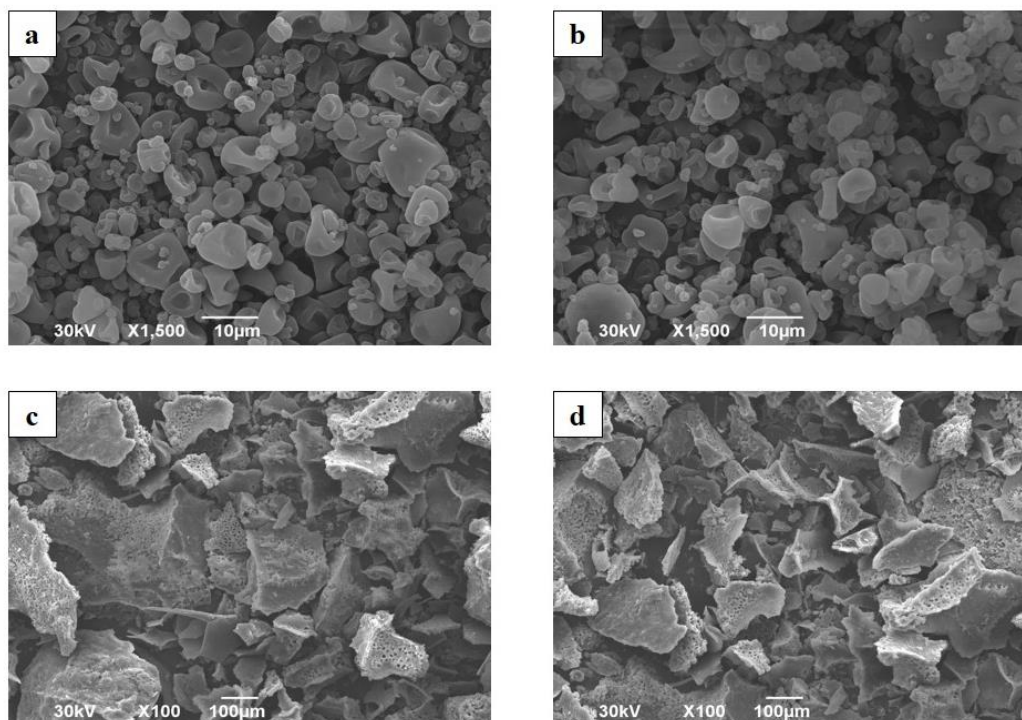
Kao što se može videti, na elektroforetskom profilu kontrolnog uzorka TM uočavaju se dobro poznate trake proteina kozjeg mleka, koje odgovaraju kazeinima i serum proteinima. Nasuprot tome, na profilu optimizovane formulacije mikroinkapsulata prisutne su uobičajene proteinske trake (kazeini i serum proteini), para- κ -kazein ali i dve nove polipeptidne trake (označene sa *, Slika 4.9., profil

TM/ME/GPE). Ove nekarakteristične polipeptidne trake nisu detektovane u kontrolnom TM uzorku, ali imaju isti elektroforetski put kao trake detektovane u nedavnoj studiji na M/ME (termički tretirano mleko obogaćeno ekstraktima gljive) elektroforegramu (Milinčić et al., 2025b). Dakle, SDS-PAGE analiza je otkrila primetne promene u proteinskom profilu optimizovane formulacije mikroinkapsulata u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Polipeptidni sastav dominantnih proteina optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog praha (TM) prikazan je u Tabeli S8. Pojava para- κ -kazeina i traka niže molekulske mase i smanjen intenzitet traka veće molekulske mase (β -kazein, κ -kazein i α s₁-kazein) ukazuje na pojavu delimične hidrolize proteina, posebno κ -kazeina što je potvrđeno denzitometrijom (Slika S2). Uočeni proteinski profili mogu biti povezani sa proteolitičkom aktivnošću koja je ranije prijavljena za jestive gljive (Popović Minić et al., 2023), iako su i drugi mehanizmi, uključujući interakcije proteina i polifenola, mogli doprineti uočenim promenama.

S druge strane, Milinčić et al. (2021b) sugerišu da se intenzitet traka kazeina i serum proteina koje su analizirane u redukujućim SDS-PAGE uslovima, smanjuje se sa povećanjem udela ekstrakta semenke grožđa. Ovaj efekat je pripisan interakcijama između polifenola i proteina mleka, čime je smanjena količina proteina detektovanih na gelu. Slične protein-polifenol interakcije su prijavili Mudgil et al. (2025), koji su posmatrali promene u intenzitetu SDS-PAGE traka, nastale usled formiranja kompleksa između polifenola iz semenki urme sa proteinima kamiljeg mleka. Lima et al. (2025) su izvestili da fenolna jedinjenja mogu modulisati proteolizu interakcijom sa mlečnim proteinima ili enzimima, čime utiču na razgradnju kazeina. U drugom istraživanju, Wang et al. (2022) su otkrili da enzim (nova cistein peptidaza) iz *Moringa oleifera* pokazuje preferencije za razlaganje κ -kazeina, što rezultira stvaranjem peptida niže molekulske mase koji se mogu detektovati SDS-PAGE elektroforezom.

4.5.6 SEM mikroskopija optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) je pokazala morfološke karakteristike kontrolnog uzorka mleka (kontrolni TM uzorak) i liofilisane optimizovane formulacije mikroinkapsulata dobijenih postupkom sprej-sušenja (Slika 4.10). Kao što se može videti na SEM slikama kontrolnog uzorka TM (Slika 4.10.a,b) čestice imaju skupljen oblik, suhu strukturu karakterističnu za sprej-osušen prah mleka (Milinčić et al., 2024a; Kalušević et al., 2017; Deshwal et al., 2020). Pored toga, miclele ovog uzorka su nepravilnog oblika, dok su manje čestice raspoređene po njegovoj površini, što ukazuje na termičku obradu i prisustvo WP/CN kompleksa. Nasuprot tome, čestice optimizovane formulacije mikroinkapsulata imaju drugačiju, nepravilnu strukturu nalik hrapavim, iskidanim pahuljicama ili razbijenom poroznom staklu (Slika 4.10.c,d) (Deshwal et al., 2020). Ove iskidane pahuljice imaju „grubu” površinu sa vidljivim sitnim šupljinama u strukturi (poput saća) (Slika 4.10.c,d), koje su verovatno nastale kao posledica sublimacije kristala leda (Milinčić et al., 2025b; Popović Minić et al., 2023) ili mogu biti povezane i sa strukturnim modifikacijama proteina, što je utvrđeno elektroforetskom analizom (Slika 4.9. profil TM/ME/GPE). Čestice koje bi se mogle pripisati ekstraktu semenki grožđa nisu jasno vidljive na slikama 4.10.c,d.



Slika 4.10. SEM slike sprej sušenog termički tretiranog kozjeg mleka (kontrolni TM uzorak) (a,b) i liofilisane optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) (c,d).

4.5.7 UHPLC-Q-ToF-MS analiza ekstrakata optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Neciljana („*untargeted*“) UHPLC Q-ToF MS analiza je primenjena da bi se identifikovala bioaktivna jedinjenja dobijena iz semenke grožđa i gljive prisutna u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata (Tabela 4.10). U ovom slučaju, identifikovana su sva bioaktivna jedinjenja ekstrahovana iz optimizovane formulacije mikroinkapsulata, uključujući slobodna bioaktivna jedinjenja i fenolna jedinjenja slabo vezana za površinu kazeinske micele (Milinčić et al., 2021b). Ukupno je identifikovano 44 jedinjenja, uključujući fenolne kiseline (16 jedinjenja), flavonoide (24 jedinjenja), amino-kiseline i masne kiseline (4 jedinjenja). Sva okvirno identifikovana fenolna jedinjenja najverovatnije potiču iz semenke grožđa (Pešić et al., 2019; Šuković et al., 2020; Milinčić et al., 2021a; Delić et al., 2025), dok su detektovane masne kiseline i fenilalanin karakteristične komponente poreklom iz gljive (Pellegrino et al., 2022; Angeloni et al., 2025).

Hidroksibenzojeva kiselina (**1**) i dihidroksibenzojeva kiselina (**2**) takođe su detektovane, međutim njihovo prisustvo u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata takođe može poticati iz ekstrakta gljive, s obzirom na to da su ova jedinjenja prethodno prijavljena u ekstraktima *A. aegerita* (Tabela 4.3.). Pošto su fenolna jedinjenja najčešće detektovana, ona su kvantifikovana ili semikvantifikovana korišćenjem dostupnih standarda kako bi se dodatno odredio njihov pojedinačni i ukupni sadržaj u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata (Tabela 4.10).

Fenolne kiseline su bile najzastupljenija klasa jedinjenja, sa ukupnim sadržajem od 153,32 µg/g liofilizovanog praha (LP), nakon čega su sledili procijanidini (37,99 µg/g LP) i flavan-3-oli (23,50 µg/g LP), dok su ostala detektovana fenolna jedinjenja uglavnom bila prisutna u tragovima (<LOQ). Među identifikovanim fenolnim kiselinama, galna kiselina (**3**) i njeni derivati bili su najbrojniji, pri čemu su pretežno identifikovani u obliku glikozida (**9**, **10**, **13** i **14**), estara sa šikiminskom kiselinom (**8**) i metil/etil derivata (**4** i **5**). Ova jedinjenja karakterišu jedinstvene monoizotopske mase i

zajednički fragmenti koji potiču od galne kiseline, kao što su fragmenti na 169 m/z (Y_0^- jon; deprotonovana galna kiselina), 168 m/z (radikal-anjon, $[Y_0-H]^-$) i 125/124 m/z ($-CO_2$). Takođe su detektovani elaginska kiselina (dimerni derivat galne kiseline; **6**) kao i njeni konjugati, među kojima su galoil-HHPD-heksoza (**16**) i pentozid elaginske kiseline (**12**). Ključni fragmenti za identifikaciju galoil-HHPD-heksoze dobijeni su sekvencijalnim gubitkom galoil dela i heksozil jedinice [m/z 633 $\rightarrow$ 463 m/z [$-Gal$; $-H_2O$] $\rightarrow$ 301 m/z [$-Hex$]]. Pored toga, prisustvo galne i elaginske kiseline dodatno je potvrđeno direktnim poređenjem sa dostupnim standardima. Jedinjenja **7** i **15** su redom identifikovana kao vanilozid i dikafeoilhinska kiselina, ali su bila prisutna samo u tragovima. Kvantifikacija pojedinačnih fenolnih kiselina pokazala je najveći sadržaj etil-galata (54,05 μg GA/ g LP) i galne kiseline (47,78 $\mu g/g$ LP), nakon čega su sledile dihidroksibenzoeva kiselina (19,24 μg GA/ g LP) i elaginska kiselina (11,70 $\mu g/g$ LP).

Flavan-3-oli i procijanidini predstavljaju tipična jedinjenja poreklom iz semenki grožđa, što objašnjava njihovo prisustvo u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata. Među monomernim flavan-3-olima, katehin je bio dominantan (13,36 $\mu g/g$ LP), nakon čega su sledili epikatehin (5,08 $\mu g/g$ LP) i katehin-3-*O*-galat (5,07 μg CA/g LP). Jedinjenje **19** identifikovano je kao (epi)katehin-3-*O*-kumarat, sa glavnim fragmentom na 341 m/z , nastalim heterolitičkim cepanjem dela molekula koji potiče od kumarinske kiseline (Šuković et al., 2020); međutim, ovo jedinjenje bilo je prisutno samo u tragovima. Procijanidini su identifikovani na osnovu karakterističnih fragmenata nastalih fisijom heterocikličnog prstena (gubitka floroglucinolne jedinice, -126 Da), retro-Diels-Alder-ovom fisijom (eliminacija hidroksivinil benzendiol jedinice, -152 Da); kao i cepanjem hinon-metida (cepanje interflavanske veze) (Gu et al., 2003). Najčešće su detektovani dimeri procijanidina B-tipa (**21-23**) i trimeri (**27-29**), pri čemu su najveći sadržaji redom utvrđeni za procijanidin B2 (9,17 $\mu g/g$ LP), i procijanidin C1 (8,11 $\mu g/g$ LP). Jedinjenje **26** identifikovano je kao procijanidin B-tip galat dimer (m/z 729), a njegov sadržaj je bio 8,40 μg BP2/g LP. Ostali identifikovani oligomer derivati uključivali su halkan-flavan-3-ol dimer (**24**) i epikatehin etil dimer (**25**), ali su ova jedinjenja bila prisutna samo u tragovima (<LOQ).

Detektovani aglikoni flavanola (kvercetin, kempferol i izoramnetin) identifikovani su na osnovu karakterističnih fragmenata dobijenih retro-Diels-Alder-ovim cepanjem i neutralnim gubicima (CH_3 , CO , CO_2 , H_2O , C_2H_2O , and C_3O_2). Flavanolni glikozidi uglavnom su identifikovani kao monoheksozidi (**33-37**), pri čemu su nastajali karakteristični fragmenti (deprotonovani aglikoni) usled gubitka heksozil jedinice (-162 Da). Jedinjenje **38** identifikovano je kao kvercetin-3-*O*-(6''-*O*-ramnozil)heksozid, sa glavnim fragmentima na 300 m/z ($[Y_0-H]^-$) i 301 m/z ($[Y_0]^-$), nastalim nakon gubitka ramnozil-heksozil dela (-308 Da). Kvantifikacija je pokazala da su svi detektovani flavonoli bili prisutni u tragovima (<LOQ), osim kvercetin-3-*O*-heksozida, koji je pronađen u niskom sadržaju (0,51 μg KA/g LP).

Resveratrol (**39**) i naringenin (**40**) takođe su identifikovani i potvrđeni poređenjem sa dostupnim standardima, ali su bili prisutni samo u tragovima. Konačno, ukupan sadržaj svih detektovanih fenolnih jedinjenja u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata iznosio je 215,32 $\mu g/g$ LP.

Pored fenolnih jedinjenja, detektovani su fenilalanin i tri hidroksilovane masne kiseline, kao tipični konstituenti gljiva, koji su prethodno pronađeni i prijavljeni u vrstama *A. aegerita* (Tabela 4.3.), *P. ostreatus* (Pellegrino et al., 2022) i/ili *Tuber magnatum* (Angeloni et al., 2025). Fenilalanin je pokazao fragmente na 147 m/z i 103 m/z , nastale sekvencijalnim gubitkom NH_3 (-17 Da) i CO_2 (-44 Da). S druge strane, hidroksilovane masne kiseline pokazale su karakteristične fragmente koji sadrže karboksilatni anjon, generisan α -cepanjem na oksidovanom ugljeniku (Nilsson et al., 2010). Usled nedostatka odgovarajućih specifičnih standarda, ova jedinjenja nisu kvantifikovana.

Tabela 4.10. UHPLC-Q-ToF-MS profil i kvantifikacija/semikvantifikacija fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu optimizovane formulacije mikroinkapsulata (0,5 % GPE, 0,5 % ME, pH = 6,5). Prikazana su (uslovno)identifikovana jedinjenja, očekivano retenciono vreme (RT), molekulska formula, izračunata masa, m/z tačna masa, srednje odstupanje masa (mDa) i MS fragmenti, kao i kvantitativne vrednosti.

Br.	RT	Naziv jedinjenja	Molekulska formula	Izračunata masa	m/z tačna masa	mDa	MS fragmenti (% , glavni fragment)	µg/g LP
Fenolne kiseline i derivati ^a								
1	4,52	Hidroksibenzoeva kiselina	C ₇ H ₅ O ₃ [−]	137,0239	137,0240	-0,09	/	3,95
2	6,25	Dihidroksibenzoeva kiselina	C ₇ H ₅ O ₄ [−]	153,0188	153,0188	-0,05	109,0336(100) ; 108,0244	19,24
3	1,34	Galna kiselina*	C ₇ H ₅ O ₅ [−]	169,0137	169,0145	-0,81	125,0278(100) ; 124,0202	47,78
4	5,86	Metil galat	C ₈ H ₇ O ₅ [−]	183,0293	183,0284	0,93	124,0206(100) ; 125,0243	<LOQ
5	7,42	Etil galat	C ₉ H ₉ O ₅ [−]	197,0450	197,0467	-1,72	124,0205(100) ; 125,0272; 169,0189	54,05
6	7,88	Elaginska kiselina*	C ₁₄ H ₅ O ₈ [−]	300,9984	301,0042	-5,80	301,0071(100) ; 299,9992; 145,0336; 157,0346; 185,0292; 201,0250; 229,0202; 245,0152; 257,0160	11,70
7	4,47	Vanilolozid	C ₁₄ H ₁₉ O ₈ [−]	315,1080	315,1104	-2,39	123,0493(100) ; 153,0603	<LOQ
8	3,36	Galoilšikiminska kiselina	C ₁₄ H ₁₃ O ₉ [−]	325,0560	325,0598	-3,79	125,0273(100) ; 111,0504; 124,0195; 137,0245; 168,0067; 169,0184	<LOQ
9	2,09	Heksozid galne kiseline iz. I	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ [−]	331,0665	331,0712	-4,73	169,0201(100) ; 168,0112; 125,0276; 124,0209	5,58
10	3,13	Heksozid galne kiseline iz. II	C ₁₃ H ₁₅ O ₁₀ [−]	331,0665	331,0728	-6,32	169,0194(100) ; 124,0187; 125,0287	7,58
11	5,99	Heksozid siringinske kiseline	C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀ [−]	359,0978	359,1079	-10,07	197,0514(100) ; 137,0280; 138,0362; 239,0607	<LOD
12	7,61	Pentozid elaginske kiseline	C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂ [−]	433,0407	433,0490	-8,33	299,9967(100) ; 301,0054	3,43
13	5,52	Digaloil heksozid iz. I	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄ [−]	483,0775	483,0861	-8,64	169,0174(100) ; 124,0177; 125,0292, 313,0637; 331,0721	<LOD
14	5,87	Digaloil heksozid iz. II	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₄ [−]	483,0775	483,0863	-8,79	169,0185(100) ; 125,0269; 313,0632; 331,0730	<LOQ
15	8,34	Dikafeoilhinska kiselina	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ [−]	515,1190	515,1286	-9,63	191,0624(100) ; 135,0501; 161,0304; 173,0525; 179,0409, 353,0978	<LOD
16	6,54	Galoil-HHDP-heksoza	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₈ [−]	633,0728	633,0862	-13,42	301,0058(100) ; 169,0185; 463,0619	<LOD
Σ								153,32
Flavan-3-oli i derivati ^b								

17	6,33	Katehin*	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ [−]	289,0712	289,0756	-4,40	123,0493(100); 109,0334; 125,0286; 137,0289; 151,0447; 161,0646; 187,0459; 203,0771; 221,0879	13,36
18	7,00	Epi-katehin*	C ₁₅ H ₁₃ O ₆ [−]	289,0712	289,0751	-3,90	109,0336(100); 123,0494; 125,0289; 137,0291; 149,0298; 151,0452; 161,0655; 203,0776; 221,0886	5,08
19	8,89	(Epi)katehin-3-O-kumarat	C ₂₄ H ₁₉ O ₈ [−]	435,1080	435,1189	-10,89	341,0761(100); 109,0326; 123,0487; 145,0339; 189,0245; 217,0207	<LOD
20	7,95	Katehin-3-O-galat	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀ [−]	441,0822	441,0908	-8,59	169,0194(100); 109,0332; 125,0286; 137,0288; 203,0771; 245,0889; 289,0801	5,07
Σ								23,50
Procijanidini ^c								
21	6,13	Procijanidin dimer B-tip iz. I	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ [−]	577,1346	577,1447	-10,07	289,0799(100); 125,0285; 137,0287; 161,0296; 203,0764; 245,0880; 339,0963; 407,0880	5,74
22	6,80	Procijanidin B2*	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ [−]	577,1346	577,1454	-10,80	289,0797(100); 109,0330; 123,0492; 125,0284; 137,0288; 203,0770; 245,0888; 407,0870	9,17
23	7,34	Procijanidin dimer B-tip iz. II	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ [−]	577,1346	577,1464	-11,84	289,0798(100); 125,0285; 137,0287; 161,0294; 245,0875; 273,0483; 290,08286(19); 299,06485(6); 407,08847(49)	1,96
24	7,01	Halkan-flavan-3-ol dimer	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂ [−]	579,1503	579,1586	-8,25	289,0799(100); 109,0333; 123,0494; 125,0285; 137,0289; 161,0643; 203,0773; 245,0893	<LOD
25	9,03	Etil (epi)katehin-(epi)katehin (Epikatehin etil dimer)	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₂ [−]	605,1659	605,1738	-7,87	289,0798(100); 109,0312; 125,0279; 137,0289; 205,0567; 229,0937; 245,0895; 315,0967	<LOD
26	7,41	Procijanidin dimer B-tip galat	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₆ [−]	729,1456	729,1588	-13,19	407,0886(100); 125,0284; 169,0195; 289,0799; 408,0914; 425,0988; 441,0932; 451,1151; 577,1446	8,40
27	6,60	Procijanidin trimer B tip iz. I	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ [−]	865,1980	865,2159	-17,91	287,0642(100); 289,0794; 125,0283; 161,0291; 407,0884; 425,0988;	2,62

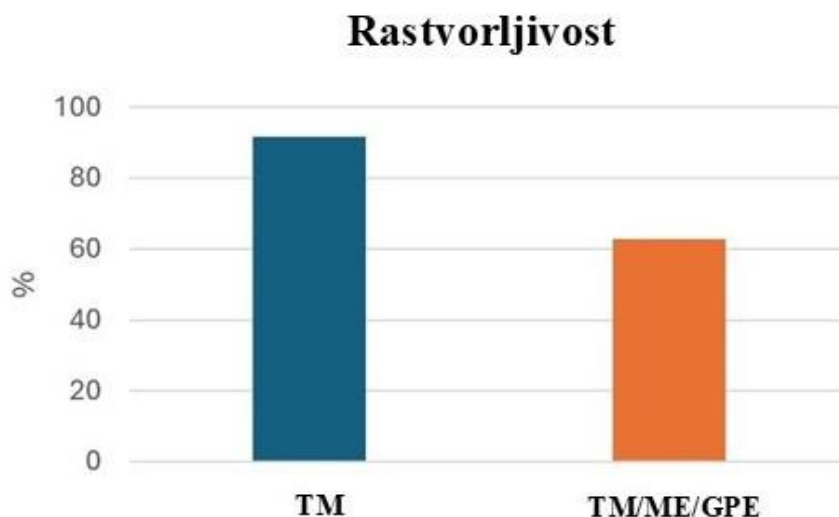
							451,1144; 575,1338; 577,1495; 695,1576; 713,1683	
28	7,27	Procijanidin C1*	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ [−]	865,1980	865,2139	-15,88	287,0641(100); 289,0792; 125,0283; 161,0294; 407,0879; 425,0991; 449,0992; 451,1154; 575,1335; 577,1495; 695,1574; 713,1683	8,11
29	7,81	Procijanidin trimer B tip iz. II	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ [−]	865,1980	865,2136	-15,62	287,0632(100); 289,0791; 125,0276; 407,0867; 425,0966; 449,0968; 451,1139; 575,1324; 577,1465; 695,1555	2,01
Σ								37,99
Flavanol aglikoni i glikozidi ^d								
30	10,37	Kampferol*	C ₁₅ H ₉ O ₆ [−]	285,0399	285,0444	-4,48	285,0485(100); 107,0174; 143,0548; 145,0342; 151,0084; 157,0694; 185,0662; 211,0469; 227,0419; 229,0573; 239,0414	<LOD
31	9,57	Kvercetin*	C ₁₅ H ₉ O ₇ [−]	301,0348	301,0399	-5,07	151,0085(100); 107,0177; 121,0334; 179,0039; 245,0528; 273,0484	<LOD
32	10,51	Izoramnetin	C ₁₆ H ₁₁ O ₇ [−]	315,0505	315,0554	-4,93	300,0366(100); 301,0383; 107,0173; 151,0084; 164,0174; 216,0495; 227,0428; 255,0354; 271,0326	<LOD
33	8,29	Kampferol 3- <i>O</i> -heksozid	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ [−]	447,0927	447,1012	-8,52	284,0408(100); 285,0467; 151,0084; 227,0415; 255,0374	<LOD
34	7,95	Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ [−]	463,0877	463,0973	-9,58	300,0367(100); 301,0433; 151,0085; 179,0045; 243,0378; 271,0331	0,51
35	8,42	Izoramnetin-3- <i>O</i> -heksozid	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ [−]	477,1033	477,1071	-3,78	314,0524(100); 315,0571; 151,0085; 271,0327; 300,0352	<LOQ
36	7,48	Miricetin 3- <i>O</i> -heksozid	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₃ [−]	479,0826	479,0957	-13,15	316,0312(100); 317,0362; 151,0082; 179,0039; 271,0318	<LOD
37	8,42	Siringetin 3- <i>O</i> -heksozid	C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃ [−]	507,1139	507,1247	-10,83	344,0615(100); 329,0270; 330,0493; 316,0636; 301,0685; 273,0434	<LOQ
38	7,81	Kvercetin 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -ramnozil) heksozid	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ [−]	609,1457	609,1504	-4,76	300,0358(100); 301,0425; 151,0082; 179,0039; 255,0369; 271,0315; 609,1611	<LOD
Druga fenolna jedinjenja								

39	8,96	Resveratrol*	C ₁₄ H ₁₁ O ₃ [−]	227,0708	227,0756	-4,83	143,0542(100) ; 117,0386; 157,0706; 159,0866; 183,0851; 185,0672	<LOD
40	10,17	Naringenin*	C ₁₅ H ₁₁ O ₅ [−]	271,0606	271,0624	-1,85	119,0548(100) ; 107,0127; 151,0086	<LOD
ΣΣ phenolic compounds								215,32
Amino-kiseline i masne kiseline								
41	1,78	Fenilalanin	C ₉ H ₁₀ O ₂ [−]	164,0712	164,0772	-6,05	103,0589(100) ; 147,0499	nq
42	14,82	Hidroksioktadekadienska kiselina	C ₁₈ H ₃₁ O ₃ [−]	295,2273	295,2355	-8,18	183,1076(100); 139,1146; 155,1132; 171,1080; 195,1446; 277,2251	nq
43	13,20	Dihidroksioktadecenska kiselina	C ₁₈ H ₃₃ O ₄ [−]	313,2379	313,2401	-2,22	183,1432(100) ; 129,0948; 195,143; 297,1936	nq
44	10,77	Trihidroksioktadecenska kiselina	C ₁₈ H ₃₃ O ₅ [−]	329,2328	329,2424	-9,60	171,1078(100) ; 127,1162; 139,1171; 155,1119; 183,1461; 201,1181; 211,1380; 229,1521; 311,2397; 293,2218	nq

Skraćenice: GPE – ekstrakt semenke grožđa sorte Prokupac; ME – ekstrakt gljive *A. aegerita*; LP – liofilizovani prah; nq – jedinjenja koja nisu kvantifikovana (jedinjenja čiji sadržaj nije određen); <LOD – ispod granice detekcije; <LOQ – ispod granice kvantifikacije. (*) Jedinjenja su kvantifikovana primenom referentnih standarda; (a) sadržaj jedinjenja izražen je u ekvivalentima galne kiseline (μg GA/g LP); (b) sadržaj jedinjenja izražen je u ekvivalentima katehina (μg CA/g LP); (c) sadržaj jedinjenja izražen je u ekvivalentima procijanidina B2 (μg PB2/g LP); (d) sadržaj jedinjenja izražen je u ekvivalentima kampferola (μg KA/g LP).

4.5.8 Rastvorljivost praha optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Rastvorljivost liofilisane optimizovane formulacije mikroinkapsulata i kontrolnog praha su prikazani na slici 4.11.



Slika 4.11. Rastvorljivost kontrolnog praha (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko) - TM i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) – TM/ME/GPE.

Na osnovu rezultata za rastvorljivost prahova može se zaključiti da je kontrolni TM prah pokazao izrazito svojstvo rastvorljivosti (91,77 %) u odnosu na optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata (62,74 %) (Slika 4.11). U literaturi se navodi da rastvorljivost obezmašćenog mleka u prahu, punomasnog mleka u prahu i delimično obezmašćenog mleka u prahu je obično veća od 99 %, a razlog tome je što se kod savremenih postupaka raspršivanja (sprej-sušenje) gotovo sav protein i laktoza uspešno disperguju, bez formiranja taloga (Pugliese et al., 2017), što je u skladu i sa rezultatom dobijenim u ovom istraživanju, u kome je prah TM pokazao veoma visoko svojstvo rastvorljivosti. Zhou et al., (2025) pokazuju da prah kozjeg mleka dobijen sprej-sušenjem može imati rastvorljivost ~76 %, što je značajno niža vrednost od one dobijene u ovoj disertaciji. Autori objašnjavaju da razlog tome može biti veći udeo kazeina u kozjem mleku, koji tokom sušenja sklapaju visokomolekularne komplekse i postaju teže rastvorljivi. Dodatak semenke i gljive značajno menja rastvorljivost mlečnih prahova. Polifenoli imaju prirodno slabu rastvorljivost u vodi (van de Langerijt et al., 2023), pa unošenjem u mleko dolazi do formiranja kompleksa sa proteinima. Primetno smanjenje rastvorljivosti optimizovane formulacije mikroinkapsulata verovatno je posledica vezivanja polifenola za mlečne proteine i međumolekulskih veza sa polisaharidima iz ekstrakta. Smanjena rastvorljivost optimizovanog praha je u skladu sa literaturnim podacima koji potvrđuju da dodatak biljnih ekstrakata utiče na smanjenje ovog svojstva (Lima Nascimento et al., 2023).

4.5.9 Sadržaj vlage i aktivnost vode optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Sadržaj vode kontrolnog praha (TM) iznosila je 4,06 % (odnosno 95,94 % suve materije), dok je kod praha formulacije bila 3,39 % (odnosno 96,61 % suve materije). Aktivnost vode praha TM bila je 0,27, dok je kod optimizovane formulacije mikroinkapsulata iznosila 0,10. Prahovi na bazi mleka, poželjno je da imaju nizak sadržaj vlage, kao i a_w vrednost, čime se obezbeđuje njihova dugotrajnost i mikrobiološka stabilnost (Yu et al., 2024). Yu et al. (2024) u svojoj studiji navode da su svi prahovi formulisani na bazi kozjeg mleka imale sadržaj vode ispod 5 % i aktivnost vode ispod 0,50. Rezultati istraživanja u ovoj disertaciji se uklapaju u sugerisani opseg i predstavljaju optimalne vrednosti za

prahove na bazi mleka. Dodatak ekstrakata takođe nije uticao negativno na ispitivane vrednosti, čak su doprineli snižavanju a_w vrednosti u odnosu na kontrolni uzorak. Aktivnost vode je kod oba uzorka bila veoma niska, znatno ispod kritične granice $a_w \leq 0,60$, što predstavlja donju granicu za rast i razmnožavanje većine mikroorganizama. Tome u prilog, Yu et al. (2024) ističu da su njihovi prahovi sa $a_w < 0,50$ bili mikrobiološki bezbedni, dok su Zhou et al. (2025) takođe utvrdili nisku a_w vrednost kozijeg mleka u prahu dobijenog sprej sušenjem (0,188).

4.5.10 Kvašljivost praha optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Kvašljivost se izražava kao vreme (h, min, s) koje je potrebno da celokupni prah postane potpuno vlažan, tj. da sve čestice praha prodru ispod površine vode (odnosno da potonu). Uzorak praha TM je pokazao vreme kvašenja od 5 min i 9 s, dok je optimizovana formulacija mikroinkapsulata pokazala nešto niže vreme od 3 min i 10 s. Tipične vrednosti za mlečne prahove su u sekundama kod prahova dobijenih sprej-sušenjem. Kvašljivost prahova kozjeg mleka dobijenih sprej-sušenjem iznosila je ~55 s (Zhou et al., 2025), što je znatno manje u poređenju sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji. Čak je i vrednost od 55 s za autore bila nezadovoljavajuća, ali ovu vrednost pravdaju nakupljanjem masti tokom sušenja, što je dovelo do povećane hidrofobnosti. TM prah je imao 309 s, a optimizovana formulacija mikroinkapsulata 190 s. Zhou et al. (2025) su koristeći kontaktni ugao kao pokazatelj kvašljivosti, pokazali da tehnika sušenja značajno utiče na rehidrataciona svojstva mlečnih prahova i da su liofilizovani prahovi imali povoljniju kvašljivost u odnosu na one dobijene sprej-sušenjem, što su povezali sa njihovom većom poroznošću i manjom gustinom. Bhokarika et al. (2025) navode da su njihovi prahovi ovsenog mleka (dobijeni sprej-sušenjem i liofilizacijom) imali svojstvo kvašljivosti od svega ~9-17 s, dok su neki drugi autori izmerili čak 22-134 s za prahove sojinog mleka dobijene sprej-sušenjem (Bhokarika et al., 2025). Dakle vrednosti prahova kontrole i optimizovane formulacije mikroinkapsulata se nalaze na gornjoj granici tog raspona, odnosno iznad njega, što ukazuje na izuzetno sporu rehidrataciju.

4.5.11 Nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata

U Tabeli 4.11. dati su rezultati za nasipnu i tapkanu gustinu, protočnost i kohezivnost TM praha i optimizovane formulacije mikroinkapsulata.

Tabela 4.11. Nasipna i tapkana gustina, protočnost i kohezivnost kontrolnog TM praha i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (TM/ME/GPE).

Uzorci	Nasipna gustina (g/mL)	Tapkana gustina (g/mL)	Protočnost (CI, %)	Kohezivnost (HR)
TM	0,33	0,51	36,10	1,56
TM/ME/GPE	0,22	0,31	28,90	1,41

Nasipna i tapkana gustina (masa praškastog materijala po jedinici njegove zapremine) predstavljaju važne fizičke karakteristike praškastih proizvoda, i daju informacije o potrebnoj zapremini skladištenja i transporta, i igraju ključnu ulogu u određivanju troškova pakovanja i transporta sušenih proizvoda (Marković et al., 2024). Ove vrednosti su se razlikovale između ispitivanih prahova. Vrednosti nasipne gustine većine prehrambenih prahova su u rasponu od 0,30 - 0,80 g/cm³ (Marković et al., 2024). U istraživanju Bhokarika et al. (2025), prah ovsenog mleka dobijen sprej-sušenjem je imao vrednost za nasipnu gustinu u iznosu od ~381,33 kg/m³ (odnosno 0,38 g/mL), dok je vrednost za tapkanu gustinu iznosila ~480,66 kg/m³ (odnosno 0,48), što je u dobroj saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji za TM uzorak, dok je prah optimizovane formulacije pokazao niže vrednosti nasipne gustine. Zhou et al. (2025) navode vrednosti za nasipnu i tapkanu gustinu prahova

kozjeg mleka dobijenih sprej-sušenjem od 0,30 i 0,47 g/mL, što je takođe u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju. Pugliese et al. (2017) su ova svojstva ispitivali na 7 uzoraka obranog mleka u prahu, gde su se vrednosti za nasipnu gustinu kretale u opsegu od 407 do 666 kg/m³, dok za tapkanu gustinu vrednosti su bile u opsegu od 578 do 871 kg/m³, što su daleko veće vrednosti od onih koje su dobijene u ovoj disertaciji. Jinapong et al. (2008) su ove vrednosti ispitivale na sprej-sušenom instant sojinom mleku u prahu. Rezultati za nasipnu gustinu su u saglasnosti sa dobijenim vrednostima ispitivanih uzoraka u ovoj disertaciji i iznosile su od 0,21 do 0,22 g/cm³, dok su vrednosti za tapkanu gustinu bile u opsegu od 0,31 do 0,35 g/cm³, što je uporedivo sa vrednostima dobijenim za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata. Generalno, obogaćeni prah kozjeg mleka pokazuje vrlo niske vrednosti za tapkanu gustinu.

U pogledu protočnosti ispitivanih prahova, određene na osnovu indeksa kompresibilnosti utvrđeno je da je protočnost praha TM veoma loša (36,10 %), dok je za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata protočnost bila loša (28,90 %). Kada je reč o kohezivnosti prahova, odnosno meri sklonosti čestica praha da se međusobno privlače i povezuju, na osnovu Hausner koeficijenta, utvrđeno je da je vrednost za uzorak TM (1,56) bila veoma loša, dok je za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata (1,41) bila loša (Gorle & Chopade, 2020). Zhou et al. (2025) navode da su vrednosti kozjeg mleka dobijenog sprej-sušenjem za CI – 36,35 %, a za HR – 1,57, što se poklapa sa vrednostima dobijenim za prah TM. Jinapong et al. (2008) za instant sojino mleko u prahu navode vrednosti za CI u rasponu od 32 do 40 %, a za HR od 1,47 do 1,76, pri čemu su vrednosti za prah TM kretale u okviru ovih vrednosti, dok su u slučaju optimizovane formulacije mikroinkapsulata ove vrednosti bile niže. Rosa & Schwinden Prudencio, (2023) su pokazali da prahovi sa CI preko 38 % i HR preko 1,6 standardno ukazuju na lošu protočnost, a ove vrednosti su dosta veće u poredjenju sa rezultatima za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata.

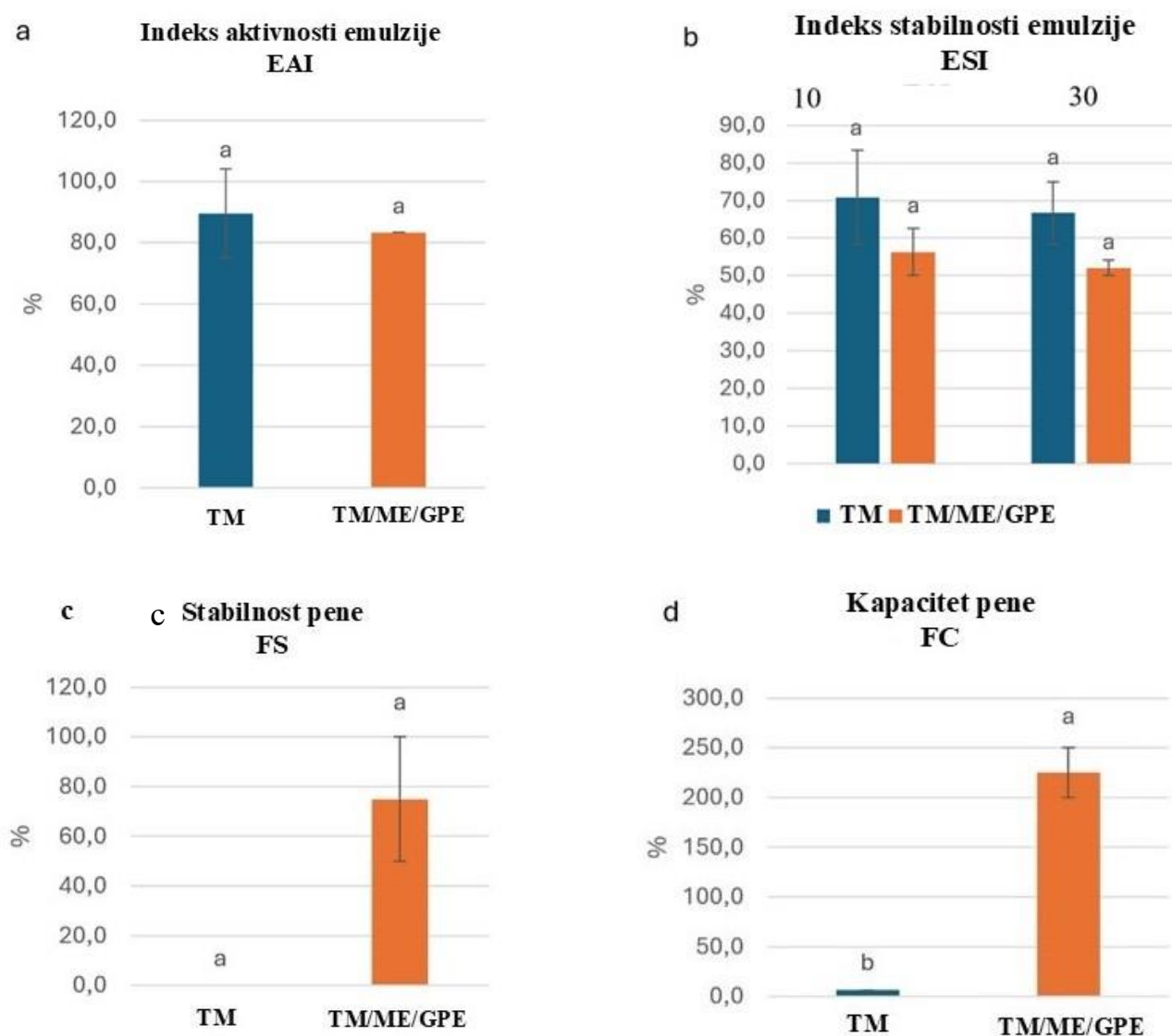
4.6 Tehno-funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

4.6.1 Emulgujuća i peniva svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Rezultati EAI i ESI 0,1 % rastvora mikroinkapsulata i kontrolnog mleka (TM) su prikazani na slici 4.12a,b. Optimizovana formulacija mikroinkapsulata je pokazala niži EAI i ESI u poređenju sa kontrolnim mlekom, što ukazuje na smanjenje sposobnosti i stabilnosti emulzije formulacije mikroinkapsulata verovatno zbog sadržaja ekstrakata grožđa i gljive. Ovakvo ponašanje može se pripisati strukturnim modifikacijama mlečnih proteina, izazvanim njihovim interakcijama sa fenolnim jedinjenjima i polisaharidima iz ekstrakata gljive i semenki grožđa. Kao što je potvrđeno DLS analizom, mikroinkapsulati se odlikuju povećanom veličinom čestica i kompleksnijom, polimodalnom distribucijom čestica, što smanjuje efikasnost difuzije i adsorpcije različitih čestica/agregata na granici ulje/voda. Veći agregati i protein-polifenolni kompleksi pokrivaju manju međupovršinsku oblast, što dovodi do smanjenja vrednosti EAI, u skladu sa prethodnim nalazima (Milinčić et al., 2024a). Pored toga, elektroforetska analiza ukazala je na delimičnu proteolizu i formiranje peptida niže molekulske mase, što je moglo dodatno uticati na konformaciju proteina i njihovo ponašanje na međufazi ulje/voda. Ove strukturne promene mogle su izmeniti ravnotežu između hidrofilnih i hidrofobnih domena, smanjujući sposobnost proteina da brzo adsorbuju i stabilizuju novoformirane međupovršine. Poznato je da se polifenoli vezuju za proteine i da mogu izazvati agregaciju proteina ili smanjiti njihovu rastvorljivost, što može ometati njihovu sposobnost adsorpcije na međupovršini/međufazi ulje/voda (Ozidal et al., 2013; Chen et al., 2022).

Vrednosti ESI su se, nakon početnog smanjenja od približno 44 % posle 10 min, zadržale gotovo nepromenjenim nakon 30 min, što ukazuje na formiranje relativno stabilnog međufaznog filma (Milinčić et al., 2025b). Ovo se može objasniti formiranjem protein-polifenolnih i protein-

polisaharidnih kompleksa tokom vremena, koji mogu ojačati međufazni film i doprineti sfernoj stabilizaciji uljanih kapljica. Slično ponašanje prethodno je zabeleženo kod protein-polifenol modela, gde je pokazano da formirani konjugati poboljšavaju stabilnost emulzije uprkos smanjenoj emulgujućoj aktivnosti (Milinčić et al., 2025b). Generalno, dobijeni rezultati ukazuju da dodatak ekstrakta gljive i semenke grožđa mogu dovesti do kompleksne modifikacije ponašanja na međufazi ulje/voda: smanjujući emulgujući kapacitet (EAI) usled strukturnih efekata i efekata povezanih sa veličinom čestica, dok istovremeno doprinose stabilnosti emulzije formiranjem kompozitnih međufaznih filmova.

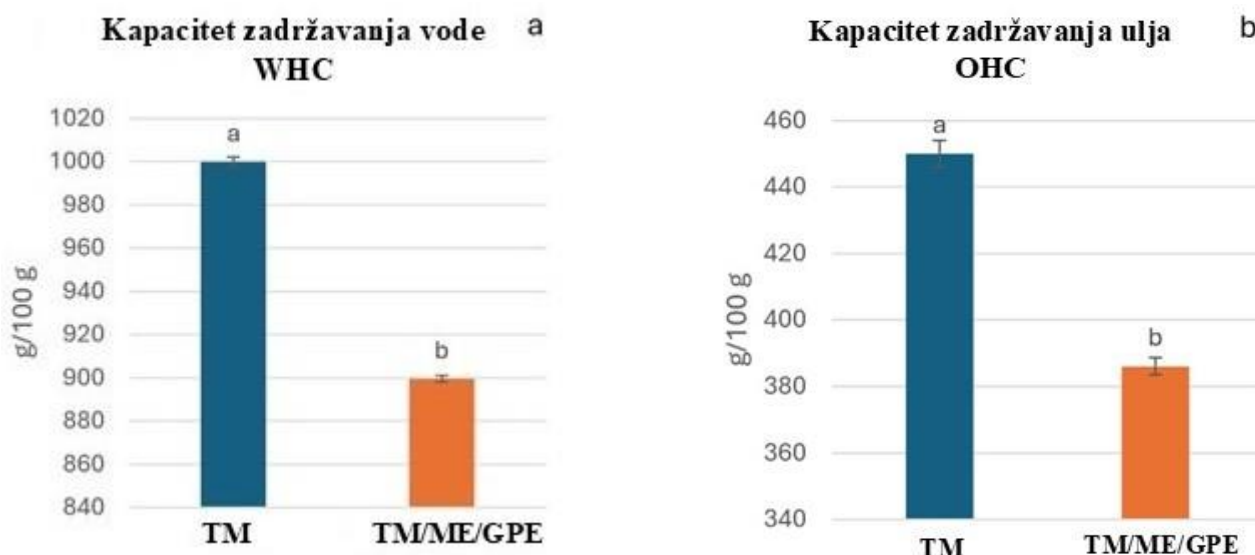


Slika 4.12. (a) indeks aktivnosti emulzije (EAI); (b) indeks stabilnosti emulzije (ESI) nakon 10 i 30 min; (c) stabilnost pene (FS); i (d) kapacitet pene (FC) kontrolnog TM uzorka i optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE. Uzorci: TM – obezmašćeno termički tretirano kozje mleko (90 °C, 10 min); TM/ME/GPE – (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa). Podaci su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija. Poređenje između srednjih vrednosti je označeno malim slovima. Srednje vrednosti sa istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p < 0,05$.

Za razliku od emulgujućih svojstava, optimizovana formulacija mikroinkapsulata pokazala je značajno veću FS i FC vrednost u odnosu na kontrolni uzorak (TM) (Slika 4.12c,d), što ukazuje na poboljšanu sposobnost formiranja i stabilizacije mehurića vazduha. TM uzorak nije imao sposobnost da stabilizuje penu. Ovakvo ponašanje (TM/ME/GPE) mikroinkapsulata za peniva svojstva može se

prvenstveno pripisati strukturnim modifikacijama mlečnih proteina izazvanim prisustvom ekstrakta gljive i semenke grožđa. Kao što je pokazala elektroforetska analiza, delimična proteoliza mlečnih proteina dovela je do formiranja peptida niže molekulske mase. Ove manje i fleksibilnije proteinske strukture su u stanju da se brzo adsorbuju na međufazi vazduh/voda, smanjujući površinski napon efikasnije u poređenju sa intaktnim kazeinskim micelama. U termički tretiranom obezmašćenom kozjem mleku, kazeinske micelle su relativno velike i strukturno krute, što ograničava njihovu sposobnost reorganizacije na međufazi vazduh/voda i stabilizaciju pene. U skladu sa tim, prethodno su za termički tretirano obezmašćeno kozje mleko zabeležena slaba peniva svojstva (Milinčić et al., 2024a). Pored toga, prisustvo polisaharida poreklom iz gljive, posebno β -glukana, verovatno doprinosi stabilizaciji pene učestvovanjem u formiranju viskoelastičnog međufaznog filma oko mehurića vazduha. Ove komponente, zajedno sa rastvorljivim proteinskim agregatima, mogu povećati otpornost na koalescenciju mehurića, što rezultira poboljšanom stabilnošću pene. Kombinovani efekat fleksibilnih peptida i polisaharid-protein interakcija dovodi do formiranja kohezivnije i stabilnije strukture pene. Treba napomenuti da fenolna jedinjenja ne moraju nužno doprineti poboljšanju penivih svojstava. Prethodna istraživanja na model formulacijama kozjeg mleka obogaćenim fenolnim jedinjenjima iz semenke grožđa ukazala su na smanjenje kapaciteta formiranja pene i njene stabilnosti, što je pripisano interakcijama između fenolnih jedinjenja i proteina, koje mogu blokirati aktivna mesta i smanjiti površinsku hidrofobnost (Milinčić et al., 2025b). Uzimajući u obzir rezultate prethodne studije i prijavljen efekat protein-polifenol interakcija u suzbijanju aktivnosti/stabilnosti pene, poboljšana peniva svojstva TM/ME/GPE mikorinkapsulata najverovatnije zavise od proteinskih hidrolizata i formiranih polisaharid-protein kompleksa. Poznato je takođe da proteini gljiva poseduju dobra svojstva penivosti. U novijoj studiji o proteinima šampinjona i bukovače ekstrahovanim primenom ultrazvuka, prijavljene su izrazito visoke vrednosti FC ($82,50 - 235\%$ u zavisnosti od pH uslova) i značajne vrednosti FS (do $162,50\%$) (Macêdo de Medeiros et al., 2025).

4.6.2 Kapacitet zadržavanja vode/ulja



Slika 4.13. (a) kapacitet zadržavanja vode (WHC) i (b) kapacitet zadržavanja ulja (OHC) kontrolnog (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko) praha - TM i optimizovane formulacije mikorinkapsulata (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) – TM/ME/GPE. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija. Poređenje između srednjih vrednosti je označeno malim slovima. Srednje vrednosti sa istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p < 0,05$.

Na slici 4.13a je jasno pokazano da kontrolni TM prah ima veći kapacitet vezivanja vode (WHC) ($1000 \pm 0,10$ g/100 g) u poređenju sa optimizovanom formulacijom mikorinkapsulata ($899,5 \pm 1,50$

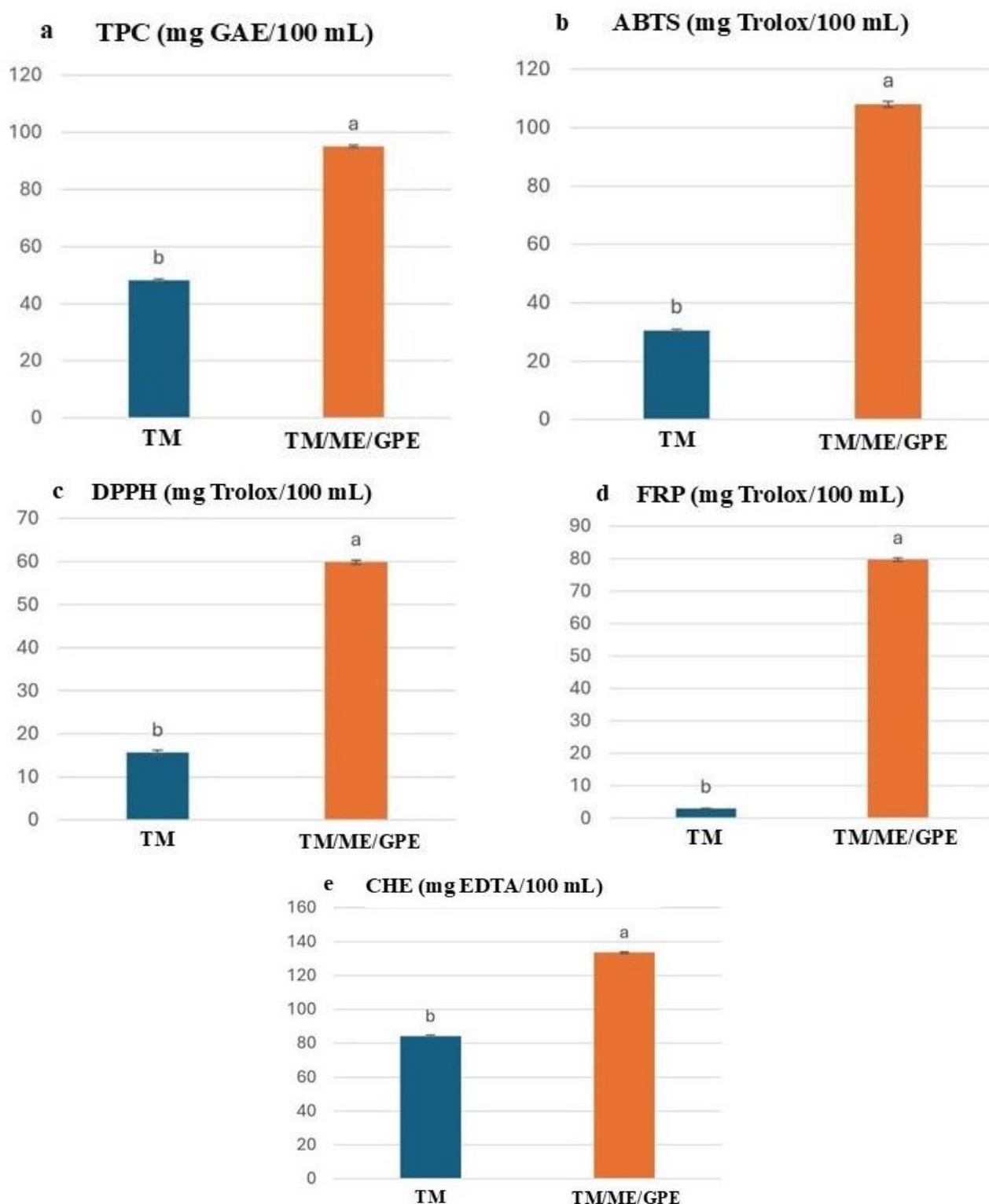
g/100 g). Smanjenje WHC nakon obogaćivanja ekstraktima gljive i semenki grožđa može se pripisati strukturnim modifikacijama mlečnih proteina, kao što je prethodno diskutovano. Konkretno, interakcije sa fenolnim jedinjenjima i formiranje većih agregata, potvrđeno DLS analizom, mogu smanjiti hidrofilna aktivna mesta na kazeinskoj miceli i ograničiti kapacitet zadržavanja molekula vode, što dovodi do nižih vrednosti WHC. Prethodna istraživanja su takođe pokazala da delimična agregacija proteina i vezivanje polifenola za proteine mleka mogu smanjiti dostupnost za hidrofilna mesta i ograničiti tendenciju zadržavanja molekula vode (Ma et al., 2024; Cao et al., 2025; Mao et al., 2024). Sličan trend primećen je i za kapacitet vezivanja ulja (OHC) koji je takođe bio niži u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata u poređenju sa kontrolnim prahom (TM) ($386,08 \pm 2,50$ naspram $450 \pm 1,50$ g/100 g) (Slika 4.13b). Ovo smanjenje može biti povezano sa promenama u konformaciji proteina i njihovim površinskim svojstvima. Osim hidrofilnih aktivnih mesta, očigledno je kompleksna i multikomponentna priroda mikroinkapsulata i formirane interakcije uticale i na suzbijanje i broj hidrofobnih regiona koji pokazuju tendenciju za vezivanje ulja. Neka od prethodnih istaživanja baziranih na formulacijama na bazi mleka/proteina mleka obogaćenih gljivama ukazala su na poboljšano zadržavanje vode, smanjenu sinerezu i veće vrednosti WHC i OHC, što se uglavnom pripisuje sposobnosti β -glukana i dijetetskih vlakana poreklom iz gljiva (Das et al., 2021; See Toh et al., 2023; Jabłońska-Ryś, 2025; Sze Han et al., 2016). U optimizovanoj TM/ME/GPE formulaciji, istovremeno prisustvo fenolnih jedinjenja, polisaharida i strukturno modifikovanih proteina verovatno je dovelo do formiranja kompaktnije ili agregirane matrice, što je ograničilo kapacitet zadržavanja i vode i ulja.

4.7 Funkcionalna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

4.7.1 Procena antioksidativne aktivnosti optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Na slici 4.14. su prikazane vrednosti različitih testova za procenu antioksidativne aktivnosti i vrednosti za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja za kontrolni prahov TM i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (TM/ME/GPE).

Na osnovu svih primenjenih testova možemo zaključiti da je optimizovana formulacija mikroinkapsulata obogaćena ekstraktima gljive i semenke grožđa pokazala znatno viši antioksidativni potencijal u poređenju sa kontrolnim uzorkom mleka (TM). Povećan TPC u obogaćenom ekstraktu u odnosu na kontrolu je u skladu sa literaturom, odnosno činjenicom da sa dodavanjem ekstrakata bogatih fenolnim jedinjenjima raste sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja. Milinčić et al. (2025a) su pokazali da formulacija kozjeg mleka obogaćen ekstraktima crvene i crne godži bobice ima značajno viši TPC u odnosu na kontrolu. Slično tome, Najjar et al. (2026) navode da ekstrakt semenke čička u fermentisanom kozjem mleku povećava ukupnu koncentraciju fenolnih jedinjenja u odnosu na neobogaćene uzorke. Obezmašćeno termički tretirano kozje mleko obogaćeno ekstraktom semenke grožđa je takođe značajno poboljšao antioksidativna svojstva kozjeg mleka (Milinčić et al., 2021b). Karakterizacija vodenog ekstrakta gljive *A. aegerita* je pokazala značajnu TPC vrednost (23,72 Ggae/100g). Imajući ovo u vidu, verovatno su i ekstrakt gljive i ekstrakt semenke značajno uticali na povećanje TPC u obogaćenoj optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata (95,15 mg GAE/100 mL) u odnosu na kontrolni uzorak TM (48,25 mg GAE/100 mL). ABTS^{•+} vrednost optimizovane formulacije mikroinkapsulata iznosila je 108,0 mg Trolox/100 mL, znatno više u poređenju sa kontrolnim prahom TM. DPPH[•] vrednost optimizovane formulacije mikroinkapsulata je bila nekoliko puta veća (59,90 mg Trolox/100 mL) u odnosu na TM prah (15,68 mg Trolox/100 mL). Dalje optimizovana formulacija mikroinkapsulata je pokazala veću redukujuću moć (FRP) u odnosu na kontrolu, zahvaljujući fenolnim jedinjenjima iz grožđa i gljive.



Slika 4.14. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), sposobnost uklanjanja ABTS^{•+} radikala (ABTS), sposobnost uklanjanja DPPH[•] radikala (DPPH), moć redukcije gvožđa (FRP) i sposobnost heliranja jona gvožđa (CHE) kontrolnog praha (obezmašćeno termički tretirano kozje mleko) - TM i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (termički tretirano kozje mleko/ekstrakt gljive/ekstrakt semenke grožđa) – TM/ME/GPE. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti $\pm$ standardna devijacija. Poređenje između srednjih vrednosti je označeno malim slovima. Srednje vrednosti sa istim slovima se statistički ne razlikuju pri $p < 0,05$.

Različite studije su pokazale da obogaćivanje mleka biljnim ekstraktima, doprinosi povećanju antioksidativne aktivnosti, koristeći različite *in vitro* testove, uključujući DPPH[•], ABTS^{•+}, FRP i CHE

(Unal, 2012; Shori, 2013; Perna et al., 2014; Lee et al., 2020; Milinčić et al., 2021b; Stobiecka et al., 2022; Milinčić et al., 2025a; Najjar et al., 2026). Proteini mleka generalno imaju slabu redukujuću moć (FRP). Milinčić et al. (2021b) su pokazali da sirovo, obezmašćeno i termički tretirano kozje mleko nisu imali značajnu FRP aktivnost, dok formulacije obogaćene ekstraktom grožđa pokazuju značajan porast FRP vrednosti (koji se povećava sa povećanjem koncentracije ekstrakta u formulaciji). Slično je uočeno i u ovoj studiji, FRP optimalne formulacije mikroinkapsulata su imale značajno veću vrednost (79,67 mg Trolox/100 mL) u poređenju sa kontrolnim uzorkom mleka TM (3,06 mg Trolox/100 mL). Vrednost CHE za TM je bila 84,30 mg EDTA/ 100 mL, dok je za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata bila 133,56 mg EDTA/100 mL. Suprotan trend zabeležen je u istraživanju Milinčić et al. (2025a), u kojem je obogaćivanje termički tretiranog kozjeg mleka ekstraktima crvenih i crnih godži bobica rezultovalo značajno nižom CHE u odnosu na kontrolno kozje mleko. Prema navodima autora, ovakav rezultat može biti zbog WP/CN kompleksa na površini kazeinskih micela i njihovih interakcija sa fenolnim jedinjenjima.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je obogaćivanje kozjeg mleka sa ekstraktima gljive i semenki grožđa uticalo na značajno povećanje antioksidativne aktivnosti u odnosu na kontrolni uzorak, pa se može reći da optimizovana formulacija mikroinkapsulata poseduje potencijalna funkcionalna svojstva.

4.7.2 Antimikrobna svojstva optimizovane formulacije mikroinkapsulata

Antimikrobna aktivnost formulacije optimizovane formulacije mikroinkapsulata procenjena je na odabranim bakterijskim sojevima određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK).

4.7.2.1 Antibakterijska aktivnost

Rezultati antibakterijske aktivnosti (Tabela 4.12) pokazuju da su među testiranim bakterijama, *S. enterica* serovar Typhi (ATCC 13311) bila najosetljivija na aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata (sa vrednošću MIK od 0,88 mg mL⁻¹ i MBK od 1,75 mg mL⁻¹), zatim *B. cereus* i *E. cloacae* (ATCC 45040), obe sa MIC vrednostima od 1,75 mg mL⁻¹ i MBC vrednostima od 3,50 mg mL⁻¹. Nasuprot tome, *S. aureus* (ATCC 11842), *L. monocytogenes* (NCTC 7974) i *E. coli* (ATCC 25922) pokazale su nižu osetljivost, sa MIK vrednostima od 3,50 mg mL⁻¹ i MBK vrednostima u rasponu od 7,00 mg mL⁻¹ do >7,00 mg mL⁻¹.

Dobijeni rezultati ukazuju na razlike osetljivosti pojedinačnih testiranih sojeva. Sličan zaključak su potvrdili i Milinčić et al. (2025b) u studiji gde autori navode da su *B. cereus*, *S. enterica* serovar Typhi i *E. cloacae* bili najosetljiviji na formulaciju M/ME baziranu na kozjem mleku koje je obogaćeno ekstraktom gljive *A. aegerita*. Soj *S. aureus* je bio najotporniji na testiranu optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata (TM/ME/GPE), sa MBK preko 7 mg mL⁻¹, što je takođe potvrđeno i kod ispitivanog M/ME praha (Milinčić et al., 2025b). Antibakterijska aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata u poređenju sa aditivima E211 i E224 zavisila je od ispitivanog bakterijskog soja. Na primer, u slučaju *B. cereus*, MIK optimizovane formulacije mikroinkapsulata (1,75 mg mL⁻¹) bila je viša od E211 (0,50 mg mL⁻¹), ali niža od E224 (2,00 mg mL⁻¹), ukazujući na njegov potencijal za primenu kao prirodnog konzervansa i moguću alternativu za sintetičke konzervanse. Za *S. enterica* serovar Typhi optimizovana formulacija mikroinkapsulata je imala nižu MIK od oba konzervansa i nižu MBK od E211, ali višu MBK od E224, za *S. aureus* MIK je bila niža od E211, dok je MBK bila viša od oba konzervansa; za *L. monocytogenes* (NCTC 7974) i *E. coli* (ATCC 25922) E211 i E224 su imali niže MIK/MBK vrednosti. Slična antibakterijska aktivnost je pokazana za formulacije fermentisanog mleka koje su obogaćene biljnim ekstraktima, poput vodenog ekstrakta *Terminalia chebula*, koji je pojačao antimikrobnu aktivnost protiv *S. aureus*, dostižući prečnik zone inhibicije do 18 mm (Kanik et al., 2021).

Tabela 4.12. Antibakterijska aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata (mg mL⁻¹).

Mikroorganizmi		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11842)	<i>Bacillus cereus</i> (izolat iz hrane)	<i>Listeria monocytogenes</i> (NCTC 7974)	<i>S. enterica</i> serovar Typhi (ATCC 13311)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Enterobacter cloacae</i> (ATCC 45040)
TM/ME/GPE	MIK	3.50	1.75	3.50	0.88	3.50	1.75
	MBK	>7.00	3.50	>7.00	1.75	7.00	3.50
E211	MIK	4.00	0.50	1.00	1.00	1.00	2.00
	MBK	4.00	0.50	2.00	2.00	2.00	4.00
E224	MIK	1.00	2.00	0.50	1.00	0.50	0.50
	MBK	1.00	4.00	1.00	1.00	1.00	0.50

Skraćenice: optimizovana formulacija mikroinkapsulata (TM/ME/GPE); E211 - natrijum benzoat; E224 - kalijum metabisulfit; MIK - minimalna inhibitorna koncentracija; MBK – minimalna baktericidna koncentracija.

Tabela 4.13. Antibakterijska aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata protiv patogena iz hrane (mg mL⁻¹).

Mikroorganizmi		<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 13932)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 15313)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 35152)	<i>Y. enterocolitica</i> (ATCC 9610)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 700728)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 43888)
TM/ME/GPE	MIK	1.75	0.44	0.88	0.88	0.88	1.75	1.75	0.88
	MBK	3.50	0.88	1.75	1.75	1.75	3.50	3.50	1.75

Skraćenice: optimizovana formulacija mikroinkapsulata (TM/ME/GPE); MIK - minimalna inhibitorna koncentracija; MBK - minimalna baktericidna koncentracija.

Tabela 4.14. Antifungalna aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata (mg mL⁻¹).

		<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 1022)	<i>Aspergillus versicolor</i> (ATCC 117340)	<i>Aspergillus ochraceus</i> (ATCC 12066)	<i>Penicillium funiculosum</i> (ATCC 36839)	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (izolat iz hrane)	<i>Trichoderma viride</i> (IAM 5061)
TM/ME/GPE	MIK	1.75	1.75	0.88	3.50	0.88	0.88
	MFK	3.50	3.50	1.75	7.00	1.75	1.75
E211	MIK	1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	1.00
	MFK	2.00	4.00	2.00	2.00	4.00	2.00
E224	MIK	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00	0.50
	MFK	1.00	1.00	1.00	0.50	1.00	0.50

Skraćenice: optimizovana formulacija mikroinkapsulata (TM/ME/GPE); E211 - natrijum benzoat; E224 - kalijum metabisulfid; MIK - minimalna inhibitorna koncentracija; MFK - minimalna fungicidna koncentracija.

Tabela 4.15. Antikandidalna aktivnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata (mg mL⁻¹).

		<i>C. albicans</i> 475/15	<i>C. albicans</i> 14/15	<i>C. albicans</i> 17/15	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. krusei</i> H1/18
TM/ME/GPE	MIK	0.88	0.88	0.44	0.22	0.44	0.88
	MFK	1.75	1.75	0.88	0.44	0.88	1.75
Ketokonazol (x 10⁻⁴)	MIK	4.20	1.80	1.80	4.20	1.80	1.80
	MFK	8.40	51.20	51.20	8.40	8.40	4.20

Skraćenice: optimizovana formulacija mikroinkapsulata (TM/ME/GPE); MIK - minimalna inhibitorna koncentracija; MFK - minimalna fungicidna koncentracija.

Takođe, Dang et al. (2024) su pokazali skoro potpunu inhibiciju *E. coli* (99,70 %) za testiranu praškastu formulaciju mleka, a Marques Soutelino et al. (2024) navode da prirodni antimikrobni agensi u mleku često pokazuju aktivnost upravo prema *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus* i *E. coli*, što je u skladu sa osetljivošću pojedinih sojeva ispitivanih u ovoj disertaciji. Biljke su poznate kao izvor antimikrobnih jedinjenja, a polifenoli iz grožđa se mogu koristiti kao aktivni agensi, zbog čega mogu potencijalno predstavljati prirodne antimikrobne komponente i potencijalnu zamenu za sintetičke konzervanse (Sateriale et al., 2024). Studija Atwaa et al. (2022) je ispitivala antimikrobni potencijal pet biljnih i začinskih ekstrakata, i svi testirani ekstrakti su inhibirali rast mikroorganizama (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) u pasterizovanom kravljem mleku u toku dužeg vremena skladištenja, u poređenju sa kontrolnim uzorcima.

Što se tiče bakterijskih kontaminanata koji se mogu javiti u mleku (Tabela 4.13), dobijeni rezultati za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata su pokazali nešto niži antibakterijski potencijal od prethodno ispitane i publikovane formulacije M/ME (Milinčić et al., 2025b). Među sojevima prikazanim u Tabeli 4.13, najniže MIK i MBK vrednosti utvrđene su za *L. monocytogenes* (ATCC 15313) (MIC 0,44 mg mL⁻¹; MBK 0,88 mg mL⁻¹). Za *L. monocytogenes* (ATCC 19111 i ATCC 35152), *Y. enterocolitica* (ATCC 9610) i *E. coli* O157:H7 (ATCC 43888) utvrđene su MIK vrednosti od 0,88 mg mL⁻¹ i MBK vrednosti od 1,75 mg mL⁻¹, dok su za *L. monocytogenes* (ATCC 13932), *E. coli* O157:H7 (ATCC 700728) i *E. coli* (ATCC 11775) vrednosti iznosile MIK 1,75 mg mL⁻¹ i MBK 3,50 mg mL⁻¹. U odnosu na sojeve iz Tabele 4.12, kod kojih su MIK vrednosti iznosile 0,88–3,50 mg mL⁻¹, a MBK 1,75 do >7,00 mg mL⁻¹, kod pojedinih sojeva iz Tabele 4.13 utvrđene su niže MIK/MBK vrednosti, što ukazuje na njihovu izraženiju osetljivost na optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata (TM/ME/GPE).

Antifungalna efikasnost optimizovane formulacije mikroinkapsulata procenjena je na odabranim plesnima i kvascima određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne fungicidne koncentracije (MFK). Rezultati antifungalne aktivnosti za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata, kao i za dva komercijalna konzervansa dati su u Tabeli 4.14. *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane), *Trichoderma viride* (IAM 5061) i *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066) su bile najosetljivije na aktivnost testiranog TM/ME/GPE mikroinkapsulata, uz opseg vrednosti MIK od 0,88 mg mL⁻¹ i vrednosti MFK od 1,75 mg mL⁻¹, dok su *A. fumigatus* (ATCC 1022) i *A. versicolor* (ATCC 117340) bili otporniji na njegovo dejstvo (MIK = 1,75 mg mL⁻¹, MFK = 3,50 mg mL⁻¹). Dobijene vrednosti bile su više u odnosu na pozitivnu kontrolu, konzervans E224, dok su bile relativno ujednačene sa vrednostima dobijenim za konzervans E211. Najniži antifungalni potencijal TM/ME/GPE mikroinkapsulata je bio u slučaju *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839) sa vrednošću MIK od 3,50 mg mL⁻¹ i vrednošću MFK od 7,00 mg mL⁻¹, što je znatno niže od vrednosti za konzervanse E211 i E224 (MIK od 0,5 - 1,0 mg mL⁻¹, i MFK od 0,5 - 2,0 mg mL⁻¹). Optimizovana formulacija mikroinkapsulata takođe je pokazala antifungalnu aktivnost za *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *P. verrucosum* var. *cyclopium* i *T. viride*, s tim da su pojedine MIK/MFK vrednosti bile jednake ili niže od vrednosti utvrđenih za E211. U poređenju sa E224 antifungalnim vrednostima, optimizovana formulacija mikroinkapsulata je u većini slučajeva pokazala više MFK vrednosti, dok su oba konzervansa ispoljila izraženiju aktivnost prema *P. funiculosum*. Dobra antifungalna svojstva M/ME formulacije (Milinčić et al., 2025b) su zabeležena za *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *T. viride*, *A. fumigatus* (MIK 0,88 mg mL⁻¹). U ovom slučaju, autori povezuju dobra antifungalna svojstva sa sinergističkim delovanjem bioaktivnih jedinjenja i glukana *A. aegerita* i polipeptida kozjeg mleka (Milinčić et al., 2025b). Niska MIK vrednost protiv *A. ochraceus* (0,88 mg mL⁻¹) mogu biti povezane sa hidrolizovanim peptidima iz proteina kozjeg mleka (Etawa rasa), gde je najaktivniji frakcionisani peptid pokazao MIK od 31,25 µg/mL protiv *Aspergillus* sp., uz vidljivo oštećenje morfologije micelije (Ningsih et al., 2023). Slično, konstituenti fermentisanih mlečnih formulacija (uključujući one sa mlečno-kiselinskim bakterijama) proizvode metabolite (acetat, hidroksi-masne

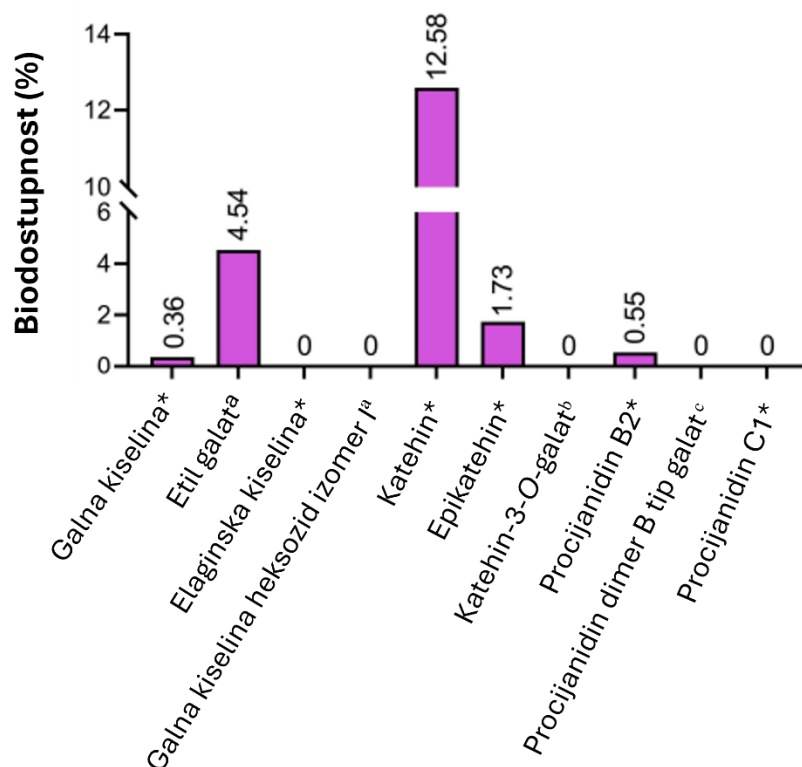
kiseline) koje efikasno inhibiraju *Penicillium*, *Aspergillus* i druge mikromicete u mlečnim matricama, produžavajući rok trajanja jogurta i mleka (Liang et al., 2022).

U Tabeli 4.15 dati su rezultati antikandidalne aktivnosti optimizovane formulacije mikroinkapsulata. U pogledu antikandidalne aktivnosti, TM/ME/GPE mikroinkapsulat je dao obećavajući potencijal sa MIK aktivnošću u rasponu od 0,22 - 0,88 mg mL⁻¹ i MFK u rasponu od 0,44 - 1,75 mg mL⁻¹. Što se tiče antikandidalne aktivnosti, izuzetno niska MIK za *C. parapsilosis* (0,22 mg mL⁻¹) uporediva je sa vrednostima pokazanim za čiste polifenole iz semena grožđa, gde su MIK vrednosti protiv *Candida* vrsta bile u rasponu od 0,39 do 50 mg/mL (Simonetti et al., 2020), što može ukazivati na mogući zajednički doprinos bioaktivnih komponenti kozjeg mleka, ekstrakta gljive i polifenola semenki grožđa u ukupnoj antikandidalnoj aktivnosti formulacije. Iako je optimizovana formulacija mikroinkapsulata pokazala slabiju antikandidalnu aktivnost u odnosu na ketokonazol, dobijeni rezultati ukazuju na funkcionalan i antimikrobni potencijal za primenu u razvoju različitih formulacija u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

4.8 *In vitro* gastrointestinalna digestija optimizovane formulacije mikroinkapsulata i biodostupnost fenolnih jedinjenja

Nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije (GID), praćena su odabrana fenolna jedinjenja (Tabela 4.10) radi procene njihove biodostupnosti, kao i radi procene funkcionalne efikasnosti optimizovane formulacije mikroinkapsulata. Među analiziranim jedinjenjima, katehin je pokazao najveću biodostupnost (12,58 %), zatim etil-galat (4,54 %) i epikatehin (1,73 %) (Slika 4.15). Veoma niska biodostupnost utvrđena je za galnu kiselinu i procijanidin B2 (<1 %), dok preostala jedinjenja nisu pokazala detektabilnu biodostupnost, jer su u digestovanoj frakciji bila prisutna u tragovima (<LOQ ili <LOD) ili nisu bila detektovana. Ukupno posmatrano, sva praćena fenolna jedinjenja pokazala su nisku biodostupnost. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je zabeležena niska biodostupnost fenolnih jedinjenja, uključujući katehin, epikatehin, procijanidine, galnu kiselinu i njene derivate, nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije ekstrakata ili prahova semenki grožđa, kao i ekstrakata komine grožđa (Pešić et al., 2019; Laurent et al., 2007; Fernández & Labra, 2013; Chen et al., 2016).

Prethodna istraživanja ukazala su na to da biodostupnost fenolnih jedinjenja zavisi od više faktora, uključujući: (a) matriks hrane i njegove interakcije sa makronutrijentima, kao što su proteini, ugljeni hidrati, lipidi i dijetetska vlakna (Jakobek, 2015; Jakobek & Matić, 2019; Hiolle et al., 2020); (b) oslobađanje fenolnih jedinjenja iz matriksa i njihovu solubilizaciju tokom intestinalne faze (Alminger et al., 2014); (c) interakcije i formiranje kompleksa sa digestivnim enzimima i drugim komponentama prisutnim u gastrointestinalnom traktu (Podsędek et al., 2014) kao i (d) strukturne transformacije izazvane promenama pH vrednosti tokom digestije (Braga et al., 2018). Pokazano je da složeni prehrambeni matriksi, kao što su mleko, hleb, jogurt, proizvodi na bazi jaja i formule za odojčad, utiču na oslobađanje i rastvorljivost fenolnih jedinjenja i smanjuju biodostupnost ukupnih fenola, antocijana i/ili procijanidina nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije (Milinčić et al., 2022; Sengul et al., 2014; Pineda-Vadillo et al., 2016). Niska biodostupnost uočena u ovom istraživanju može biti povezana sa prisustvom proteina mleka, koji pokazuju izraženu sklonost ka interakcijama sa fenolnim jedinjenjima (Milinčić et al., 2022).



Slika 4.15. Biodostupnost (%) odabranih fenolnih jedinjenja nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije optimizovane formulacije mikroinkapsulata. Fenolna jedinjenja su kvantifikovana/semikvantifikovana pre i posle *in vitro* gastrointestinalne digestije, korišćenjem UHPLC-Q-ToF-MS: * Jedinjenja su kvantifikovana korišćenjem referentnih standarda; ^a Jedinjenja su semikvantifikovana korišćenjem galne kiseline kao standarda; ^b Jedinjenja su semikvantifikovana korišćenjem katehina kao standarda; ^c Jedinjenja su semikvantifikovana korišćenjem procijanidina B2 kao standarda.

Fenolna jedinjenja mogu ostati vezana u nerastvornoj frakciji i potencijalno postati dostupna tokom dalje digestije i mikrobiološkog metabolizma u kolonu (Jakobek & Matić, 2019). Sun et al., (2020) su pokazali visoku biodostupnost fenolnih jedinjenja iz vina nakon kolon faze digestije, kao i izraženu bilošku aktivnost.

4.9 Procena antioksidativne aktivnosti digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID

U Tabeli 4.16 prikazane su vrednosti sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (TPC), sposobnosti uklanjanja ABTS^{•+} radikala (ABTS), redukujuće moći (FRP), sadržaja ukupnih flavonoida (TFC) i sposobnosti heliranja jona gvožđa (CHE) optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon gastrointestinalne digestije.

Tabela 4.16. Vrednosti različitih testova za procenu antioksidativne aktivnosti i vrednosti za sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u optimizovanoj formulaciji mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID.

Uzorak	TPC (mg/g GAE)	ABTS (mg/g TE)	FRP (mg/g AAE)	TFC (mg/g CE)	CHE (mg/g EDTA)
TM/ME/GPE	18,38 ± 0,20	15,85 ± 0,30	31,98 ± 0,69	38,83 ± 2,03	40,34 ± 0,04

Skraćenice: optimizovana formulacija mikroinkapsulata – TM/ME/GPE; TPC - Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja; GAE – ekvivalent galne kiseline; ABTS - sposobnost uklanjanja ABTS^{•+} radikala; TE – ekvivalent Trolox; FRP - moć redukcije

gvožđa; AAE – ekvivalent askorbinske kiseline; TFC – sadržaj ukupnih flavonoida; CE – ekvivalent katehina; CHE – sposobnost heliranja jona gvožđa; EDTA – ekvivalent etilendiamintetrasirćetne kiseline.

Nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije optimizovane formulacije mikroinkapsulata, dobijene vrednosti ukazuju da digestovani uzorak zadržava merljiv antioksidativni potencijal (Tabela 4.16) i pored toga što su pojedinačna fenolna jedinjenja u rastvornoj frakciji nakon digestije bila detektovana u niskim koncentracijama ili nisu bila detektovana. Kada se ove vrednosti digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata uporede sa vrednostima antioksidativne aktivnosti pre digestije (odjeljak 4.7.1), može se zaključiti da su nakon digestije povećani TPC, sposobnost uklanjanja ABTS^{•+} radikala i sposobnost heliranja Fe²⁺ jona. Ovakav rezultat je povoljan sa aspekta funkcionalnosti ispitane optimizovane formulacije mikroinkapsulata, jer pokazuje da se njen antioksidativni potencijal tokom digestije ne samo zadržava, već za pojedine parametre biva poboljšán. Ovakav rezultat pokazuje da ukupni antioksidativni odgovor digestata ne mora nužno da prati samo koncentraciju pojedinačnih fenolnih jedinjenja određenih hromatografskim metodama, već može biti posledica zajedničkog doprinosa oslobođenih fenolnih jedinjenja, peptida nastalih digestijom proteina mleka, amino-kiselina i komponenti digestivanog koktela koje imaju redukujući potencijal. Milinčić et al. (2022), sugerišu da TPC vrednosti (određene Folin-Ciocalteu metodom) za digestovanu frakciju kozjeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa delimično mogu pripisati i interferenciji laktoze, enzima, peptida i amino-kiselina nastalih tokom *in vitro* digestije, a ne isključivo prisustvu nativnih fenolnih jedinjenja.

Slično zapažanje je i u ovom slučaju, nakon digestije TM/ME/GPE mikroinkapsulata, iako se deo pojedinačnih fenolnih jedinjenja gubi, transformiše ili zadržava u nerastvornoj frakciji. U studiji Milinčić et al. (2022) digestovani uzorak mleko/ekstrakt semenke imao je značajno viši TPC u odnosu na digestovano mleko bez ekstrakta, što su autori povezali sa oslobađanjem fenolnih jedinjenja iz ekstrakta tokom digestije, ali su istovremeno ukazali da digestivni koktel i oslobođeni peptidi takođe doprinose ukupnoj Folin-Ciocalteu reaktivnosti. Visoka vrednost TFC od $38,83 \pm 2,03$ mg CE/g ukazuje da digestovana optimizovana formulacija mikroinkapsulata prvenstveno sadrži flavan-3-ole (pokazana njihova biodostupnost) i etil-galat koji doprinose sadržaju ukupnih flavonoida.

ABTS^{•+} vrednost ($15,85 \pm 0,30$ mg TE/g) pokazuje da digestovana optimizovana formulacija mikroinkapsulata poseduje sposobnost neutralizacije ABTS^{•+} radikal-katjona. Kod kozjeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke grožđa, Milinčić et al. (2022) su takođe pokazali da digestovani uzorci imaju bolju ABTS^{•+} aktivnost u odnosu na nedigestovane, a povećanje su povezali sa oslobađanjem fenolnih jedinjenja, kao i bioaktivnih peptida i amino-kiselina tokom hidrolize proteina mleka. Sličan efekat digestije mlečne matrice opisan je i kod termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka obogaćenog polenom, gde su Kostić et al. (2021) pokazali da nakon *in vitro* digestije ukupno iskorišćenje fenolnih jedinjenja iznosi 30,71 %, ali da je proizvod i nakon digestije zadržao dobru antioksidativnu aktivnost, uključujući sposobnost neutralizacije ABTS^{•+} radikala i heliranje Fe²⁺ jona. U ovom radu navedeno je da digestija može smanjiti ukupni antioksidativni kapacitet za oko 20 % u odnosu na početni uzorak, ali da digestovani inkapsulat na bazi kozjeg mleka obogan polenom i dalje predstavlja funkcionalnu formulaciju čijoj funkcionalnosti doprinose oslobođena fenolna jedinjenja i proteinski hidrolizati (oligopeptidi). Dobijena vrednost za FRP ($31,98 \pm 0,69$ mg AAE/g) je ukazala na izraženu redukciju sposobnost digestovane frakcije optimizovane formulacije mikroinkapsulata. Ovaj rezultat pokazuje da i fenolna jedinjenja iz ekstrakta semenke grožđa i peptidi oslobođeni digestijom mlečnih proteina mogu doprineti redukcionalnoj aktivnosti, što su takođe pokazali autori Milinčić et al. (2022). Ovi autori sugerišu da je formulacija kozjeg mleka sa ekstraktom imala značajno više TAC i FRP vrednosti u odnosu na kontrolni uzorak bez ekstrakta, upravo zbog prisustva fenolnih jedinjenja iz semenke grožđa. Vrednost za helirajuću sposobnost digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata je bila $40,34 \pm 0,04$ mg EDTA/g, što ukazuje na njegovu dobru helirajuću sposobnost. Dobra helirajuća aktivnost pre svega zavisi od proteina mleka i peptida koji su oslobođeni tokom gastrointestinalne digestije. Milinčić et al. (2022) su pokazali da digestovani

uzorci kozjeg mleka i kozjeg mleka obogaćenog ekstraktom semenke imaju značajno veću Fe^{2+} -helirajuću sposobnost u odnosu na odgovarajuće nedigestovane uzorke, pri čemu su ovakav porast objasnili oslobađanjem peptida koji imaju dobar helirajući kapacitet. Elejalde et al. (2024) su pokazali da TPC i antioksidativni kapacitet ekstrakata semenke grožđa opadaju nakon gastrointestinalne digestije, ali da digestovani ekstrakti i dalje zadržavaju antioksidativni potencijal i ukazuju na biodostupnost fenolnih jedinjenja. Proteini mleka mogu istovremeno delovati kao nosači fenolnih jedinjenja i kao izvor antioksidativnih peptida. Pregledni rad Ma et al. (2024) naglašava da interakcije kazeina sa fenolnim jedinjenjima uslovljavaju rastvorljivost, biodostupnost, emulgujuća svojstva i antioksidativni kapacitet formulacije. Proteini mleka mogu stupati u interakcije sa fenolnim jedinjenjima i sa polisaharidima, i da formirani kompleksi zavise od pH, temperature, odnosa komponenata, i da ovo može modifikovati sastav digestovane frakcije koja prolazi kroz nagle promene pH i enzimske uslove tokom digestije (Ma et al., 2024).

Konačno, optimizovana formulacija mikroinkapsulata je kompleksna smeša različitih makro/mikro-konstituenata, a njena antioksidativna aktivnost nakon digestije ne zavisi samo od oslobođenih fenolnih jedinjenja, već od ukupne interakcije između proteina mleka, komponenti ekstrakta gljive jablanovače i digestijom oslobođenih peptida i amino-kiselina.

4.10 Procena antimikrobne aktivnosti digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID

Za digestovanu optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata utvrđena je izražena antibakterijska aktivnost, pri čemu su MIK vrednosti bile u opsegu 0,25 - 2,00, a MBK vrednosti 0,50 – 4,00 (Tabela 4.17). Najveća osetljivost zabeležena je kod *L. monocytogenes* ATCC 13932 i ATCC 35152, za koje su dobijene najniže MIK vrednosti od 0,25, odnosno MBK od 0,50, dok je dobra aktivnost utvrđena i prema *B. cereus*, sa MIK/MBK vrednostima 0,50/1,00. Ovakav rezultat pokazuje da digestija nije dovela do gubitka antibakterijskog potencijala optimizovane formulacije mikroinkapsulata, već je kod pojedinih sojeva, naročito *L. monocytogenes*, aktivnost bila čak izraženija u odnosu na nedigestovani uzorak.

U poređenju sa vrednostima pre digestije, digestovana optimizovana formulacija mikroinkapsulata pokazala je znatno jaču aktivnost prema *L. monocytogenes* ATCC 13932, jer je MIK smanjen sa 1,75 na 0,25, a MBK sa 3,50 na 0,50. Sličan trend zabeležen je i kod *L. monocytogenes* ATCC 35152, gde u MIK/MBK vrednosti smanjene sa 0,88/1,75 pre digestije na 0,25/0,50 nakon digestije. To ukazuje da gastrointestinalna digestija utiče na oslobađanje bioaktivnih molekula iz TM/ME/GPE formulacije koji imaju izraženu antimikrobnu aktivnost. Kod *E. coli* 0157:H7 ATCC 700728 takođe je zabeležena poboljšana aktivnost nakon digestije, jer su MIK/MBK vrednosti smanjene sa 1,75/3,50 na 1,00/2,00, dok su kod *E. coli* ATCC 25922 vrednosti nakon digestije iznosile 2,00/4,00, što je povoljnije u odnosu na nedigestovani uzorak, kod koga su iznosile 3,50/7,00. Nasuprot tome, kod *E. coli* ATCC 11775 aktivnost je ostala slična ili blago slabija nakon digestije, je su vrednosti promenjene sa 1,75/3,50 na 2,00/4,00. Ovi rezultati pokazuju da da antibakterijski efekat optimizovane formulacije mikroinkapsulata ne zavisi samo od vrste mikroorganizama, već i od soja, što je posebno važno kod enterobakterija i patogenih sojeva *E. coli*. U odnosu na E211, digestovana optimizovana formulacija mikroinkapsulata je pokazala bolju ili uporedivu aktivnost prema više ispitanih mikroorganizama. Prema *L. monocytogenes* ATCC 13932 i ATCC 35152 optimizovana formulacija mikroinkapsulata je imala niže MIC vrednosti (0,25) u odnosu na E211 (0,50), dok je prema *S. aureus* ATCC 11632 digestovana optimizovana formulacija mikroinkapsulata bila aktivnija od E211 na nivou MIC vrednosti (2,00 prema 4,00). Sa druge strane, E211 je bio efikasniji prema pojedinim Gram-negativnim bakterijama, naročito *E. coli* ATCC 11775 i *E. coli* ATCC 25922, što ukazuje da optimizovana formulacija mikroinkapsulata ne deluje jednako snažno prema svim testiranim bakterijama, već ispoljava selektivniju antibakterijsku aktivnost.

Tabela 4.17. Antibakterijska aktivnost digestovane frakcije optimizovanog mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID (mg mL⁻¹).

		<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 13932)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 15313)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19111)	<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 35152)	<i>E. cloacae</i> (ATCC 45040)	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi (ATCC 13311)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	<i>E. coli</i> O157:H7 (ATCC 700728)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 11632)	<i>B. cereus</i> (izolat iz hrane)	<i>L. monocytogenes</i> (NCTC 7974)
Digestovana frakcija TM/ME/GPE	MIK	0.25	1.00	1.00	0.25	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	0.50	1.00
	MBK	0.50	2.00	2.00	0.50	4.00	4.00	4.00	2.00	4.00	4.00	1.00	2.00
E211	MIK	0.50	0.50	1.00	0.50	2.00	1.00	0.50	1.00	1.00	4.00	0.50	1.00
	MBK	1.00	1.00	2.00	1.00	4.00	2.00	1.00	2.00	2.00	4.00	0.50	2.00

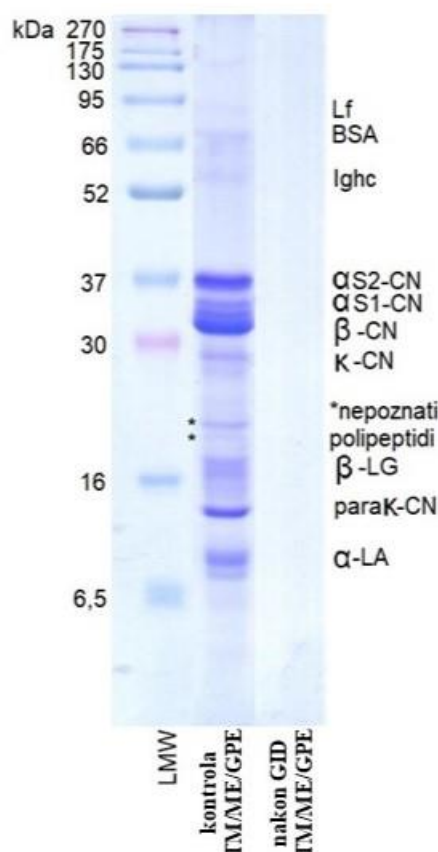
Skraćenice: E211 – natrijum benzoat; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija; MBK – minimalna baktericidna koncentracija.

Caponio et al. (2022) su pokazali da digestovani ekstrakti komine grožđa mogu inhibirati rast patogena kao što su *E. coli*, *Bacillus megaterium* i *L. monocytogenes*, pri čemu su istakli da gastrointestinalna digestija ne mora nužno da poništi biološku aktivnost polifenolih jedinjenja, već može promeniti njihov profil i funkcionalni efekat. Slično ponašanje je pokazala digestovana frakcija, jer su i nakon digestije zadržane niske MIK i MBK vrednosti prema *Listeria* sojevima i *B. cereus*. Sateriale et al. (2024) su u istraživanju hidroetanolnog ekstrakta komine grožđa sorte Aglianico pokazali antibakterijsko delovanje prema *S. aureus*, *B. cereus* i *E. coli*, pri čemu su MIK vrednosti ekstrakta bile u opsegu od 15 do 60 mg/mL, a MBK vrednosti od 40 do 60 mg/mL, zavisno od bakterijskog soja. Takođe navode da su ekstrakti komine grožđa ispoljili izraženije dejstvo prema Gram-pozitivnim bakterijama, posebno *S. aureus* i *B. cereus*, dok je *E. coli* bila manje osetljiva, a *S. enterica* serovar Typhi pokazala najveću otpornost. Poseban doprinos antibakterijskoj aktivnosti digestovane frakcije može poticati od proteinskih hidrolizata. Grigorean et al. (2024) su pokazali da se tokom *in vitro* digestije formula na bazi mleka oslobađaju brojni bioaktivni peptidi, koji imaju izražen antimikrobni potencijal, pre svega peptidi formirani u prvoj fazi digestije.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da digestovana frakcija TM/ME/GPE mikroinkapsulata pokazuje očuvanu antibakterijsku aktivnost, što predstavlja osnovu za dalja istraživanja njegove potencijalne primene kao prirodne antimikrobne komponente u funkcionalnim prehrambenim proizvodima.

4.11 Proteinski profil digestovane optimizovane formulacije mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID

SDS-PAGE analiza digestovane frakcije TM/ME/GPE mikroinkapsulata nakon *in vitro* GID nije pokazala vidljive proteinske trake, što ukazuje na njihovu intenzivnu hidrolizu tokom *in vitro* gastrointestinalne digestije praškaste formulacije mikroinkapsulata. Odsustvo traka najverovatnije je posledica razgradnje kazeina i serum proteina do niskomolekularnih peptida i amino-kiselina, koji nisu uočeni standardnom SDS-PAGE metodom. Slični nalazi o odsustvu traka tipičnih proteina mleka nakon *in vitro* GID, su prijavljeni u nekim prethodnim istraživanjima na sličnim formulacijama koje uključuju mleko i mleko-polifenol matrikse (Mulet-Cabero 2020; Hamzalioglu et al., 2023; Milinčić et al., 2022; Dai et al., 2022).



Slika 4.16. Elektroforetski profil digestovane frakcije optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE, analizirani SDS-R-PAGE elektroforezom. Skraćenice: LMW - standard molekulskih masa; α S1-CN (α S1-kazein); α S2-CN (α S2-kazein); β -CN (β -kazein); κ -CN (κ -kazein); para κ -CN (para κ -kazein); β -LG (β -laktoglobulini); α -LA (α -laktalbumin); BSA-serum albumin krvi; Ig-imunoglobulini; Lf-laktoferin; kontrola TM/ME/GPE - kontrolni TM/ME/GPE uzorak (pre digestije); nakon GID TM/ME/GPE - digestivana frakcija TM/ME/GPE mikroinkapsulata.

4.12 Fizičko-hemijska karakterizacija dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane funkcionalne formulacije mikroinkapsulata

U Tabeli 4.18. su prikazana fizičko-hemijska svojstva formulisane dehidrisane supe sa dodatkom optimizovanog funkcionalnog mikroinkapsulata TM/ME/GPE (S) i kontrolne dehidrisane supe u prahu (C). Uključivanje funkcionalnog mikroinkapsulata rezultiralo je manjim modifikacijama ukupnih karakteristika praha.

Kao što je prikazano u Tabeli 4.18, obogaćeni prah dehidrisane supe (S) pokazao je nešto niži sadržaj vlage u poređenju sa kontrolnim uzorkom praha dehidrisane supe (C), što ukazuje na to da je prisustvo ekstrakata smanjilo količinu zadržane vlage. U sličnim istraživanjima, prahovi dobijeni sprej-sušenjem ekstrakata pokožice grožđa i proteina surutke, kao i prahovi supe dobijeni sprej-sušenjem sa dodatkom gljive i surutke, pokazali su niske vrednosti sadržaja vlage (Oliveira et al., 2018; Singh et al., 2003). Nizak sadržaj vlage generalno je poželjan za instant supe koje se mogu čuvati na sobnoj temperaturi, a takođe je od ključnog značaja za obezbeđivanje mikrobiološke stabilnosti i produženog roka trajanja proizvoda (Jiang et al., 2025; Chen et al., 2021).

Tabela 4.18. Sadržaj vlage, rastvorljivost u vodi, brzina kvašenja, nasipna i tapkana gustina, indeks kompresibilnosti i Hausnerov koeficijent formuliranih dehidrisanih supa.

Uzorci	Sadržaj vlage (%)	Rastvorljivost u vodi (%)	Brzina kvašenja (s)	Nasipna gustina (g/mL)	Tapkana gustina (g/mL)	Indeks kompresibilnosti (CI, %)	Hausnerov koeficijent (HR)
S	13,34 ±0,13	46,5±0,05	57±3	0,40±0,00	0,57±0,00	30±1	1,43±0,01
C	14,02±0,11	47,1±0,04	57±3	0,45±0,00	0,59±0,00	23±0	1,29±0,00

Skraćenice: C dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka; S dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 30 % skrob i 17,50 % optimizovanog funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata.

Vrednosti za rastvorljivost u vodi su bile veoma slične za oba uzorka, i S i C, što ukazuje na to da dodatak funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata nije negativno uticalo na ponašanje praha tokom rastvaranja. Ovo sugerise da dominantne komponente matriksa, kao što su proteini mleka i skrob, određuju rastvorljivost formulacije, dok inkorporirani ekstrakti ne ometaju značajno ovo svojstvo. Slična zapažanja prijavljena su za višekomponentne prehrambene prahove, kod kojih prisustvo bioaktivnih jedinjenja ne mora nužno promeniti ukupnu rastvorljivost, ali može uticati na druge aspekte rehidracije (Jiang et al., 2025). Rastvorljivost u vodi od približno 47 % posledica je prisustva čvrstih sastojaka supe, kao što su crni luk, beli luk i crni biber, koji se disperguju u vodi. Kvašljivost je ostala praktično nepromenjena, što ukazuje na to da površinsko vlaženje uzorka S nije bilo značajno različito u odnosu na uzorak C. Kod obe supe primećeno je formiranje grudvica na površini vode, što se može pripisati slaboj sposobnosti vode da brzo ovlaži veoma fine prahove usled visokog površinskog napona (Jiang et al., 2025). Pored toga, dodatak funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata nije značajno izmenio površinska svojstva, kao što su hidrofilnost ili poroznost čestica, za koja je poznato da utiču na proces kvašenja. Prema literaturnim podacima, kvašljivost je uglavnom uslovljena površinskim svojstvima čestica praha, dok strukturne karakteristike, kao što su poroznost i veličina čestica, mogu dodatno uticati na ponašanje tokom rehidracije prahova na bazi mleka (Jiang et al., 2025). Odsustvo razlika između uzoraka ukazuje na to da su ovi parametri ostali u sličnom opsegu uprkos promenama u formulaciji. Slični rezultati za kvašljivost praha na bazi sojinog mleka prikazani su u istraživanju Jinapong et al. (2008).

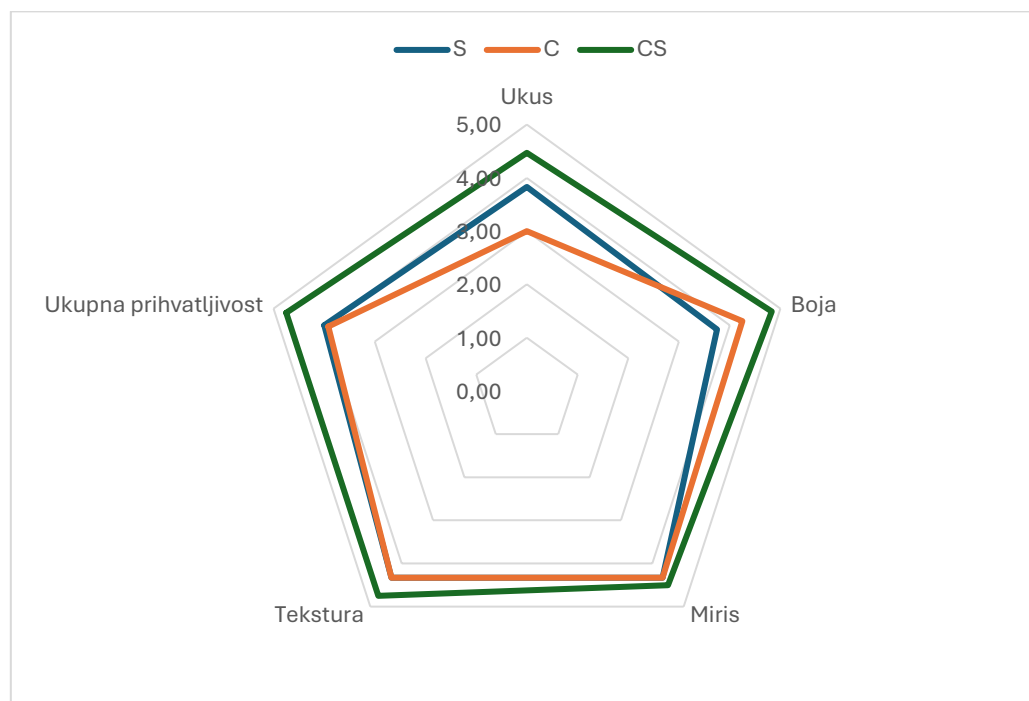
Nasipna i tapkana gustina utiču na potrebnu zapreminu skladištenja i imaju ključnu ulogu u određivanju troškova pakovanja i transporta sušenih proizvoda (Marković et al., 2024). Ove vrednosti se nisu značajno razlikovale između ispitivanih uzoraka. Vrednosti nasipne gustine većine prehrambenih prahova se kreću u rasponu od 0,30 - 0,80 g/cm³ (Marković et al., 2024). Na osnovu indeksa kompresibilnosti (CI), utvrđeno je da je protočnost ispitivanih prahova supe bila zadovoljavajuća, dok je kohezivnost kontrolne supe (C) na osnovu Hausnerovog koeficijenta bila srednja, a dehidrisane supe obogaćene mikroinkapsulatom (S) visoka (Jinapong et al., 2008; Gorle & Chopade, 2020). Zadovoljavajuća protočnost može se pripisati maloj veličini čestica, koje imaju veliku površinu po jedinici mase praha, što omogućava izraženije kohezivne sile koje se suprotstavljaju tečenju. Dodatak funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata menja veličinu čestica i njihova površinska svojstva, što dovodi do povećanja kohezivnih sila. Slična zapažanja prijavili su Jinapong et al. (2008).

4.13 Senzorna analiza dehidrisane supe sa dodatkom optimizovane funkcionalne formulacije mikroinkapsulata

Pripremljena supa sa optimizovanom mešavinom dodatog dehidrisanog povrća i funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata upoređena je sa komercijalnom supom koja je na tržištu već dugu niz godina. Komercijalna supa (CS), pored dehidrisanog povrća, sadrži pojačivače ukusa (mononatrijum

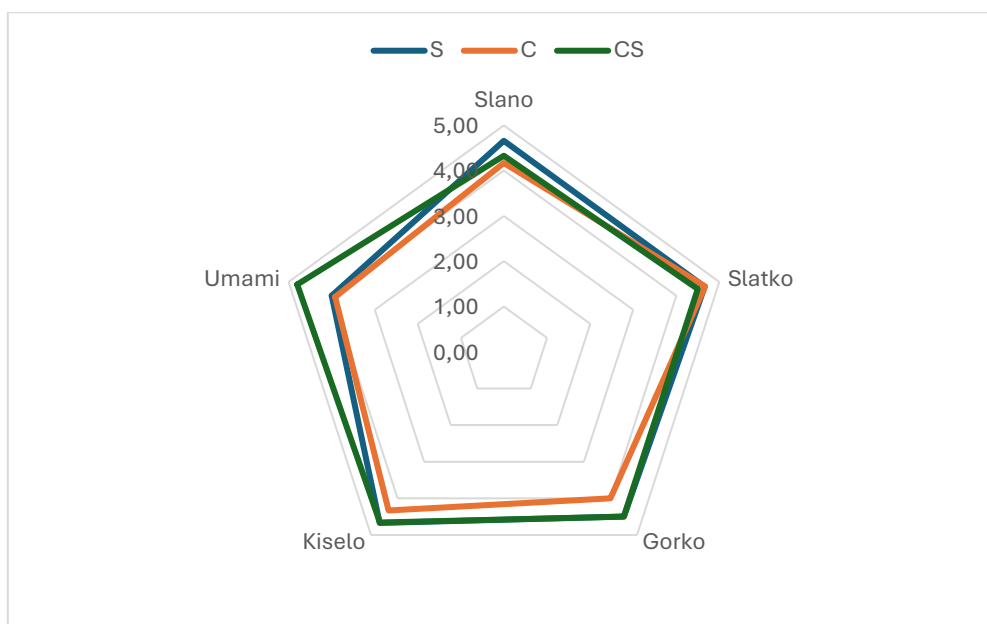
glutamat, MSG), dodate arome, dekstrozu radi postizanja blage slatkoće, hidrolizate mlečnih proteina koji doprinose punoći ukusa, kao i niz različitih začina (peršun, origano, lovorov list, biber, vlašac, bosiljak, ruzmarin i sl.), kako je navedeno u odeljku 3.9. u materijalima i metodama.

4.13.1 Ukupna ocena kvaliteta



Slika 4.17. Rezultati senzorne analize formulisanih dehidrisanih supa dobijenih ukupnom ocenom kvaliteta. S dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 30 % skrob i 17,50 % optimizovanog funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata; C dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka; CS dehidrisana supa – „Quik e-free” instant supa od povrća bez masti, Aleva, Srbija.

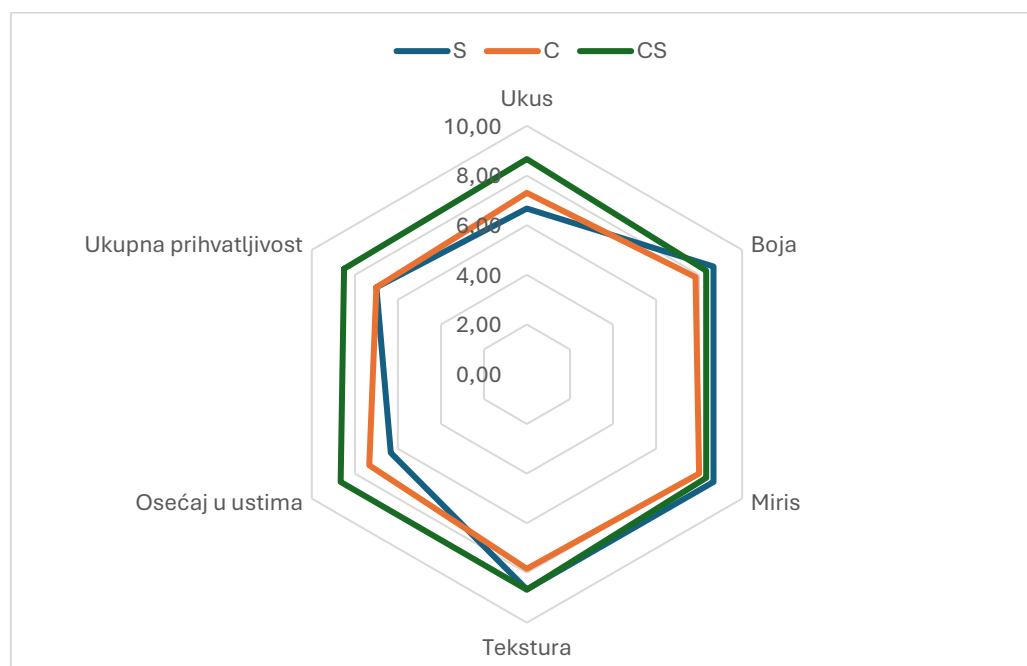
Rezultati senzorne analize, dobijeni ukupnom ocenom kvaliteta, prikazani su na slici 4.17. Kao što se i očekivalo, komercijalna supa (CS) je dobila najviše ocene za boju, miris, ukus, teksturu i ukupnu prihvatljivost. Formulirana supa sa dodatkom funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata (S) postigla je ukupnu ocenu prihvatljivosti od 4,00 od maksimalnih 5,00, što predstavlja obećavajući rezultat za novu formulaciju. Ocene za miris i teksturu (4,33) su bile iste kod C i kod S dehidrisane supe, a što se tiče ocene za ukupnu prihvatljivost, malo bolju ocenu je dobila S dehidrisana supa (4,00) u odnosu na kontrolnu C dehidrisanu supu (3,92).



Slika 4.18. Rezultati senzorne analize formulisanih dehidrisanih supa dobijenih ukupnom ocenom kvaliteta za parametre ukusa. S dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 30 % skrob i 17,50 % optimizovanog funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata; C dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka; CS dehidrisana supa – „Quik e-free” instant supa od povrća bez masti, Aleva, Srbija.

Prilikom upoređivanja ocena pojedinačnih atributa ukusa (slano, slatko, gorko, kiselo, umami ukus) kod uzoraka dehidrisanih supa (Slika 4.18), primećuje se da su svi uzorci pokazali slične ocene za ove četiri navedene karakteristike ukusa. Jedini izuzetak odnosio se na umami ukus. U ovom slučaju, komercijalni uzorak supe (CS) postigao je najvišu ocenu (4,80), u poređenju sa ocenom 4,00 za uzorak S dehidrisane supe, što ukazuje na to da je komercijalna supa pružila intenzivniji umami osećaj. Gljive predstavljaju značajan izvor jedinjenja koja doprinose umami ukusu, među kojima se posebno izdvajaju slobodne aminokiseline (glutaminska kiselina) i ribonukleotidi, a njihovo prisustvo može doprineti izraženijem umami ukusu prehrambenih proizvoda u koje se inkorporiraju (Panda et al., 2025). U skladu sa tim, S dehidrisana supa je pokazala izraženiji umami ukus u odnosu na kontrolni uzorak (C). Zapravo, ekstrakti gljiva ispitivani su kao prirodni pojačivači ukusa i mogu predstavljati potencijalnu alternativu mononatrijum glutamatu (MSG) zahvaljujući bogatom umami ukusu i aromatskom profilu (Haron & Low, 2024). Termin umami označava prijatan i pun ukus koji se, za razliku od ostalih osnovnih ukusa, percipira duž cele površine jezika i predstavlja ključnu ulogu u formiranju bogatog i prijatnog ukusa mnogih namirnica.

4.13.2 Ocena prihvatljivosti od strane potrošača



Slika 4.19. Rezultati senzorne analize formulisanih dehidrisanih supa dobijenih ocenom prihvatljivosti od strane potrošača. S dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 30 % skrob i 17,50 % optimizovanog funkcionalnog TM/ME/GPE mikroinkapsulata; C dehidrisana supa - 12,25 % beli luk u prahu; 12,25 % crni luk u prahu; 10,50 % crni biber; 11,90 % morska so; 35,60 % skrob i 17,50 % termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka; CS dehidrisana supa – „Quik e-free” instant supa od povrća bez masti, Aleva, Srbija.

Primenom hedonske skale od 9 tačaka (Slika 4.19), formulisana S dehidrisana supa je dobila najvišu ocenu za boju i miris (8,67), dok je njena tekstura bila veoma slična teksturi komercijalnog uzorka (CS). Međutim, kada je reč o osećaju u ustima, najvišu ocenu ostvario je komercijalni uzorak (8,66), zatim sledi dehidrisana supa koja sadrži samo obezmašćeno kozje mleko (C) (7,33), dok je S dehidrisana supa dobila najnižu ocenu u poređenju sa njima. Ukupna prihvatljivost bila je najveća za uzorak CS, kao što se i očekivalo, dok su formulisane S i C dehidrisane supe postigle ocenu 7,00 za ukupnu prihvatljivost. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je svaki dodati sastojak doprineo senzornim svojstvima supe na specifičan način. Dodavanje ekstrakta semenke grožđa u formulaciju S dehidrisane supe poboljšao je teksturu supe, što je u skladu sa istraživanjima koja ukazuju da fenolna jedinjenja iz semenke grožđa mogu poboljšati ili očuvati teksturna svojstva obogaćenih prehrambenih proizvoda (Sekhavatizadeh et al., 2023). Uključivanje ekstrakta gljiva u S dehidrisanu supu intenzivirao je aromatični profil supe, što se može povezati sa prisustvom karakterističnih isparljivih jedinjenja (ketone, estre) koja doprinose izraženijim prijatnim aromama (Tokarczyk et al., 2023; Haron et al., 2024). Pored toga, inkorporacija obezmašćenog kozjeg mleka doprinela je ukusu i osećaju u ustima.

Zahvaljujući navedenim doprinosima, formulisane dehidrisane supe su ostvarile relativno visoke prosečne ocene na senzornom testiranju. Posebno je značajno istaći da su obe primenjene metode senzorne analize pokazale sličan obrazac ocenjivanja među uzorcima. Komercijalna supa (CS) je dobila najvišu ocenu, što je bilo očekivano s obzirom na prisustvo sastojaka koji doprinose intenzivnijem ukusu. Ispitivanje prihvatljivosti od strane potrošača i ukupne ocene kvaliteta dali su veoma slične rezultate za sve uzorke, što ukazuje na sličan obrazac ocenjivanja primenjenim metodama senzorne analize. Važno je naglasiti da je nova formulisana supa sa dodatkom funkcionalnog mikroinkapsulata pokazala dobre rezultate u senzornim ispitivanjima (izražen umami

ukus, izraženiji miris i poboljšana tekstura), i to bez dodatnih masti, veštačkih aroma ili pojačivača ukusa. Formulirana supa sa dodatkom funkcionalnog mikroinkapsulata može predstavljati osnovu za razvoj inovativnog proizvoda, koji obezbeđuje prihvatljiv ukus i teksturu. Na taj način doprinosi unapređenju kvaliteta proizvoda, uz očuvanje koncepta „čiste deklaracije”, bez potrebe za dodatkom MSG ili drugih sintetičkih aditiva.

5 Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Vodeni ekstrakt *A. aegerita* sadržao je α - i β -glukane, fenolna jedinjenja, organske kiseline, njihove derivate i polipeptide i pokazao je antioksidativnu aktivnost testiranu kroz nekoliko antioksidativnih testova. SDS-R-PAGE analizom registrovano je 17 polipeptidnih traka, pri čemu su dominantne trake pripadale niskomolekulskim peptidima (od 35 do 14,4 kDa). Ovi rezultati ukazuju da ME predstavlja kompleksni sklop različitih bioaktivnih molekula koji doprinose njegovim funkcionalnim svojstvima.
- Ekstrakt semenke grožđa sorte Prokupac (GPE) odlikovao se složenim fenolnim profilom. UHPLC-QToF-MS analizom identifikovano je 78 fenolnih jedinjenja koji se mogu svrstati u sedam grupa. U ovom ekstraktu su bili najbrojniji derivati galne kiseline, flavan-3-oli i procijanidini; osim toga identifikovani su estri hidroksicinamiske i vinske kiseline, resveratrol i njegovi oligomeri, kao i flavonol aglikoni i glikozidi. Spektrofotometrijska karakterizacija dodatno je potvrdila visok sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, ukupnih flavonoida i posebno, ukupnih pro(anto)cijanidina.
- Ispitivana su sirovo i termički tretirano kozje mleko, i njegove frakcije (kazeini i serum proteini). Rezultati su pokazali najveću stabilnost emulzije i povoljan odnos emulgujuće aktivnosti i stabilnosti za termički tretirano obezmašćeno kozje mleko, zbog čega je odabrano za dalju optimizaciju formulacije bazirane na kozjem mleku obogaćene ekstraktima gljive *A. aegerita* i ekstrakta fermentisane semenke grožđa Prokupac.
- Primenom centralnog kompozitnog dizajna utvrđeno je da udeo ekstrakta semenke grožđa statistički značajno utiče na TPC, ABTS^{•+} i DPPH[•] svojstva optimizovane formulacije. Primenom funkcije poželjnosti definisan je optimalni sastav optimizovane formulacije mikroinkapsulata sa 0,50 % ME i 0,50 % GPE.
- U pogledu fizičko-hemijske karakterizacije, optimizovana formulacija mikroinkapsulata se razlikovala od kontrolnog uzorka. Za optimizovanu formulaciju mikroinkapsulata, DLS je pokazao polimodalnu raspodelu veličine čestica, SDS-R-PAGE izmenjen proteinski profil, a SEM nepravilnu, hrapavu i poroznu morfologiju liofilisanog praha. ATR-FTIR analiza je pokazala da se spektri kontrolnog mleka i optimizovanog inkapsulata ne razlikuju značajno, sa tipičnim trakama u proteinskom delu spektra. Ramanova spektroskopija se takođe fokusirala na proteinski deo spektra optimizovanog mikroinkapsulata, potvrđujući njegovu sličnost sa kontrolom; dok su spektri ekstrakta semenke i gljive pokazali veliki broj intenzivnih traka i šumova, što može biti posledica fluorescencije. UHPLC-QToF-MS analizom optimizovane formulacije mikroinkapsulata identifikovana su 44 jedinjenja, prvenstveno fenolnih jedinjenja, sa dominantnim sadržajem hidroksibenzoevih derivata (galne kiseline i njenih derivata), procijanidina i flavan-3-ola.
- U pogledu tehno-funkcionalnih svojstava, optimizovana formulacija mikroinkapsulata je imala nižu rastvorljivost od kontrolnog praha, nižu nasipnu i tapkanu gustinu i numerički kraće vreme kvašenja. Pošto su optimizovana formulacija mikroinkapsulata i kontrolni prah dobijeni različitim postupcima sušenja, razlike u gustini i kvašljivosti ne mogu se pripisati isključivo dodatku ekstrakata. Optimizovana formulacija mikroinkapsulata je pokazala lošija emulgujuća svojstva, ali povoljnija peniva svojstva u odnosu na kontrolu. Dodatak ekstrakata nije značajno uticao na analizirana svojstva optimizovanog mikroinkapsulata.

- Što se tiče funkcionalnih svojstava, optimizovana formulacija mikroinkapsulata je pokazala više vrednosti za TPC, ABTS⁺, DPPH[•], FRP i CHE u odnosu na kontrolni uzorak, čime je pokazana veća antioksidativna aktivnost. Ovi rezultati ukazuju na potencijalna funkcionalna svojstva optimizovanog mikroinkapsulata. Dalje, optimizovana formulacija mikroinkapsulata je ispoljila antibakterijsku, antifungalnu i antikandidalnu aktivnost prema ispitivanim sojevima. Osetljivost je zavisila od konkretnog mikroorganizma i soja, pri čemu je najveća osetljivost zabeležena kod *S. enterica* serovar Typhi, sa MIK vrednošću od 0,88 mg mL⁻¹ i MBK od 1,75 mg mL⁻¹. Antifungalna aktivnost bila je posebno izražena prema vrstama *P. verrucosum* var. *cyclopium*, *T. viride* i *A. ochraceus*, dok je značajan antikandidalni efekat registrovan prema *C. parapsilosis*, sa MIK vrednošću od svega 0,22 mg mL⁻¹. Dobijeni rezultati ukazuju na funkcionalni i antimikrobni potencijal optimizovane formulacije mikroinkapsulata.
- Nakon *in vitro* gastrointestinalne digestije većina identifikovanih fenolnih jedinjenja pokazala je nisku biodostupnost i prisustvo u digestovanoj (rastvornoj) frakciji. Najviša biodostupnost utvrđena je za katehin (12,58 %), zatim etil-galat (4,54 %) i epikatehin (1,73 %), dok su druga jedinjenja bila prisutna u veoma malim količinama ili nisu detektovana. Ovi rezultati ukazuju na efekat proteina kozjeg mleka kao nosača bioaktivnih jedinjenja; odnosno da proteinski matriks može značajno uticati na oslobađanje, rastvorljivost i stabilnost fenolnih jedinjenja tokom/nakon digestije.
- Digestovana frakcija optimizovanog mikroinkapsulata je za većinu testova pokazala poboljšan antioksidativni kapacitet nego nedigestovani (kontrolni) uzorci. Antioksidativna svojstva digestovane frakcije predstavljaju prvenstveno zajednički doprinos oslobođenih fenolnih jedinjenja, kao i peptida i amino-kiselina hidrolizovanih tokom digestije proteina mleka.
- Digestovana frakcija optimizovanog mikroinkapsulata je pokazala dobru antibakterijsku aktivnost kao i selektivnu aktivnost zavisnu od soja. Najizraženija aktivnost digestovane frakcije registrovana je prema pojedinim sojevima *L. monocytogenes*, kod kojih su MIK i MBK vrednosti bile niže u poređenju sa nedigestovanim uzorcima.
- Na SDS-R-PAGE elektroforegramu digestovana frakcija optimizovanog mikroinkapsulata nisu uočene tipične proteinske trake, što ukazuje na intenzivnu hidrolizu proteina tokom digestija i nastanak niskomolekulskih peptida i amino-kiselina koje nisu detektovane primenjenom metodom.
- Dodatak optimizovane funkcionalne formulacije mikroinkapsulata u model dehidrisane supe dovela je do ograničenih promena većine praćenih fizičko-hemijskih svojstava u odnosu na kontrolnu formulaciju. Dehidrisana supa sa dodatkom TM/ME/GPE funkcionalnog mikroinkapsulata je pokazala sledeće rezultate za: sadržaj vlage (13,34 ± 0,13 %), rastvorljivost (46,50 ± 0,05 %), vreme kvašenja (57 ± 3 s), nasipnu gustinu (0,40 g/mL), tapkanu gustinu (0,57 g/mL), indeks kompresibilnosti (30 ± 1 %) i Hausnerov koeficijent (1,43 ± 0,01). Ovi rezultati ukazuju da dodatak optimizovane formulacije mikroinkapsulata utiče/doprinosi dobijanju dehidrisanog proizvoda sa prihvatljivim fizičko-hemijskim svojstvima.
- Dehidrisana supa sa dodatkom TM/ME/GPE funkcionalnog mikroinkapsulata je pokazala dobru senzornu prihvatljivost. Ukupna ocena kvaliteta iznosila je 4,00 od maksimalnih 5,00,

dok su ocene za miris i teksturu iznosile 4,33. Ukupna prihvatljivost ove supe bila je nešto viša nego kod kontrolne supe, 4,00 prema 3,92. U testu prihvatljivosti od strane potrošača dehidrisana supa sa dodatkom TM/ME/GPE funkcionalnog mikroinkapsulata je ostvarila ukupnu ocenu od 7,00 na devetostepenoj hedonskoj skali, pri čemu su boja i miris ocenjeni sa čak 8,67. Komercijalna supa je u senzornom poređenju ostvarila najviše ocene, dok dobijeni rezultati podržavaju primenljivost optimizovane formulacije mikroinkapsulata u ispitivanom modelu dehidrisane supe uz izražen umami profil i bez dodatka veštačkih aroma ili pojačivača ukusa.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je u okviru ove doktorske disertacije uspešno razvijena i optimizovana funkcionalna formulacija mikroinkapsulata, koja objedinjuje nutritivne i funkcionalne karakteristike termički tretiranog obezmašćenog kozjeg mleka sa bioaktivnim potencijalom ekstrakta *A. aegerita* i ekstrakta semenke grožđa sorte Prokupac koji je dobar izvor fenolnih jedinjenja. Na kraju, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da razvijena optimizovana funkcionalna formulacija mikroinkapsulata predstavlja perspektivnu osnovu za primenu u dehidrisanim prehrambenim proizvodima, posebno u formulacijama u kojima su poželjni povećan antioksidativni i antimikrobni potencijal, uz zadržavanje prihvatljivih tehnoloških i senzorskih svojstava. Iako rezultati gastrointestinalne digestije ukazuju na ograničenu biodostupnost većine pojedinačnih fenolnih jedinjenja u digestovanoj frakciji, ova frakcija je zadržala antioksidativni i antimikrobni potencijal. Konačno, razvijena optimizovana i kompleksna funkcionalna formulacija mikroinkapsulata na bazi proteina kozjeg mleka obogaćena ekstraktima gljive i semeke grožđa uključuje iskorišćenje agroindustrijskih nus-proizvoda, što se uklapa u koncept cirkularne ekonomije, podstiče valorizaciju bioaktivnih jedinjenja iz nus-proizvoda, i predlaže primenu u dehidrisanim proizvodima, čime je ostvaren osnovni cilj ove doktorske disertacije.

6 Literatura

- Abreu, T., Sousa, P., Gonçalves, J., Hontman, N., Teixeira, J., Câmara, J.S., & Perestrelo, R. (2024). Grape Pomace as a Renewable Natural Biosource of Value-Added Compounds with Potential Food Industrial Applications. *Beverages*, 10(2), 45. <https://doi.org/10.3390/beverages10020045>
- Akbarbaglu, Z., Peighambaroust, S.H., Sarabandi, K., & Jafari, S.M. (2021). Spray Drying Encapsulation of Bioactive Compounds within Protein-Based Carriers; Different Options and Applications. *Food Chemistry*, 359, 129965. [10.1016/j.foodchem.2021.129965](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129965)
- Akshith, F.N.U., Mao, T., Kaushik, R., Poswal, V., & Deshwal, G.K. (2024). Global comprehensive review and meta-analysis of goat milk composition by location, publication year and lactation stage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 127, 105973. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105973>
- Akteke-Öztürk, B., Weber, G.W., Köksal, G. (2025). Mathematical analysis of desirability functions. *Central European Journal of Operations Research*, 34, 987-999. <https://doi.org/10.1007/s10100-025-00990-z>
- AlKaisy, Q.H., Al-Bedrani, D.I.J., Kadhim, D.H., & Saadi, A.M. (2023a). Effect of sheep's milk enrichment with dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder in yogurt quality characteristics. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 42, 51-59. UDC 637.146.3'632/638.04
- AlKaisy, Q.H., Al-Saadi, J.S., AL-Rikabi, A.K.J., Altemimi, A.B., Hesarinejad, M.A., & Abedelmaksoud, T.G. (2023b). Exploring the health benefits and functional properties of goat milk proteins. *Food Science & Nutrition*, 11(10), 5641–5656. [10.1002/fsn3.3531](https://doi.org/10.1002/fsn3.3531)
- Almanza-Oliveros, A., Bautista-Hernández, I., Castro-López, C., Aguilar-Zárate, P., Meza-Carranco, Z., Rojas, R., Michel, M.R., & Martínez-Ávila, G.C.G. (2024). Grape Pomace—Advances in Its Bioactivity, Health Benefits, and Food Applications. *Foods*, 13(4), 580. <https://doi.org/10.3390/foods13040580>
- Almeida, M.R., Oliveira, K., Stephani, R., & C. de Oliveira, L.F. (2011). Fourier-transform Raman analysis of milk powder: a potential method for rapid quality screening. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(7), 1548-1552. <https://doi.org/10.1002/jrs.2893>
- Alminger, M., Aura, A.M., Bohn, T., Dufour, C., El, S.N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M.C., McDougall, G.J., Requena, T., & Santos, C.N. (2014). *In Vitro* Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413-436. [10.1111/1541-4337.12081](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081)
- Angeloni, S., Marconi, R., Piatti, D., Caprioli, G., Tiecco, M., Sagratini, G., Alessandrini, L., & Ricciutelli, M. (2025). Italian White Truffle (*Tuber magnatum* Pico): Discovery of new molecules through untargeted UHPLC-QTOF-MS analysis. *Food Chemistry* 477, 143562. [10.1016/j.foodchem.2025.143562](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143562)
- Anson, N.M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A.M., Mattila, I., Lehtinen, P., Bast, A., Poutanen, K., & Haenen, G.R.M.M. (2009). Bioprocessing of Wheat Bran Improves in vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6148-6155. [10.1021/jf900492h](https://doi.org/10.1021/jf900492h)
- Antonić, B., Jančikova, S., Dordević, D., & Tremlova, B. (2020). Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*, 9(11), 1627. <https://doi.org/10.3390/foods9111627>

- Antúnez-Medina, J.R., Suárez-Jiménez, G.M., Ocano-Higuera, V.M., Tolano-Villaverde, I.J., Ornelas-Paz, J.J., Torres-Arreola, W., & Márquez-Ríos, E. (2025). Application of Ultrasound in Proteins: Physicochemical, Structural Changes, and Functional Properties with Emphasis on Foaming Properties. *Processes*, 13(6), 1646. <https://doi.org/10.3390/pr13061646>
- AOAC. (2005). Determination of Moisture, Ash, Protein and Fat, eighteenth ed. Official method of analysis of the Association of Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Atwaa, E.S.H., Shahein, M.R., Radwan, H.A., Mohammed, N.S., Aloraini, M.A., Albezrah, N.K.A., Alharbi, M.A., Sayed, H.H., Daoud, M.A., & Elmahallawy, E.K. (2022). Antimicrobial Activity of Some Plant Extracts and Their Applications in Homemade Tomato Paste and Pasteurized Cow Milk as Natural Preservatives. *Fermentation*, 8(9), 428. <https://doi.org/10.3390/fermentation8090428>
- Avramov, L., & Žunić, D. (2001). Posebno vinogradarstvo. Poljoprivredni fakultet, Beograd. ISBN, 86-80733-17-2
- Bains, A., Chawia, P., & Inbaraj, B.S. (2023). Evaluation of In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Quorum Sensing Activity of Edible Mushroom (*Agrocybe aegerita*). *Foods*, 12(19), 3562. <https://doi.org/10.3390/foods12193562>
- Barać, M., Čabrilo, S., Pešić, M., Stanojević, S., Zilić, S., Maćej, O., & Ristić, 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>
- Barriga-Sanchez, M., Hiparraguirre, C.H., & Rosales-Hartshorn, M. (2022). Chemical composition and mineral content of Black Borgoña (*Vitis labrusca* L.) grapes, pomace and seeds, and effects of conventional and non-conventional extraction methods on their antioxidant properties. *Food Science and Technology*, 42. 10.1590/fst.120021
- Bas, D., & Boyaci, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845. 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024
- Batinić, P., Jovanović, A., Stojković, D., Zengin, G., Cvijetić, I., Gašić, U., Čutović, N., Pešić, M.B., Milinčić, D.D., Carević, T., Marinković, A., Bugarski, B., & Marković, T. (2024). Phytochemical Analysis, Biological Activities, and Molecular Docking Studies of Root Extracts from *Paeonia* Species in Serbia. *Pharmaceuticals*, 17(4), 518. <https://doi.org/10.3390/ph17040518>
- Bauer Petrovska, B., Panov, S., Roganovic Zafirovska, D., & Kulevanova, S. (2004). Electrophoretic study of mushroom proteins. *Journal of Agriculture, Food and Environment*, 2, 148-153.
- Beres, C., Costa, G.N.S., Cabezudo, I., Silva-James, N.K., Teles, A.S.C., Cruz, A.P.G., Mellinger-Silva, C., Tonon, R.V., Cabral, L.M.C., & Freitas, S.P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management* 68, 581-594. 10.1016/j.wasman.2017.07.017
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., & Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977. 10.1016/j.talanta.2008.05.019
- Bhokariker, S., Gurumoorthi Pa, P., & Athmaselvi, K.A. (2025). Impact of Drying Techniques and Maltodextrin as a Carrier on the Flow Properties and Reconstitution Properties of Oat “milk” Powder.

Current Research in Nutrition and Food Science, 13, 889-899. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.13.2.24>

Bikmurzin, R., Bandzevičiūtė, R., Maršalka, A., Maneikis, A., & Kalėdienė, L. (2022). FT-IR Method Limitations for β -Glucan Analysis. *Molecules*, 27(14), 4616. <https://doi.org/10.3390/molecules27144616>

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, 248-254.

Braga, A.R.C., Murador, D.C., de Souza Mesquita, L.M., & de Rosso, V.V. (2018). Bioavailability of anthocyanins: Gaps in knowledge, challenges and future research. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 31-40. 10.1016/j.jfca.2017.07.031

Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2022). Polysaccharides as Carriers of Polyphenols: Comparison of Freeze-Drying and Spray-Drying as Encapsulation Techniques. *Molecules*, 27(16), 5069. <https://doi.org/10.3390/molecules27165069>

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. 10.1111/1471-0307.12429

Candioti, L.V., 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/10.1016/j.talanta.2014.01.034>

Cao, W., Li, L., Wang, J., Guo, W., Chen, W., Pan, L., & Li, D. (2025). Effects of Black Garlic Polyphenols on the Physicochemical Characteristics, Antioxidant Activity, and Sensory Evaluation of Yogurt. *Gels*, 11(7), 561. <https://doi.org/10.3390/gels11070561>

Caponio, G.R., Minervini, F., Tamma, G., Gambacorta, G., & De Angelis, M. (2023). Promising Application of Grape Pomace and Its Agri-Food Valorization: Source of Bioactive Molecules with Beneficial Effects. *Sustainability*, 15(11), 9075. <https://doi.org/10.3390/su15119075>

Caponio, G.R., Noviello, M., Calabrese, F.M., Gambacorta, G., Giannelli, G., & De Angelis, M. (2022). Effects of Grape Pomace Polyphenols and In Vitro Gastrointestinal Digestion on Antimicrobial Activity: Recovery of Bioactive Compounds. *Antioxidants*, 11(3), 567. <https://doi.org/10.3390/antiox11030567>

Casanova, F., Nascimento, L.G.L., Silva, N.F.N., de Carvalho, A.F., & Gaucheron, F. (2021). Interactions between caseins and food-derived bioactive molecules: A review. *Food Chemistry*, 359, 129820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129820>

Castilla, P., Echarri, R., Dávalos, A., Cerrato, F., Ortega, H., Teruel, J.L., Fernández Lucas, M., Gómez-Coronado, D., Ortuño, J., & Lasunción, M.A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(1), 252-262. doi:10.1093/ajcn/84.1.252

Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible Mushrooms and Beta-Glucans: Impact on Human Health. *Nutrients* 13(7), 2195. 10.3390/nu13072195

Chang, S.T., & Miles, P. (2004). Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. *CRC Press LLC*.

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, C., Zhang, M., Xu, B., & Chen, J. (2021). Improvement of the Quality of Solid Ingredients of Instant Soups: A Review. *Food Reviews International*, 39(3), 1333-1358. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1934000>

Chen, G.-L., Chen, S.-G., Chen, F., Xie, Y.-Q., Han, M.-D., Luo, C.-X., Zhao, Y.-Y., & Gao, Y.-Q. (2016). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of selected fruit seeds subjected to an *in vitro* digestion. *Journal of Functional Foods*, 20 317-331. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.003>

Chen, L., Chen, N., He, Q., Sun, Q., Gao, M.-R., & Zeng, W.-C. (2022). Effects of different phenolic compounds on the interfacial behaviour of casein and the action mechanism. *Food Research International*, 162(3), 112110. [10.1016/j.foodres.2022.112110](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112110)

Chen, X., Wei, L., Mao, Y., Zhao, A., Pu, M., Liu, Y., & Wang, B. (2025). A Comparative Study of Ultrasound and Thermal Processing: Effects on Goat Milk Stability and Protein Structure. *Journal of Dairy Science*, 108(4), 3273-3286. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25918>

Chen, X., Zheng, R., Liu, R., & Li, L. (2020). Goat milk fermented by lactic acid bacteria modulates small intestinal microbiota and immune responses. *Journal of Functional Foods*, 65, 103744. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103744>

Chengolova, Z., Ivanov, Y., & Godjevargova, T. (2023). Comparison of Identification and Quantification of Polyphenolic Compounds in Skins and Seeds of Four Grape Varieties. *Molecules*, 28(10), 4061. <https://doi.org/10.3390/molecules28104061>

Chew, S.C., Tan, C.-H., Pui, L.P., Chong, P.N., Gunasekaran, B., & Nyam, K.L. (2019). Encapsulation Technologies: A Tool for Functional Foods Development. *International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering*, 8(5), 154-160.

CLSI. (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Approved Standard, 8th ed.; *CLSI Publication M07-A8*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.

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>

da Silva Júnior, M.E., Rolim Lemos Araújo, M.V., Silveira Martins, A.C., Santos Lima, M., da Silva, F.L.H., Converti, A., & Sucupira Maciel, M.I. (2023). Microencapsulation by spray-drying and freeze-drying of extract of phenolic compounds obtained from ciriguela peel. *Scientific reports*, 13, 15222.

- Dabetic, N., Todorovic, V., Malenovic, A., Sobajic, S., & Markovic, B. (2022). Optimization of Extraction and HPLC–MS/MS Profiling of Phenolic Compounds from Red Grape Seed Extracts Using Conventional and Deep Eutectic Solvents. *Antioxidants*, 11(8), 1595. 10.3390/antiox11081595
- Dai, Y., Yang, R., Yan, Y., Wu, Y., Meng, X., Yang, A., Wu, Z., Shi, L., Li, X., & Chen, H. (2022). Digestive stability and transport ability changes of β -lactoglobulin–catechin complexes by M cell model *in vitro*. *Frontiers in Nutrition*, 9, 955135. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.955135>
- Dang, V.B., Alsherbiny, M.A., Lin, R., Gao, Y., Li, C., & Bhuyan, D.J. (2024). Impact of a Functional Dairy Powder and Its Primary Component on the Growth of Pathogenic and Probiotic Gut Bacteria and Human Coronavirus 229E. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(17), 9353. <https://doi.org/10.3390/ijms25179353>
- 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*, 26(9), 2463. <https://doi.org/10.3390/molecules26092463>
- de Liz, G.R., Verruck, S., Machado Canella, M.H., Dantas, A., Garcia, S.G., Maran, B.M., Murakami, F.S., & Prudencio, E.S. (2020). Stability of bifidobacteria entrapped in goat's whey freeze concentrate and inulin as wall materials and powder properties. *Food Research International*, 127, 108752. 10.1016/j.foodres.2019.108752
- Delić, K., Milinčić, D.D., Petrović, A.V., Stanojević, S.P., Gancel, A.-L., Jourdes, M., Pešić, M.B., & Teissedre, P.-L. (2025). Procyanidins and Anthocyanins in Young and Aged Prokupac Wines: Evaluation of Their Reactivity Toward Salivary Proteins. *Foods*, 14(10), 1780. <https://doi.org/10.3390/foods14101780>
- Derbyshire, E.J. (2020). „Is There Scope for a Novel Mycelium Category of Proteins alongside Animals and Plants?“ *Foods*, 9(9), 1151. <https://doi.org/10.3390/foods9091151>
- Deshwal, G.K., Singh, A., 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(2), 110117. 10.1016/j.lwt.2020.110117
- Di Stefano, V., Buzzanca, C., Melilli, M.G., Indelicato, S., Mauro, M., Vazzana, M., Arizza, V., Lucarini, M., Durazzo, A., & Bongiorno, D. (2022). Polyphenol Characterization and Antioxidant Activity of Grape Seeds and Skins from Sicily: A Preliminary Study. *Sustainability*, 14(11), 6702. <https://doi.org/10.3390/su14116702>
- Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., Dewitt, D., & Nair, M.G. (2008). Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Food Chemistry*, 108(1), 97-102. 10.1016/j.foodchem.2007.10.049dos
- dos Santos, W.M., Guimarães Gomes, A.C., de Caldas Nobre, M.S., de Souza Pereira, Á.M., dos Santos Pereira, E.V., Olbrich dos Santos, K.M., Florentino, E.R., & Alonso Buriti, F.C. (2023). Goat milk as a natural source of bioactive compounds and strategies to enhance the amount of these beneficial components. *International Dairy Journal*, 137, 105515. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105515>

- Du, B., Peng, F., Xie, Y., Wang, H., Wu, J., Liu, C., & Yang, Y. (2022). Optimization Extraction and Antioxidant Activity of Crude Polysaccharide from Chestnut Mushroom (*Agrocybe aegerita*) by Accelerated Solvent Extraction Combined with Response Surface Methodology (ASE-RSM). *Molecules*, 27(8), 2380. <https://doi.org/10.3390/molecules27082380>
- Du, B., Zhu, F., & Xu, B. (2018). An insight into the anti-inflammatory properties of edible and medicinal mushrooms. *Journal of Functional Foods*, 47, 334-342. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.003>
- 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/10.1016/j.lwt.2021.112753>
- Duque Henao, S.L., Urrego, S.A., Cano, A.M., & Higueta, E.A. (2018). Randomized Clinical Trial for the Evaluation of Immune Modulation by Yogurt Enriched with β -Glucans from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), in Children from Medellin, Colombia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(8), 705-716. 10.1615/IntJMedMushrooms.2018026986
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E.B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A.A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 1-23. doi:10.1002/ptr.6419
- Dordević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Engineering Reviews* 452-490. 10.1007/s12393-014-9106-7
- Ebrahimi, P., Bayram, I., Mihaylova, D., & Lante, A. (2025). A Strategy to Minimize the Chlorophyll Content in the Phenolic Extract of Sugar Beet Leaves: Can this Extract Work as a Natural Antioxidant in Vegetable Oils? *Food and Bioprocess Technology*, 18 2493-2506. <https://doi.org/10.1007/s11947-024-03601-y>
- Elejalde, E., Carmen Villarán, M., Esquivel, A., & Alonso, R.M. (2024). Bioaccessibility and Antioxidant Capacity of Grape Seed and Grape Skin Phenolic Compounds After Simulated In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Plant Foods for Human Nutrition*, 79, 432-439. <https://doi.org/10.1007/s11130-024-01164-z>
- Elkatry, H.O., Ahmed, A.R., El-Beltagi, H.S., Mohamed, H.I., & Eshak, N.S. (2022). Biological Activities of Grape Seed By-Products and Their Potential Use as Natural Sources of Food Additives in the Production of Balady Bread. *Foods*, 11(13), 1948. <https://doi.org/10.3390/foods11131948>
- Falsafi, S.R., Sebastian, J., Colussi, R., Ávila do Nascimento, L., Kemerli-Kalbaran, T., Yildirim-Yalcin, M., Garcia-Galicia, I.A., Sahin, S., & Alarcon-Rojo, A.D. (2025). Recent Advances in the Characterization of Food Biomacromolecules: Polysaccharide, Protein, and Lipid. *Food Science & Nutrition*, 13(7), e70523. 10.1002/fsn3.70523
- Feei Ma, Z., & Zhang, H. (2017). Phytochemical Constituents, Health Benefits, And Industrial Applications of Grape Seeds: A Mini-Review. *Antioxidants*, 6(3), 71. 10.3390/antiox6030071

- Fernandes, A., Mateus, N., & de Freitas, V. (2023). Polyphenol-Dietary Fiber Conjugates from Fruits and Vegetables: Nature and Biological Fate in a Food and Nutrition Perspective. *Foods*, 12(5), 1052. <https://doi.org/10.3390/foods12051052>
- Fernández, K., & Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139 196-202. 10.1016/j.foodchem.2013.01.021
- Ferreira-Santos, P., Nobre, C., Rodrigues, R.M., Genisheva, Z., Botelho, C., & Teixeira, J.A. (2024). Extraction of phenolic compounds from grape pomace using ohmic heating: Chemical composition, bioactivity and bioaccessibility. *Food Chemistry*, 137780. 10.1016/j.foodchem.2023.137780
- Ferrer-Gallego, R., & Silva, P. (2022). The Wine Industry By-Products: Applications for Food Industry and Health Benefits. *Antioxidants*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/antiox11102025>
- Fontana, A.R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds: Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003. 10.1021/jf402586f
- Francis, G.A., Jeyakumar, S.S., Ray, S., Supreeth, S., & Vashishth, R. (2025). Emerging roles of FTIR spectroscopy in toxic metal profiling: Innovations for food safety monitoring. *Food Safety and Risk* 12. <https://doi.org/10.1186/s40550-025-00119-9>
- Garcia-Lomillo, J., & Gonzalez-SanJose, M.L. (2017). Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 3-22. 10.1111/1541-4337.12238
- Gariboldi, M.B., Marras, E., Ferrario, N., Vivona, V., Prini, P., Vignati, F., & Perletti, G. (2023). Anti-Cancer Potential of Edible/Medicinal Mushrooms in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10120. 10.3390/ijms241210120
- Garić, M., Radojević, I., Nikolić, D., Rakonjac, V., Petrović, A., Ranković-Vasić, Z., Jakšić, D., & Ristić, M. (2024). Production and technological characteristics of the Prokupac wine variety in the Niš wine-growing region. *Proceedings*. 10.46793/SBT29.20MG
- Garrido, J. & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844-1858. 10.1016/j.foodres.2013.08.002
- Gođevac, D., Tešević, V., Veličković, M., Vujisić, Lj., Vajs, V., & Milosavljević, S. (2010). „Polyphenolic compounds in seeds from some grape cultivars grown in Serbia.“ *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(12), 1641–1652. 10.2298/JSC100519131G
- Gonzaga, M.L.C., Menezes, T.M.F., de Souza, J.R.R., Ricardo, N.M.P.S., & Soares, S.d.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>
- Gorle, A.P., & Chopade, S.S. (2020). Liquisolid Technology: Preparation, Characterization and Applications. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 10, 295-307. 10.22270/jddt.v10i3-s.4067

- Goula, A.M. & Adamopoulos, K.G. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 639-652. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.001>
- Grigorean, G., Du, X., Kuhfeld, R., Haberl, E.M., & Lönnnerdal, Bo. (2024). Effect of In Vitro Digestion on Bioactive Peptides Related to Immune and Gut Health in Intact Cow's Milk and Hydrolyzed Protein-Based Infant Formulas. *Nutrients*, 16(19), 3268. 10.3390/nu16193268
- Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., & Prior, R.L. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(12), 1272-1280. 10.1002/jms.541
- Gülçin, İ. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86, 345–391. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0774-2>
- Halabi, A., Deglaire, A., Henriet, M., Violleau, F., Burel, A., Bouhallab, S., Dupont, D., & Croguennec, T. (2020). Structural characterization of heat-induced protein aggregates in model infant milk formulas. *Food Hydrocolloids*, 107(9) 105928. 10.1016/j.foodhyd.2020.105928
- Hamzalioglu, A., Tagliamonte, S., Gökmen, V., & Vitaglione, P. (2023). Casein–phenol interactions occur during digestion and affect bioactive peptide and phenol bioaccessibility. *Food & Function*, 14(20), 9457-9469. <https://doi.org/10.1039/d3fo02630b>
- Haron, H., & Low, W.T. (2024). The Potential of Mushroom Seasoning as an Alternative to Monosodium Glutamate: Market Survey, Consumer Survey, and Sensory Evaluation. *Journal of Food Quality & Hazards Control*, 11(4), 253-262. <http://jfqhc.ssu.ac.ir/article-1-1177-en.html>
- Hiolle, M., Lechevalier, V., Floury, J., Boulier-Monthéan, N., Prioul, C., Dupont, D., & Nau, F. (2020). In vitro digestion of complex foods: How microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. *Food Research International*, 128 108817. 10.1016/j.foodres.2019.108817
- Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>
- 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* 379-385. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.005>
- Ivanov, Y., Atanasova, M., & Godjevargova, T. (2025a). Nutritional and Functional Values of Grape Seed Flour and Extract for Production of Antioxidative Dietary Supplements and Functional Foods. *Molecules*, 30(9), 2029. <https://doi.org/10.3390/molecules30092029>
- Ivanov, Y., Godjevargova, T., Atanasova, M., & Nakov, G. (2025b). The Effect of Grape Seed Extract on Lipid Oxidation, Color Change, and Microbial Growth in a Beef–Pork Sausage Model System. *Molecules*, 30(8), 1739
- Jabłońska-Ryś, E. (2025). Fortifying Yogurt with Edible Mushrooms: Bioactive Compounds and Product Properties. *Applied Sciences*, 15(24), 12949. <https://doi.org/10.3390/app152412949>
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567. 10.1016/j.foodchem.2014.12.013

- Jakobek, L., & Matić, P. (2019). Non-covalent dietary fiber—Polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 235-247. 10.1016/j.tifs.2018.11.024
- Jakšić, N. (2018). Tehno-funkcionalna svojstva proteinskih frakcija kozjeg mleka. Master rad, Univerzitet u Beogradu.
- Jasińska, A., Siwulski, M., & Sobieralski, K. (2012). Mycelium Growth and Yielding of Black Poplar Mushroom-*Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. on Different Substrates. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2(9), 1040-1047.
- Jiang, H., Zhang, N., Xie, L., Li, G., Chen, L., & Liao, Z. (2025). A Comprehensive Review of the Rehydration of Instant Powders: Mechanisms, Influencing Factors, and Improvement Strategies. *Foods*, 14(16), 2883. <https://doi.org/10.3390/foods14162883>
- Jinapong, N., Supphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 84(2), 194-205. 10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032
- Junior, T.K., de Moura, C., Cruz, T.M., Marques, M.B., do Carmo, M.A.V., Deolindo, C.T.P., Daguer, H., Azevedo, L., & Granato, D. (2023). Optimization of the Green Chemistry-like Extraction of Phenolic Compounds from Grape (*Vitis labrusca* L.) and Blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Seeds with Concomitant Biological and Antioxidant Activity Assessments. *Plants*, 12(14), 2618. <https://doi.org/10.3390/plants12142618>
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2), 209-218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5960>
- Kalušević, A.M. (2017a). Mikroinkapsulacija bioaktivnih jedinjenja iz sporednih proizvoda prehrambene industrije. *Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu*.
- Kalušević, A.M., Lević, S.M., Čalija, B.R., Milić, J.R., Pavlović, V.B., Bugarski, B.M., & Nedović, V. (2017b). Effects of different carrier materials on physicochemical properties of microencapsulated grape skin extract. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3411-3420. 10.1007/s13197-017-2790-6
- Kalušević, A., Lević, S., Čalija, B., Pantić, M., Belović, M., Pavlović, V., Bugarski, B., Milić, J., Žilić, S., & Nedović, V. (2017). Microencapsulation of anthocyanin-rich black soybean coat extract by spray drying using maltodextrin, gum Arabic and skimmed milk powder. *Journal of Microencapsulation*, 34(5), 475-487. 10.1080/02652048.2017.1354939
- Kandylis, P., Dimitrellou, D., & Moschakis, T. (2021). Recent applications of grapes and their derivatives in dairy products. *Trends in Food Science & Technology*, 114(6), 696-711. 10.1016/j.tifs.2021.05.029
- Kanik, Singh, B., Dhar, J. B., Jairath, G., Sharma, R., Gopinath, D., Sharma, N., & Mal, G. (2021). Antimicrobial Activity of Fermented Milk Containing Various Aqueous Herbal Extracts. *Acta Scientific Veterinary Sciences*, 3(12), 12-20.

- Karastergiou, A., Gancel, A.L., Jourdes, M., & Teissedre, P.L. (2024). Valorization of Grape Pomace: A Review of Phenolic Composition, Bioactivity, and Therapeutic Potential. *Antioxidants*, 13(9), 1131. 10.3390/antiox13091131
- Kiokias, S., & Oreopoulou, V. (2021). A review of the health protective effects of phenolic acids against a range of severe pathologic conditions (including coronavirus-based infections). *Molecules*, 26(17), 5405. 10.3390/molecules26175405
- 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. 10.17113/ftb.55.04.17.5123
- Kostić, A.Ž., Milinčić, D.D., Stanisavljević, N.S., Gašić, U.M., Lević, S., Kojić, M.O., Tešić, Ž.Lj., 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*, 129310. 10.1016/j.foodchem.2021.129310
- Kostić, M., Smiljković, M., Petrović, J., Glamočlija, J., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Ćirić, A., & Soković, M. (2017). Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom: *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food and Function*, 8(9), 3239–3249. 10.1039/c7fo00887b
- Krasteva, D., Ivanov, Y., Chengolova, Z., & Godjevargova, T. (2023). Antimicrobial Potential, Antioxidant Activity, and Phenolic Content of Grape Seed Extracts from Four Grape Varieties. *Microorganisms*, 11(2), 395. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020395>
- Kuck, L.S. & Noreña, C.P.Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chemistry*, 194 569-576. 10.1016/j.foodchem.2015.08.066
- Kumar, H., Bhardwaj, K., Sharma, R., Nepovimova, E., Cruz-Martins, N., Dhanjal, D.S., Singh, R., Chopra, C., Verma, R., Abd-Elsalam, K.A., Tapwal, A., Musilek, K., Kumar, D., & Kuča, K. (2021). Potential Usage of Edible Mushrooms and Their Residues to Retrieve Valuable Supplies for Industrial Applications. *Journal of Fungi*, 7(6), 427. <https://doi.org/10.3390/jof7060427>
- Kumla, J., Lumyong, S., & Suwannarach, N. (2025). Centesimal Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Commercial Edible Oyster Mushrooms at Different Maturity Stages in Northern Thailand. *Foods*, 14(20), 3511. <https://doi.org/10.3390/foods14203511>
- Kupradit, C., Ranok, A., Mangkalan, S., Khongla, C., & Musika, S. (2023). β -glucan and antioxidant activities of four edible mushroom extracts from Thailand. *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 202107285. 10.35495/ajab.2021.07.285
- Landi, N., Pacifico, S., Ragucci, S., Iglesias, R., Picolella, S., Amici, A., Di Giuseppe, A., & Di Mar, A. (2017). Purification, characterization and cytotoxicity assessment of Ageritin: The first ribotoxin from the Basidiomycete mushroom *Agrocybe aegerita*. *BBA-General Subjects*, 1861(5), 1113-1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.02.023>

- Laurent, C., Besançon, P., & Caporiccio, B. (2007). Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Food Chemistry*, 100(4), 1704-1712. 10.1016/j.foodchem.2005.10.016
- Lavelli, V., Sri Harsha, P.S.C., Torri, L., & Zeppa, G. (2014). Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: The effect of particle size on product quality. *Food Chemistry*, 152, 162-168. 10.1016/j.foodchem.2013.11.103
- Lee, S.B., Cosmas, B., & Park, H.D. (2020). The Antimutagenic and Antioxidant Activity of Fermented Milk Supplemented with *Cudrania tricuspidata* Powder. *Foods*, 9(12), 1762. <https://doi.org/10.3390/foods9121762>
- Lević, S.M. 2014a. Inkapsulacija aroma u karnauba vosku, alginatu i polivinil-alkoholu. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Lević, S., Kalušević, A., Đorđević, V., Bugarski, B., & Nedović, V. (2014b). Savremeni procesi inkapsulacije u tehnologiji hrane. *Hrana i ishrana*, 55, 7-12.
- Li, H., Zhao, T., Li, H., & Yu, J. (2021). Effect of Heat Treatment on the Property, Structure, and Aggregation of Skim Milk Proteins. *Food Chemistry*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714869>
- 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, Z., Zhou, Y., Zhao, G., Xu, C., Pan, J., Li, H., & Zou, Y. (2024). Impacts of Yield, Nutritional Value, and Amino Acid Contents during Short-Term Composting for the Substrate for *Agrocybe aegerita*. *Horticulturae*, 10(3), 234. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10030234>
- Lia, F., Caffari, M., Borg, M., & Attard, K. (2025). Authentication of Maltese Pork Meat Unveiling Insights Through ATR-FTIR and Chemometric Analysis. *Foods*, 14(20), 3510. <https://doi.org/10.3390/foods14203510>
- Liang, N., Zhao, Z., Curtis, J.M., & Gänzle, M.G. (2022). Antifungal cultures and metabolites of lactic acid bacteria for use in dairy fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 109938. <https://doi.org/10.7939/r3-a7gk-6s77>
- Libera, J., Latoch, A., & Wójciak, K.M. (2020). Utilization of Grape Seed Extract as a Natural Antioxidant in the Technology of Meat Products Inoculated with a Probiotic Strain of LAB. *Foods*, 9(1), 103. <https://doi.org/10.3390/foods9010103>
- Lima Nascimento, L.G., Odelli, D., Fernandes de Carvalho, A., Martins, E., Delaplace, G., Peres de sa Peixoto, P., Nogueira Silva, N.F., & Casanova, F. (2023). Combination of Milk and Plant Proteins to Develop Novel Food Systems: What Are the Limits? *Foods*, 12(12), 2385. <https://doi.org/10.3390/foods12122385>
- Lima, E.M.F., Vieira, A.D.S., Gombossy de Melo Franco, B.D., & Pinto, U.M. (2025). Effect of phenolic compounds on proteolytic activity and spoilage potential of *Pseudomonas aeruginosa* in milk. *International Dairy Journal*, 172, 106436. 10.1016/j.idairyj.2025.106436

- Lin, S., Ching, L.T., Lam, K., & Cheung, P.C.K. (2017). Anti-angiogenic effect of water extract from the fruiting body of *Agrocybe aegerita*. *LWT - Food Science and Technology* 75, 155-163. 10.1016/j.lwt.2016.08.044
- Lingua, M.S., Sabatino, M.E., Cuatrin, A., Salvucci, E., Blajman, J.E., Páez, R.B., Wunderlin, D.A., & Baroni, M.V. (2025). From waste to worth: stability, bioaccessibility, and cellular antioxidant activity of microencapsulated red grape pomace phenolics. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 105(13), 7497-7509. <https://doi.org/10.1002/jsfa.70010>
- Liu, X., Liu, D., Chen, Y., Zhong, R., Gao, L., Yang, C., Ai, C., El-Seedi, H.R. & Zhao, C. (2020). Physicochemical characterization of a polysaccharide from *Agrocybe aegerita* and its anti-ageing activity. *Carbohydrate Polymers* 236, 116056. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116056>
- Lo, K.M., & Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89(4), 533-539.
- Lolić, S. (2018). Biologija gljiva. *ResearchGate*.
- Lopes, J.d.C., Maduerira, J., Margaca, F.M.A., & Cabo Verde, S. (2025). Grape Pomace: A Review of Its Bioactive Phenolic Compounds, Health Benefits, and Applications. *Molecules*, 30(2), 362. <https://doi.org/10.3390/molecules30020362>
- Lucarini, M., Durazzo, A., Kiefer, J., Santini, A., Lombardi-Boccia, G., Souto, E.B., Romani, A., Lampe, A., Ferrari Nicoli, S., Gabrielli, P., Bevilacqua, N., Campo, M., Morassut, M., & Cecchini, F. (2020). Grape Seeds: Chromatographic Profile of Fatty Acids and Phenolic Compounds and Qualitative Analysis by FTIR-ATR Spectroscopy. *Foods*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.3390/foods9010010>
- Lučić, M., Potkonjak, N., Sredović Ignjatović, I., Lević, S., Dajić-Stevanović, Z., Kolašinac, S., Belović, M., Torbica, A., Zlatanović, I., Pavlović, V., & Onjia, A. (2023). A Influence of Ultrasonic and Chemical Pretreatments on Quality Attributes of Dried Pepper (*Capsicum annum*). *Foods*, 12, 2468. 10.3390/foods12132468
- Lučić, M., Sredović Ignjatović, I., Lević, S., Pećinar, I., Antić, M., Đurđić, S., & Onjia, A. (2022). Ultrasound-assisted extraction of essential and toxic elements from pepper in different ripening stages using Box–Behnken design. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(4) 16493. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16493>
- Ma, B., Al-Wraikat, M., Shu, Q., Yang, X., & Liu, Y. (2024). An Overview of Interactions between Goat Milk Casein and Other Food Components: Polysaccharides, Polyphenols, and Metal Ions. *Foods*, 13(18), 2903. <https://doi.org/10.3390/foods13182903>
- Macêdo de Medeiros, F.G., You, S.W., Hoskin, R.T., & Moncada, M. (2025). Spray dried protein concentrates from white button and oyster mushrooms produced by ultrasound-assisted alkaline extraction and isoelectric precipitation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(3), 1635-1650. 10.1002/jsfa.13940
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., & Pizzoferrato. (2004). Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* 84, 201-206. doi:10.1016/S0308-8146(03)00202-4
- Mao, T., Akshit, F., Matiwalage, I., Sasidharan, S., Alvarez, C.M., Wescombe, P., & Mohan, M.S. (2024). Preferential Binding of Polyphenols in Blackcurrant Extracts with Milk Proteins and the

Effects on the Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Polyphenols. *Foods*, 13(4), 515. <https://doi.org/10.3390/foods13040515>

Marković, J. M., Salević-Jelić, A.S., Milinčić, D.D., Gašić, U.M., Pavlović, V.B., Rabrenović, B.B., Pešić, M.B., Lević, S.M., Nedović, V.A., & Mihajlović, D.M. (2024). Encapsulated horseradish (*Armoracia rusticana* L.) root juice: Physicochemical characterization and the effects of its addition on the oxidative stability and quality of mayonnaise. *Journal of Food Engineering*, 381, 112189. 10.1016/j.jfoodeng.2024.112189

Marques Soutelino, M.E., de Oliveira Silva, A.C., & da Silva Rocha, R. (2024). Natural Antimicrobials in Dairy Products: Benefits, Challenges, and Future Trends. *Antibiotics*, 13(5), 415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050415>

Martinić, A., Kalušević, A., Lević, S., Nedović, V., Vojvodić Cebin, A., Karlović, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Žižek, K., & Komes, D. (2022). Microencapsulation of Dandelion (*Taraxacum officinale* L.) Leaf Extract by Spray Drying. *Food Technology & Biotechnology*, 60(2), 237-252. 10.17113/ftb.60.02.22.7384

Masoumi, B., Tabibiazar, M., Golchinfar, Z., Mohammadifar, M., Hamishehkar, H. (2024). A review of protein-phenolic acid interaction: reaction mechanisms and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(11), 3539-3555. 10.1080/10408398.2022.2132376

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. *Pharmaceuticals*, 14(8), 816. <https://doi.org/10.3390/ph14080816>

McGoverin, C.M., Clark, A.S.S., Holroyd, S.E., & Gordon, K.C. (2010). Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.05.014>

Metzger, M. (2022). Goat milk versus cow milk: A comparison. *Michigan State University Extension*.
Milinčić, D. (2023). Sporedni proizvodi vinske industrije kao izvor bioaktivnih jedinjenja: karakterizacija i mogućnost primene u prehrambenoj industriji. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.

Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Špirović Trifunović, B.D., Tešić, Ž.Lj., Tosti, T.B., Dramićanin, A.M., Barać, M.B., & Pešić, M.B. (2020). Grape seed flour of different grape pomaces: Fatty acid profile, soluble sugar profile and nutritirional value. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 85(3), 305-319. <https://doi.org/10.2298/JSC190713117M>

Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Gašić, U.M., Lević, S., Stanojević, S.P., Barać, M.B., Tešić, Ž.Lj., Nedović, V., & Pešić, M.B. (2021b). Skimmed Goats Milk Powder Enriched with Grape Pomace Seed Extract: Phenolics and Protein Characterizat on and Antioxidant Properties. *Biomolecules*, 11(7), 965. <https://doi.org/10.3390/biom11070965>

Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Kolašinac, S., Rac, V., Banjac, N., Lađarević, J., Lević, S., Pavlović, V.B., Stanojević, S.P., Nedović, V.A., & Pešić, M.B. (2024a). Goat milk powders enriched with grape pomace seed extract: Physical and techno-functional properties. *Food Hydrocolloids*, 146 109293. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109293>

- Milinčić, D.D., Sredović Ignjatović, I., Stojković, D., Petrović, J., Kostić, A.Ž., Glamočlija, J., Doroški Petković, A., Plečić, A., Lević, S., Rac, V., Pavlović, V.B., Stanojević, S.P., Nedović, V.A., & Pešić, M.B. (2025b). Goat's Skim Milk Enriched with *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini Mushroom Extract: Optimization, Physico-Chemical Characterization, and Evaluation of Techno-Functional, Biological and Antimicrobial Properties. *Foods*, 14(6), 1056. <https://doi.org/10.3390/foods14061056>
- Milinčić, D.D., Stanisavljević, N.S., Kostić, A.Ž., Gašić, U.M., Stanojević, S.P., Tešić, Ž.Lj., & Pešić, M.B. (2022). Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of Goat-Milk Powder Fortified with Grape-Pomace-Seed Extract after In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Antioxidants*, 11(11), 2164. <https://doi.org/10.3390/antiox11112164>
- Milinčić, D.D., Stanisavljević, N.S., Kostić, A.Ž., Soković Bajić, S., Kojić, M.O., Gašić, U.M., Barać, M.B., Stanojević, S.P., Tešić, Ž.Lj., & Pešić, M.B. (2021a). Phenolic compounds and biopotential of grape pomace extracts from Prokupac red grape variety. *LWT-Food Science and Technology*, 138, 110739. 10.1016/j.lwt.2020.110739
- Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Lević, S., Gašić, U.M., Božić, D.D., Suručić, R., Ilić, T.D., Nedović, V.A., Vidović, B.B., & Pešić, M.B. (2025a). Goats Milk Powder Enriched with Red (*Lycium barbarum* L.) and Black (*Lycium ruthenicum* Murray) Goji Berry Extracts: Chemical Characterization, Antioxidant Properties, and Prebiotic Activity. *Foods*, 14(1), 62. <https://doi.org/10.3390/foods14010062>
- Milinčić, D.D., Stanisavljević, N.S., Pešić, M.M., Kostić, A.Ž., Stanojević, S.P., & Pešić, M.B. (2025c). The Bioaccessibility of Grape-Derived Phenolic Compounds: An Overview. *Foods*, 14(4), 607. <https://doi.org/10.3390/foods14040607>
- Milinčić, D.D., Vidović, B.B., Gašić, U.M., Milenković, M., Kostić, A.Ž., Stanojević, S.P., Ilić, T., & Pešić, M.B. (2024b). A systematic UHPLC Q-ToF MS approach for the characterization of bioactive compounds from freeze-dried red goji berries (*L. barbarum* L.) grown in Serbia: Phenolic compounds and phenylamides. *Food Chemistry* 456, 140044. 10.1016/j.foodchem.2024.140044
- Moatsou, G. (2023). Heat treatment of goat milk – A review. *International Dairy Journal*, 139, 105569. 10.1016/j.idairyj.2022.105569
- 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>
- Morris, H.J., Llauradó, G., Beltrán, Y., Lebeque, Y., Bermúdez, R.C., García, N., Gaime-Perraud, I., & Moukha, S. (2017). The Use of Mushrooms in the Development of Functional Foods, Drugs, and Nutraceuticals. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. & Barros, L. (Eds). *Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications*, Wiley Blackwell, 123-157. <https://doi.org/10.1002/9781118944653.ch5>
- Mudgil, P., Alalawi, M., Alghaithi, M., Mustapha, A.T., & Maqsood, S. (2025). Modification of camel milk proteins through complexation with green solvent extracted date seed polyphenols: Effects on physiochemical, technofunctional properties and bioactive properties. *International Dairy Journal*, 164, 106188. 10.1016/j.idairyj.2025.106188

- Muhlack, A.R., Potumarthi, R., & Jeffery, W.D. (2017). Sustainable wineries through waste valorisation: A review of grape marc utilisation for value-added products. *Waste Management*, 72, 99-118. 10.1016/j.wasman.2017.11.011
- Mukdsi, M.C.A., Haro, C., Gonzales, S.N., & Medina, R.B. (2013). Functional goat milk cheese with feruloyl esterase activity. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 801-809. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.026>
- Mulet-Cabero, A.-I., Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M., Le Feunteun, S., Sarkar, A., Grundy, M. M.-L., Carrière, F., Golding, M., Dupont, D., Recio, I., Brodkorb, A., & Mackie, A. (2020). A standardised semi-dynamic in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 11(2), 1702-1720. 10.1039/c9fo01293a
- Muthu, N., & Shanmugasundaram, K. (2016). Proximate and mineral compositions of edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(1), 116-119.
- Najjar, Z., Hachem, M., Elbarbary, A., Ayyash, M., & Ali, A. H. (2026). Fermented goat milk enriched with milk thistle seed powder and its bioactive compounds: Chemical composition, color, texture, antioxidant activity, microbial quality, and volatile compound profile. *Journal of Dairy Science*, 109(2) 954-970. 10.3168/jds.2025-27535
- Natić, M., Zagorac Dabić, D., Gašić, U., Dojčinović, B., Ćirić, I., Relić, D., Todić, S., & Sredojević, M. (2021). Autochthonous and international grape varieties grown in Serbia - Phenolic and elemental composition. *Food Bioscience* 40, 100889. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100889>
- Nayik, G.A., Jagdale, Y.D., Gaikwad, S.A., Devkatte, A.N., Dar, A.H., Dezmirean, D.S., Bobis, O., Ranjha, M.M.A.N., Ansari, M.J., Hemeg, H.A., & Alotaibi, S.S. (2021). Recent Insights Into Processing Approaches and Potential Health Benefits of Goat Milk and Its Products: A Review. *Food Chemistry* 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.789117>
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Lević, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>
- Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T. & Bugarski, B. (2013). Encapsulation Systems in the Food Industry. *Advances in Food Process Engineering Research and Applications*, 229-253. 10.1007/978-1-4614-7906-2_13
- Nestler, G.N. (2002). Traditional Chinese Medicine. Complementary and Alternative Medicine. *Medical Clinics of North America*, 86 (1), 63-73. 10.1016/S0025-7125(03)00072-5
- Ngai, P.H., Zhao, Z., & Ng, T.R. (2005). Agrocybin an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindraceae*. *Peptides*, 26(2), 191–196. 10.1016/j.peptides.2004.09.011
- Niaura, G. (2006). Raman Spectroscopy in Analysis of Biomolecules. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0212>
- Nickless, E., & Holroyd, S. (2020). Raman imaging of protein in a model cheese system. *Journal of Spectral Imaging* 10.1255/jsi.2020.a9

- Nikhita, R., & Sachindra, N.M. (2021). Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. *Poultry Science*, 100(5), 101047. 10.1016/j.psj.2021.101047
- Nilsson, T., Martínez, E., Manresa, A., & Oliw, E.H. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of 7,10-dihydroxyoctadecenoic acid, its isotopomers, and other 7,10-dihydroxy fatty acids formed by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(6), 777-783. <https://doi.org/10.1002/rcm.4446>
- Ningsih, D.R., Raharjo, T.J., Haryadi, W., & Wikandari, R. (2023). Antifungal activity and identification of bioactive peptide from Etawa crossbreed goat (*Capra hircus*) milk protein hydrolyzed using trypsin enzyme. *Arabian Journal of Chemistry* 105249. 10.1016/j.arabjc.2023.105249
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., & Malm, A. (2014). Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 689–694. 10.1016/j.lwt.2014.05.041
- Oliveira, B.E., Junior, P.C.G., Cilli, L.P., Contini, L.R.F., Venturini, A.C., Yoshida, C.M.P., & Braga, M.B. (2018). Spray-drying of grape skin-whey protein concentrate mixture. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3693-3702. 10.1007/s13197-018-3299-3
- Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, P. J., Barrieu, F., Gaudillere, P. J., & Moing, A. (2002). Grape berry development: A review. *Vigne et vin publications internationales*, 36(3), 109-131. 10.20870/oeno-one.2002.36.3.970
- Omidiran, A.T., Odukoya, O.J., Akinbule, O.O., & Sobukola, O.P. (2023). Effect of microwave-assisted pre-drying and deep-fat-frying conditions on some quality attributes of orange fleshed sweetpotato chips. *Food Chemistry Advances*, 3, 100534. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100534>
- Osman, A., & Abd El-Wahed, E.M. (2019). The Effects of Crude Phenolic-Rich Extract from Mushroom (*Agaricus bisporus*) on Shelf-Life Extension and Quality Attributes of the Feta Like Cheese. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 10(4) 85-91.
- Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954-970. 10.1016/j.foodres.2013.02.009
- Padilla-González, G.F., Grosskopf, E., Sadgrove, N.J., & Simmonds, M.S.J. (2022). Chemical Diversity of Flavan-3-Ols in Grape Seeds: Modulating Factors and Quality Requirements. *Plants*, 11(6), 809. <https://doi.org/10.3390/plants11060809>
- Panda, J., Nath, P.C., Mishra, A.K., Rustagi, S., Nayak, D., Blundell, R., & Mohanta, Y.K. (2025). Mushroom: an emerging source for next generation meat analogues. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1638121. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1638121>
- Pantelić, M.M., Dabić Zagorac, D.Č., Davidović, S.M., Todić, S.R., Bešlić, Z.S., Gašić, U.M., Tešić, Ž.Lj., & Natić, M.M. (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in berry skin, pulp, and seeds in 13 grapevine varieties grown in Serbia. *Food Chemistry*, 211, 243-252. 10.1016/j.foodchem.2016.05.051

- Patial, K., & Ghosh, B.C. (2023). Process optimization of functional processed mozzarella cheese using response surface methodology. *International Dairy Journal*, 141, 105556. 10.1016/j.idairyj.2022.105556
- 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.
- Pellegrino, R.M., Blasi, F., Angelini, P., Ianni, F., Alabed, H.B.R., Emiliani, C., Venanzoni, R., & Cossignani, L. (2022). LC/MS Q-TOF Metabolomic Investigation of Amino Acids and Dipeptides in *Pleurotus ostreatus* Grown on Different Substrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(33), 10371-10382. 10.1021/acs.jafc.2c04197
- Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2014). Antioxidant activity of yogurt made from milk characterized by different casein haplotypes and fortified with chestnut and sulla honeys. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6662-6670. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7843>
- Pešić, M.B. (2011). Biohemijske karakteristike i tehnološka funkcionalna svojstva termički i enzimski tretiranih mleka različitog porekla. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Pešić, M.B., Barać, M.B., Stanojević, S.P., Ristić, N.M., Maćej, 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, 77-86. 10.1016/j.smallrumres.2012.06.013
- Pešić, M.B., Barać, M.B., Stanojević, S.P., & Vrvic, M.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. 10.1016/j.idairyj.2014.06.006
- Pešić, M.B., Barać, M.B., Stanojević, S.P., & Vrvic, M.M. (2016). Heat-Induced Casein–Whey Protein Interactions in Caprine Milk: Whether Are Similar to Bovine Milk? *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, 163-175. 10.1007/978-3-319-24040-4_9
- Pešić, M.B., Pešić, M.M., Bezbradica, J., Stanojević, A.B., Ivković, P., Milinčić, D.D., Demin, M., Kostić, A.Ž., Dojčinović, B., & Stanojević, S.P. (2023). Okara-Enriched Gluten-Free Bread: Nutritional, Antioxidant and Sensory Properties. *Molecules*, 28(10), 4098. <https://doi.org/10.3390/molecules28104098>
- Pešić, M.B., Milinčić, D.D., Kostić, A.Ž., Stanisavljević, N.S., Vukotić, G.N., Kojić, M.O., Gašić, U.M., Barać, M.B., Stanojević, S.P., Popović, D.A., Banjac, N.R., & Tešić, Ž.Lj. (2019). In vitro digestion of meat- and cereal-based food matrix enriched with grape extracts: How are polyphenol composition, bioaccessibility and antioxidant activity affected? *Food Chemistry*, 284, 28-44. 10.1016/j.foodchem.2019.01.107
- 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.
- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D., Ćirić, A., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., & Soković, M. (2015). Nutritional value, chemical composition, antioxidant activity and enrichment of cream cheese with chestnut mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6711-6718. 10.1007/s13197-015-1783-6

- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D., Nikolić, M., Ćirić, A., Fernandes, A., Ferreira, I.C.F.R., & Soković, M. (2014). Bioactive composition, antimicrobial activities and the influence of *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Food & Function*, 5(12), 3296-3303. 10.1039/c4fo00819g
- Petrović, J., Glamočlija, J., Milinčić, D.D., Doroški, A., Lević, S., Stanojević, S.P., & Kostić, A.Ž., Popović Minić, D.A., Vidović, B.B., Plečić, A., Nedović, V.A., Pešić, M.B., & Stojković, D. (2024). Comparative Chemical Analysis and Bioactive Properties of Aqueous and Glucan-Rich Extracts of Three Widely Appreciated Mushrooms: *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill and *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Vizzini. *Pharmaceuticals*, 17(9), 1153. <https://doi.org/10.3390/ph17091153>
- Pharmacopeia, European. (2014). Strasbourg, eight ed. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM).
- Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Dubiard, C.G., Cheynier, V., Meudec, E., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Tóth, T., Csavajda, É., Hingyi, H., Karakaya, S., Sibakov, J., Capozzi, F., Bardoni, A., & Dupont, D. (2016). In vitro digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. *Food Research International*, 88, 284-292. 10.1016/j.foodres.2016.01.029
- Podsędek, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., & Koziolkiewicz, M. (2014). In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4610-4617. 10.1021/jf5008264
- Ponnusamy, R.R. (2019). The Performance of Response Surface Methodology Based on the OLS and MM-Estimators for Second-Order Regression Model. *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 7, 342-347.
- Popović Minić, D.A. (2024). Funkcionalni aditivi na bazi proteina kozjeg mleka i ekstrakata gljiva iz rodova *Laetiporus* i *Agaricus*. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- 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. (2022). Goat milk proteins enriched with *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinem extracts: Electrophoretic, FTIR, DLS and microstructure characterization. *Food Chemistry* 402, 134299. 10.1016/j.foodchem.2022.134299
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna Nivetha, C., & Dinesh, R. (2013). Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 92(1) 604-611. 10.1016/j.carbpol.2012.09.020
- Pugliese, A., Cabassi, G., Chiavaro, E., Paciulli, M., Carini, E., & Mucchetti, G. (2017). Physical characterization of whole and skim dried milk powders. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3433-3442. 10.1007/s13197-017-2795-1
- Qin, Y.S., Jiang, H., Wang, C.F., Cheng, M., Wang, L.L., Huang, M.Y., Zhao, Q.X., & Jiang, H.H. (2021a). 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/10.3168/jds.2020-19454>

- Qin, Y., Cheng, M., Wang, L., Huang, M., Wang, J., & Wang, C. (2021b). Comparative study on the microstructure and functional properties of casein in goat milk processed by different methods. *International Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 1682-1689. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14789>
- Quintero-Cabello, K.P., Palafox-Rivera, P., Lugo-Flores, M.A., Gaitán-Hernández, R., González-Aguilar, G.A., Silva-Espinoza, B.A., Tortoledo-Ortiz, O., Ayala-Zavala, J.F., Monribot-Villanueva, J.L., & Guerrero-Analco, J.A. (2021). Contribution of bioactive compounds to the antioxidant capacity of the edible mushroom *Neolentinus lepideus*. *Chemistry & Biodiversity*, (7), e2100085. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100085>
- Radzki, W., Skrzypczak, K., Solowiej, B., Jabłońska-Ryś, E., & Gustaw, W. (2023). Properties of Yogurts Enriched with Crude Polysaccharides Extracted from *Pleurotus ostreatus* Cultivated Mushroom. *Foods*, 12(21), 4033. <https://doi.org/10.3390/foods12214033>
- Ranveer, R.C., Khanvilkar, A.M., & Sahoo, A.K. (2016). Carrier Materials for Encapsulation of Bio-active Components of Food. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 40(1), 62-73.
- 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/10.1016/j.smallrumres.2008.07.009>
- Rengel-Vargas, E., Rodriguez, A.J., Dominguez, R., Lorenzo, M.J., Sosa E.M., Andres, C.S., Rosmini, M., Perez-Alvarez, A.J., Teixeira, A. & Santos, M.E. (2021). Edible Mushrooms as a Natural Source of Food Ingredient/Additive Replacer. *Foods*, 10(11), 2687. <https://doi.org/10.3390/foods10112687>
- Rezaeian, S.H., Pourianfar, H.R., & Shahtahmasbi, S.H. (2022). Cultivation of black poplar mushroom, *Cyclocybe aegerita*, on woody and non-woody lignocellulosic substrates with a high biological efficiency. *Asian Journal of Mycology*, 5(1), 31-39.
- Ribas-Agustí, A., Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., Guàrdia, M.D., García-Regueiro, J.A., & Castellari, M. (2014). Stability of phenolic compounds in dry fermented sausages added with cocoa and grape seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 329-336. [10.1016/j.lwt.2013.12.046](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.046)
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J.C., Dias, M.M., Barros, L., Barreiro, F. & Ferreira, I.C.F.R. (2015a). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, 188, 612-618. [10.1016/j.foodchem.2015.05.061](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.061)
- Ribeiro, F.L., Ribani, H.R., Francisco, G.M.T., Soares, A.A., Pontarolo, R., & Haminiuk, C.W.I. (2015b). Profile of bioactive compounds from grape pomace (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) by spectrophotometric, chromatographic and spectral analyses. *Journal of Chromatography B*, 1007, 72-80. [10.1016/j.jchromb.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.005)
- Rodrigues Machado, A., Atatoprak, T., Santos, J., Alexandre, E.M.C., Pintado, M.E., Paiva, J.A.P., & Nunes, J. (2023). Potentialities of the Extraction Technologies and Use of Bioactive Compounds from Winery By-Products: A Review from a Circular Bioeconomy Perspective. *Applied sciences*, 13(13), 7754. <https://doi.org/10.3390/app13137754>

- Rosa, E., & Schwinden Prudencio, E. (2023). A comprehensive approach about comparison between drying technologies and powdered dairy products. *Food Research International*, 173(4), 113326. 10.1016/j.foodres.2023.113326
- Sabra, A., Neticadan, T., & Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chemistry*: X, 100149. 10.1016/j.fochx.2021.100149
- Sadiq, U., Gill, H., & Chandrapala, J. (2021). Casein micelles as an emerging delivery system for bioactive food components. *Foods*, 10(8), 1965. <https://doi.org/10.3390/foods10081965>
- Sady, S., Matuszak, L., & Błaszczuk, A. (2019). Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Chokeberry Pomace Using Response Surface Methodology. *Acta. Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 18(3), 249-256. 10.17306/J.AFS.0673
- Salević, A.S., Kalušević, A.M., Lević, S.M., & Nedović, V.A. (2018). Inkapsulacija bioaktivnih jedinjenja sporednih proizvoda prerade voća. *Journal of Agricultural Sciences*, 63, 113-137. <https://doi.org/10.2298/JAS1802113S>
- Samadi Varedesara, M., Ariaii, P., & Hesari, J. (2021). The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Science & Nutrition*, 9(4), 2180-2190. 10.1002/fsn3.2188
- 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. 10.1016/j.foodchem.2016.08.010
- Sateriale, D., Forgione, G., Di Rosario, M., Pagliuca, C., Colicchio, R., Salvatore, P., Paolucci, M., & Pagliarulo, C. (2024). Vine-Winery Byproducts as Precious Resource of Natural Antimicrobials: In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of Grape Pomace Extracts against Foodborne Pathogens. *Microorganisms*, 12(3), 437. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030437>
- Savić, M.D. (2014). Akumulacija i transformacija selena u industrijskim gljivama. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- See Toh, C.J.Y., Bi, X., Lee, H.W., Yeo, M.T.Y., & Henry, C.J. (2023). Is mushroom polysaccharide extract a better fat replacer than dried mushroom powder for food applications? *Sec. Food Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1111955>
- Sekhvatizadeh, S.S., Abadariyan, N., Ebrahimi, L., & Hasanzadeh, M. (2023). Effects of free and encapsulated *Siah-e-Samarghandi* grape seed extract on the physicochemical, textural, microbial, and sensorial properties of UF-Feta cheese. *Food Science & Nutrition*, 11(7), 3923-3938. 10.1002/fsn3.3378
- Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069-1079. 10.1016/j.foodres.2014.05.055

Shi, H., Freeman, K., Kawka, E., McHenry, M., & Guo, M. (2025). The Impact of Polymerized Whey Protein on the Microstructure, Probiotic Survivability, and Sensory Properties of Hemp Extract-Infused Goat Milk Yogurt. *Foods*, 14(1), 66. <https://doi.org/10.3390/foods14010066>

Shori, A.B. (2013). Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *Journal of Taibah University for Science*, 7(4), 202-208. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.06.003>

Silva, F.A., de Cassia Ramos do Egypto Queiroga, R., de Souza, E.L., Voss, G.B., da Silva Campelo Borges, G., dos Santos Lima, M., Pintado, M.M.E., & da Silva Vasconcelos, M.A. (2022). Incorporation of phenolic-rich ingredients from integral valorization of Isabel grape improves the nutritional, functional and sensory characteristics of probiotic goat milk yogurt. *Food Chemistry*, 369, 130957. [10.1016/j.foodchem.2021.130957](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130957)

Silva, J.T.d.P., Borges, M.H., de Souza, C.A.C., Fávaro-Trindade, C.S., Sobral, P.J.d.A., de Oliveira, A.L., & Martelli-Tosi, M. (2024). Grape Pomace Rich-Phenolics and Anthocyanins Extract: Production by Pressurized Liquid Extraction in Intermittent Process and Encapsulation by Spray-Drying. *Foods*, 13(2), 279. <https://doi.org/10.3390/foods13020279>

Silva, M., Lageiro, M., Ramos, A.C., Reboredo, F.H., & Gonçalves, E.M. (2025). Cultivated Mushrooms: A Comparative Study of Antioxidant Activity and Phenolic Content. *Biology and Life Sciences Forum*, 40(1), 13. [10.3390/blsf2024040013](https://doi.org/10.3390/blsf2024040013)

Silva, M., Zisu, B., & Chandrapala, J. (2021). Stability of oil–water primary emulsions stabilised with varying levels of casein and whey proteins affected by high-intensity ultrasound. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 897–908. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14737>

Silva, M.G., Lima de Paula, I., Stephani, R., Edwards, H.G.M., & Cappa de Oliveira, L.F. (2021). Raman spectroscopy in the quality analysis of dairy products: A literature review. *Journal of Raman Spectroscopy*, 52(12). <https://doi.org/10.1002/jrs.6214>

Simić, V.M. (2018). Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije polifenolnih jedinjenja iz ploda aronije ((*Aronia melanocarpa* L.). Univerzitet u Nišu, Doktorska disertacija.

Simonetti, G., Brasili, E., & Pasqua, G. (2020). Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. against Human Pathogens. *Molecules*, 25(16), 3748. [10.3390/molecules25163748](https://doi.org/10.3390/molecules25163748)

Singh, A., Saini, R.K., Kumar, A., Chawla, P., & Kaushik, R. (2025). Mushrooms as Nutritional Powerhouses: A Review of Their Bioactive Compounds, Health Benefits, and Value-Added Products. *Foods*, 14(5), 741. <https://doi.org/10.3390/foods14050741>

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. [10.1046/j.1365-2621.2003.00661.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00661.x)

Song, R., Liang, T., Shen, Q., Liu, J., Lu, Y., Tang, C., Chen, X., Hou, T., & Chen, Y. (2020). The optimization of production and characterization of antioxidant peptides from protein hydrolysates of *Agrocybe aegerita*. *LWT- Food Science and Technology*, 134, 109987. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109987>

- Sosnik, A. & Seremeta, K.P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 223, 40-54. 10.1016/j.cis.2015.05.003
- Sousa, Y.R.F., Medeiros, L.B., Pintado, M.M.E., & Queiroga, R.C.R.E. (2019). Goat milk oligosaccharides: Composition, analytical methods and bioactive and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology* 92, 152-161. 10.1016/j.tifs.2019.07.052
- Stabrauskiene, J., Pudziuvelyte, L., & Bernatoniene, J. (2024). Optimizing Encapsulation: Comparative Analysis of Spray-Drying and Freeze-Drying for Sustainable Recovery of Bioactive Compounds from *Citrus x paradisi* L. Peels. *Pharmaceuticals*, 17(5), 596. <https://doi.org/10.3390/ph17050596>
- Stajić, M. (2015). Nutritivna svojstva i medicinski potencijal makromiceta, Stanković, S. (Eds). Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Stanojević, S.P., Barać, M.B., Pešić, M.B., & Vucelić-Radović, B.V. (2020). Protein composition and textural properties of inulin-enriched tofu produced by hydrothermal process. *LWT - Food Science and Technology*, 126(4), 109309. 10.1016/j.lwt.2020.109309
- Stobiecka, M., Król, J., & Brodziak, A. (2022). Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*, 12(3), 245. <https://doi.org/10.3390/ani12030245>
- 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/10.1016/j.ijgfs.2020.100208>
- Sun, X., Cheng, X., Zhang, J., Ju, Y., Que, Z., Liao, X., Lao, F., Fang, Y., & Ma, T. (2020). Letting wine polyphenols functional: Estimation of wine polyphenols bioaccessibility under different drinking amount and drinking patterns. *Food Research International*, 127, 108704. 10.1016/j.foodres.2019.108704
- Šregelj, V. (2021). Inkapsulirani karotenoidi iz sporednog proizvoda prerade šargarepe u funkcionalnoj hrani. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu.
- Šuković, D., Knežević, B., Gašić, U., Sredojević, M., Ćirić, I., Todić, S., Mutić, J., & Tešić, Ž. (2020). Phenolic Profiles of Leaves, Grapes and Wine of Grapevine Variety Vranac (*Vitis vinifera* L.) from Montenegro. *Foods*, 9(2), 138. <https://doi.org/10.3390/foods9020138>
- Tahmaz, J. (2023). Encapsulation and Its Possible Application in the Technology of Ready-Made and Ready to Eat Food - A Review. *Agriconference* 335-350. 10.1007/978-3-031-47467-5_31
- 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. 10.1007/s11947-010-0394-5
- Taskin, O. (2020). Evaluation of Freeze Drying for Whole, Half Cut and Puree Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Heat and Mass Transfer*, 56(8), 2503-2513. 10.1007/s00231-020-02867-0

- Tehrani, M.H.H., Fakhrehoseini, E., Nejad, M.K., Mehregan, H., & Hakemi-Vala, M. (2012). Search for Proteins in the Liquid Extract of Edible Mushroom, *Agaricus bisporus*, and Studying their Antibacterial Effects. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1), 145-150
- Thakur, R., Biswal, P., Sari, T.P., Kumar, D., Sagar, N.A., Bhardwaj, S., Pandey, H.O., Chandratre, G.A., & Tarafdar, A. (2024). Therapeutic effect of goat milk and its value-addition: current status and way forward. *Journal of Food Science and Technology* 61(9), 1621-1631. 10.1007/s13197-023-05923-9
- Tian, M., Sun, X., Cheng, J., & Guo, M. (2023). Physicochemical and Functional Properties of Thermal-Induced Polymerized Goat Milk Whey Protein. *Foods*, 12(19), 3626. <https://doi.org/10.3390/foods12193626>
- Tokarczyk, G., Felisiak, K., Adamska, I., Przybylska, S., Hrebien-Filisińska, A., Biernacka, P., Bienkiewicz, G., & Tabaszewska, M. (2023). Effect of Oyster Mushroom Addition on Improving the Sensory Properties, Nutritional Value and Increasing the Antioxidant Potential of Carp Meat Burgers. *Molecules*, 28(19), 6975. <https://doi.org/10.3390/molecules28196975>
- 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. *Foods*, 10(8), 1812. <https://doi.org/10.3390/foods10081812>
- Tumbas Šaponjac, V., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Đilas, S., Petrović, J., Lončarević, I., Stajčić, S., & Vulić, J. (2016). Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: incorporation in cookies. *Food Chemistry*, 207, 27-33. 10.1016/j.foodchem.2016.03.082
- Turkmen, N. (2017). The Nutritional Value and Health Benefits of Goat Milk Components. *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*, 441-449. 10.1016/B978-0-12-809762-5.00035-8
- Unal, G. (2012). Antioxidant activity of commercial dairy products. *Agro Food Industry Hi Tech.*, 23(1), 39-42.
- Utvić, R.S., Jakšić, D.D., Savić, R.S., Petrović, M.S., Ristić, P.M., Vidanović, M.Z., & Mošić, S.I. (2024). Characteristics of grape must of perspective genotypes in autochthonous grapevine variety Prokupac. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 147, 81-93.
- Valková, V., Ďúranová, H., Falcimaigne-Cordin, A., Rossi, C., Nadaud, F., Nesterenko, A., Moncada, M., Orel, M., Ivanišová, E., Chlebová, Z., Gabríny, L., & Kačániová, M. (2022). Impact of Freeze- and Spray-Drying Microencapsulation Techniques on β -Glucan Powder Biological Activity: A Comparative Study. *Foods* 11(15), 2267. <https://doi.org/10.3390/foods11152267>
- 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*, 313905. 10.1155/2013/313905
- van de Langerijt, T.M., O'Mahony, J.A., & Crowley, S.V. (2023). Structural, Binding and Functional Properties of Milk Protein-Polyphenol Systems: A Review. *Molecules*, 28(5), 2288. <https://doi.org/10.3390/molecules28052288>

- Venkata Krishna, K., Madhappan Murugana, J., Khan, H., Kumarc, M., Veeramanikandand, V., Hatamleh, A.A., Abdullah Al-Dosarye, M., Venkatachalamf, K., & Balaji, P. (2023). Exploring the therapeutic potential of edible *Pleurotus* mushroom species for oxidative stress and diabetes management. *Journal of King Saud University*, 35(2), 102926. 10.1016/j.jksus.2023.102926
- 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/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
- Verma, A.K., Singh, T.P., Rajkumar, V., Chatli, M.K., Kushwah, T., Nanda, P.K., Curros, B., Lorenzo, J.M., & Das, A.K. (2026). Goat Milk: A Versatile Dairy Alternative with Unique Health Benefits and Functional Properties. *Food Reviews International* 42, 215-250. <https://doi.org/10.1080/87559129.2025.2479122>
- Verruck, S., Dantas, A., & Prudencio, E.S. (2019). Funcionalidade dos componentes do leite de cabra, recentes avanços para produtos lácteos funcionais e suas implicações para a saúde humana. *Journal of Functional Foods*, 52, 243-257. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.11.017>
- Vital, A.C.P., Croge, C., Gomes-da-Costa, S.M., & Matumoto-Pinto, 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>
- Vukojević, J. (2000). Praktikum iz mikologije i lihenologije. *NNK Internacional*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 1-244.
- Wang, C., You, Y., Huang, W., & Zhan J. (2024). The high-value and sustainable utilization of grape pomace: A review. *Food Chemistry: X*, 24, 101845. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101845>
- Wang, X., Zhao, Q., He, L., Shi, Y., Fan, J., Chen, Y., & Huang, A. (2022). Milk-clotting properties on bovine caseins of a novel cysteine peptidase from germinated *Moringa oleifera* seeds. *Journal of Dairy Science*, 105(5), 3770-3781. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21415>
- Wani, I.A., Sogi, D.S., Wani, A.A., & Gill, B.S. (2013). Physico-chemical and functional properties of flours from Indian kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 278-284. 10.1016/j.lwt.2013.02.006
- Weis, C.M.S.C., Gomes, M.M., Vicenzi, B.G., Fabiano, G.A., Lopes, J.O., da Silva dos Santos, P.D., Tormen, L., Santos, O.O., Bezzera, R.M.N., Antunes, A.E.C., Bertan, L.C., Costa, G.N., & Yamazaki, R.K. (2024). Effect of Adding Winemaking By-Product on the Characteristics of Petit Suisse Cheese Made with A2A2 Milk and Probiotic. *Fermentation*, 10(11), 570. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110570>
- Wen, C., Zhang, J., Qin, W., Gu, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Structure and functional properties of soy protein isolate-lentinan conjugates obtained in Maillard reaction by slit divergent ultrasonic assisted wet heating and the stability of oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 331, 127374. 10.1016/j.foodchem.2020.127374
- Wilkowska, A., Ambroziak, W., Czyżowska, A., & Adamiec, J. (2016). Effect of Microencapsulation by Spray-Drying and Freeze-Drying Technique on the Antioxidant Properties of Blueberry

(*Vaccinium myrtillus*) Juice Polyphenolic Compounds. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(1), 11-16. 10.1515/pjfn-2015-0015

Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of In Vitro Digestion on Composition, Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Food Polyphenols—A Non-Systematic Review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>

World Health Organization. (2011). Guideline: vitamin A supplementation in infants and children 6–59 months of age. ISBN 978 92 4 150176 7

World Health Organization. (2019). Technical note: quality and regulatory considerations for the use of vitamin A supplements in public health programmes for infants and children aged 6–59 months. ISBN 978–92–4–151630–3

Xia, E.Q., Deng, G.F., Guo, Y.J., & Li, H.B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), 622-646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

Yadav, K., Bajaj, R.K., Mandal, S., Saha, P., & Mann, B. (2018). Evaluation of total phenol content and antioxidant properties of encapsulated grape seed extract in yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 71(7), 96-104. 10.1111/1471-0307.12464

Yang, F., Fu, A., Meng, H., Liu, Y., & Bi, S. (2024). Non-volatile taste active compounds and umami evaluation of *Agrocybe aegerita* hydrolysates derived using different enzymes. *Food Bioscience*, 58, 103772. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103772>

Ye, L., Zhang, B., Yang, X., Li, X., Tan, W., & Zhang, X. (2023). Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry revealed the significantly different metabolic profiles of *Auricularia cornea* growing on weakly acidic and weakly alkaline substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, 69(7), 262-278. 10.1139/cjm-2022-0189.

Yu, J. & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221-237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x>

Yu, Z., Fu, S., Li, L., & Liu, Y. (2024). Quality characteristics of goat milk powder produced by freeze drying followed by UV-C radiation sterilization. *Food Chemistry: X*, 22, 101495. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101495>

Zahran, H.A., Catalkaya, G., Yenipazar, H., Capanoglu, E., & Şahin-Yeşilçubuk, N. (2023). Determination of the Optimum Conditions for Emulsification and Encapsulation of Echium Oil by Response Surface Methodology. *ACS Omega*, 8(31), 28249–28257. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01779>

Zdunić, G., Gođevac, D., Šavikin, K., Krivokuća, D., Mihailović, M., Pržić, Z., & Marković, N. (2019). Grape Seed Polyphenols and Fatty Acids of Autochthonous Prokupac Vine Variety from Serbia. *Chemistry & Biodiversity*, 16(7), 1900053. 10.1002/cbdv.201900053

- Zhang, Y., Mills, G.L., & Nair, M.G. (2003). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Phytomedicine*, 10(5), 386-390. 10.1078/0944-7113-00272
- Zhao, C., Sun, H., Tong, X., & Qi, Y. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Biochemical Society*, 374, 321-327. 10.1042/BJ20030300
- Zhao, L., Wang, J., & Mao, X. (2022). Composition and interfacial properties play key roles in different lipid digestion between goat and cow milk fat globules *in vitro*. *Food Chemistry* 374, 131538. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131538>
- 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/10.3168/jds.2019-17221>
- Zhou, D.-D., Li, J., Xiong, R.-G., Saimaiti, A., Huang, S.-Y., Wu, S.-X., Yang, Z.-J., Shang, A., Zhao, C.-N., Gan, R.-Y., & Li, H.-B. (2022). Bioactive Compounds, Health Benefits and Food Applications of Grape. *Foods*, 11(18), 2755. <https://doi.org/10.3390/foods11182755>
- Zhou, S., Zhang, X., Zhang, J., Zang, C., Fan, R., Wang, J., Guo, T., Han, R., & Yang, Y. (2025). Differences in physicochemical properties and proteomics analysis of spray- and freeze-dried milk powders from bovine, goat, and horse sources. *Journal of Dairy Science*, 108(2), 1367-1379. 10.3168/jds.2024-25146
- Zhou, Y., Wang, Q.Y., & Wang, S. (2020). Effects of rosemary extract, grape seed extract and green tea polyphenol on the formation of *N*-nitrosamines and quality of western-style smoked sausage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 14459. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14459>
- Zoffoli, J.P., & Latorre, B.A. (2011). Table grape (*Vitis vinifera* L.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits*, 179-272. 10.1533/9780857092885.179
- Zong, S., Liu, H., Zhang, J., Ming, S., Huang, T., Du, Y., & Liu, J. (2026). *Agrocybe aegerita* as a functional food: chemical composition and biological activities. *European Food Research and Technology* 252:201. <https://doi.org/10.1007/s00217-026-05105-9>

7 Prilozi

7.1 Tabele

Tabela S1. Regresione jednačine i drugi prateći parametri za standarde koji su korišćeni za kvantifikaciju ili semikvantifikaciju (uslovno) identifikovanih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu optimizovanom TM/ME/GPE mikroinkapsulatu i digestovanoj frakciji.

Standardi	Regresiona jednačina $Y = a \cdot X \pm b$	R^2	r	Linearni opseg (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
<i>Standardi fenolnih jedinjenja</i>						
Galna kiselina	$y = 28494044.8850 \cdot x + 114785.5339$	0.9996	0.9998	0.0039-0.25	0.006	0.019
Resveratrol	$y = 24658918.0674 \cdot x + 118898.1926$	0.9992	0.9996	0.0039-0.125	0.005	0.015
Naringenin	$y = 311153373.4202 \cdot x + 499627.5632$	0.9987	0.9993	0.0039-0.0625	0.003	0.010
Kampferol	$y = 294203327.5794 \cdot x + 156236.8726$	0.9998	0.9999	0.0039-0.0625	0.001	0.004
Katehin	$y = 43043679.1425 \cdot x + 143310.4885$	1.0000	1.0000	0.0039-0.125	0.001	0.003
Epikatehin	$y = 70882446.3869 \cdot x + 263231.7974$	0.9996	0.9998	0.0039-0.0625	0.002	0.005
Elaginska kiselina	$y = 73889226.5536 \cdot x + 386690.6613$	0.9997	0.9998	0.0039-0.25	0.006	0.017
Kvercetin	$y = 290676924.1270 \cdot x + 498112.4361$	0.9991	0.9995	0.0039-0.0625	0.003	0.008
Procijanidin B2	$y = 34320698.5984 \cdot x + 145091.6422$	1.0000	1.0000	0.0039-0.25	0.002	0.006
Procijanidin C1	$y = 15688495.6998 \cdot x + 152899.8761$	0.9986	0.9993	0.0039-0.25	0.012	0.037

Skraćenice: R^2 -koeficijent determinacije; r -koeficijent korelacije; LOD-limit detekcije (3:1 odnos signal-šum); LOQ-limit kvantifikacije (10:1 odnos signal-šum).

Jednačine:

$$r = \sqrt{R^2} \quad (a);$$

$$\text{LOD} = \frac{3.3xSEa}{S} \quad (b);$$

$$\text{LOQ} = \frac{10xSEa}{S} \quad (c);$$

Gde je; r - koeficijent korelacije; R^2 -koeficijent determinacije; LOD-limit detekcije; SEa- standardna greška odsečka na y-osi kalibracione prave; S- nagib kalibracione prave.

Tabela S2: Polipeptidni sastav (%) vodenog ekstrakta gljive *A. aegerita* određen denzitometrijom traka na SDS-R-PAGE elektroforegramu.

MW opsezi	Broj trake	MW (kDa)	A.aegerita
>66,2	1	177,1	2,07 ± 0,13
	2	132,3	1,00 ± 0,09
	3	113,5	1,74 ± 0,00
	4	86,1	1,60 ± 0,28
	5	73,8	2,32 ± 0,04 8,73
35-66,2	6	58,4	1,82 ± 0,19
	7	46,6	1,82 ± 0,04
	8	39,5	2,39 ± 0,27
	9	38,5	1,75 ± 0,05
			7,78
14,4-35	10	29,4	1,36 ± 0,27
	11	22,7	6,64 ± 0,38
	12	19,7	22,88 ± 0,80
	13	18,9	9,61 ± 0,39
	14	17,9	10,89 ± 0,49
	15	/	/
		16,9	7,10 ± 0,00 58,48
<14,4	16	<14,4	18,37 ± 0,10
	17	<14,4	6,64 ± 0,71 25,01

Tabela S3. Procenjeni regresioni koeficijenti i analiza varijanse za dizajn odgovora površine određivanja ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja (TPC)

Procenjeni regresioni koeficijenti						
Član	Koeficijent		Standardna greška koeficijenta		p-vrednost	
Konstanta	57,1845		5,496		0,000	
w(ME), %	0,7733		5,403		0,890	
w(GPE), %	19,4883		5,403		0,009	
w(ME) * w(ME)	2,1293		7,964		0,797	
w(GPE) * w(GPE)	11,5143		7,964		0,191	
w(ME) * w(GPE)	4,0650		6,618		0,558	
Analiza varijanse (ANOVA) za model odgovora površine						
Poreklo varijacije	SS	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	p-vrednost
Regresija	5	2851,79	2851,79	570,36	3,26	0,078
Linearna	2	2282,36	2282,36	1141,18	6,51	0,025
Kvadratna	2	503,33	503,33	251,67	1,44	0,300
Interakcija	1	66,10	66,10	66,10	0,38	0,558
Rezidualna greška	7	1226,23	1226,23	175,18		
Neinterpolisano	3	265,58	265,58	88,53	0,37	0,781
Greška	4	960,64	960,64	240,16		
Ukupno	12	4078,02				

Seq. SS - sekvencijalna suma kvadrata (zavisi od redosleda parametara); Adj. SS - usklađena suma kvadrata (nezavisna od redosleda parametara); Adj. MS – srednja vrednost kvadrata (SeqSS/SS); SS – stepen slobode

Tabela S4. Procenjeni regresioni koeficijenti i analiza varijanse za dizajn odgovora površine određivanja ABTS⁺.

Procenjeni regresioni koeficijenti						
Član	Koeficijent		Standardna greška koeficijenta		p-vrednost	
Konstanta	70,981		4,665		0,000	
w(ME), %	1,703		4,586		0,721	
w(GPE), %	12,128		4,586		0,033	
w(ME) * w(ME)	1,408		6,760		0,841	
w(GPE) *	14,053		6,760		0,076	
w(GPE)						
w(ME) * w(GPE)	7,727		5,617		0,211	
Analiza varijanse (ANOVA) za model odgovora površine						
Poreklo varijacije	SS	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	p-vrednost
Regresija	5	1831,93	1831,93	366,386	2,90	0,099
Linearna	2	899,99	899,99	449,993	3,57	0,086
Kvadratna	2	693,09	693,09	346,544	2,75	0,132
Interakcija	1	238,86	238,86	238,857	1,89	0,211
Rezidualna greška	7	883,43	883,43	126,205		
Neinterpolisano	3	808,91	808,91	269,638	14,47	0,013
Greška	4	74,52	74,52	18,630		
Ukupno	12	2715,36				

Seq. SS - sekvencijalna suma kvadrata (zavisi od redosleda parametara); Adj. SS - usklađena suma kvadrata (nezavisna od redosleda parametara); Adj. MS – srednja vrednost kvadrata (SeqSS/SS); SS – stepen slobode

Tabela S5. Procenjeni koeficijenti regresije i analiza varijanse za dizajn odgovora DPPH'.

Procenjeni regresioni koeficijenti						
Član	Koeficijent		Standardna greška koeficijenta		p-vrednost	
Konstanta	55,9224		2,930		0,000	
w(ME), %	-5,5683		2,880		0,094	
w(GPE), %	12,9533		2,880		0,003	
w(ME) * w(ME)	3,2516		4,245		0,469	
w(GPE) *	-5,7334		4,245		0,219	
w(GPE)						
w(ME) * w(GPE)	-0,9500		3,528		0,795	
Analiza varijanse (ANOVA) za model odgovora površine						
Poreklo varijacije	SS	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	p-vrednost
Regresija	5	1290,85	1290,85	258,17	5,19	0,026
Linearna	2	1192,77	1192,77	596,39	11,98	0,005
Kvadratna	2	94,47	94,47	47,24	0,95	0,432
Interakcija	1	3,61	3,61	3,61	0,07	0,795
Rezidualna greška	7	348,43	348,43	49,78		
Neinterpolisano	3	147,15	147,15	49,05	0,97	0,488
Greška	4	201,28	201,28	50,32		
Ukupno	12	1639,28				

Seq. SS - sekvencijalna suma kvadrata (zavisi od redosleda parametara); Adj. SS - usklađena suma kvadrata (nezavisna od redosleda parametara); Adj. MS – srednja vrednost kvadrata (SeqSS/SS); SS – stepen slobode

Tabela S6. Procenjeni koeficijenti regresije i analiza varijanse za dizajn odgovora FRP.

Procenjeni regresioni koeficijenti						
Član	Koeficijent		Standardna greška koeficijenta		p-vrednost	
Constant	51,6169		3,340		0,000	
w(ME), %	2,6083		3,284		0,453	
w(GPE), %	9,2333		3,284		0,026	
w(ME) * w(ME)	0,6309		4,840		0,900	
w(GPE) * w(GPE)	1,2359		4,840		0,806	
w(ME) * w(GPE)	-3,4250		4,022		0,423	
Analiza varijanse (ANOVA) za model odgovora površine						
Poreklo varijacije	SS	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	p-vrednost
Regresija	5	607,41	607,409	121,482	1,88	0,217
Linearna	2	552,35	552,347	276,174	4,27	0,061
Kvadratna	2	8,14	8,139	4,070	0,06	0,940
Interakcija	1	46,92	46,923	46,923	0,73	0,423
Rezidualna greška	7	452,88	452,882	64,697		
Neinterpolisano	3	447,79	447,785	149,262	117,14	0,000
Greška	4	5,10	5,097	1,274		
Ukupno	12	1060,29				

Seq. SS - sekvencijalna suma kvadrata (zavisi od redosleda parametara); Adj. SS - usklađena suma kvadrata (nezavisna od redosleda parametara); Adj. MS – srednja vrednost kvadrata (SeqSS/SS); SS – stepen slobode

Tabela S7. Procenjeni koeficijenti regresije i analiza varijanse za dizajn odgovora CHE.

Procenjeni regresioni koeficijenti						
Član	Koeficijent		Standardna greška koeficijenta		p-vrednost	
Constant	196,817		11,64		0,000	
w(ME), %	0,828		11,44		0,944	
w(GPE), %	-2,182		11,44		0,854	
w(ME) * w(ME)	8,777		16,87		0,619	
w(GPE) * w(GPE)	5,397		16,87		0,758	
w(ME) * w(GPE)	-1,720		14,02		0,906	
Analiza varijanse (ANOVA) za model odgovora površine						
Poreklo varijacije	SS	Seq. SS	Adj. SS	Adj. MS	F-vrednost	p-vrednost
Regresija	5	504,11	504,11	100,82	0,13	0,981
Linearna	2	32,67	32,67	16,34	0,02	0,979
Kvadratna	2	459,60	459,60	229,80	0,29	0,755
Interakcija	1	11,83	11,83	11,83	0,02	0,906
Rezidualna greška	7	5500,42	5500,42	785,77		
Neinterpolisano	3	393,90	393,90	131,30	0,10	0,954
Greška	4	5106,52	5106,52	1276,63		
Ukupno	12	6004,53				

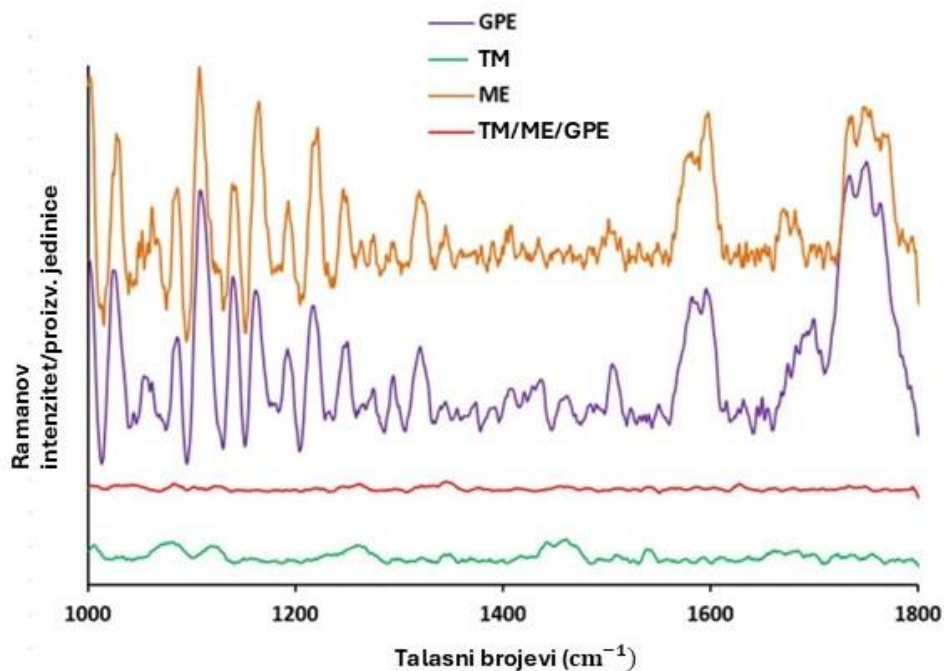
Seq. SS - sekvencijalna suma kvadrata (zavisi od redosleda parametara); Adj. SS - usklađena suma kvadrata (nezavisna od redosleda parametara); Adj. MS – srednja vrednost kvadrata (SeqSS/SS); SS – stepen slobode

Tabela S8: Polipeptidni sastav optimizovane formulacije mikroinkapsulata TM/ME/GPE i kontrolnog TM praha, analiziran pomoću SDS-PAGE u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE).

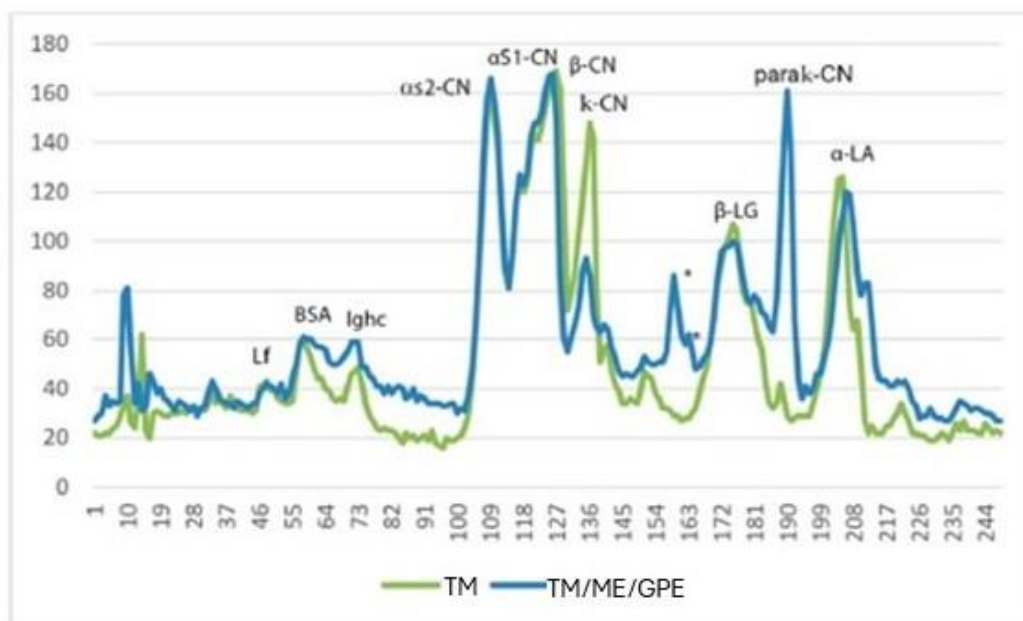
Polipeptid	TM (% ukupnih proteina)	TM/ME/GPE (% ukupnih proteina)
Lf	3,10	2,52
BSA	5,30	6,58
Ighc	3,73	4,13
α_{S_2} -CN	13,98	12,09
α_{S_1} -CN	6,25	4,94
β -CN	16,70	11,76
κ -CN	9,34	6,45
*	/	3,75
*	/	3,07
β LG	11,53	9,47
parak-CN	/	7,42
α LA	10,75	9,14

Skraćenice: laktoferin (Lf); goveđi serum albumin (BSA); Imunoglobulini (Ighc); α_{S_2} -kazein (α_{S_2} -CN); α_{S_1} -kazein (α_{S_1} -CN); β -kazein (β -CN); κ -kazein (κ -CN); β -laktoglobulin (β -LG); parak-kazein (parak-CN); α -laktalbumin (α -LA).
 *polipeptidi male molekulske težine.

7.2 Slike



Slika S1: Raman spektri ekstrakta semenke Prokupca (GPE), ekstrakta pečurke *A. aegerita* (ME), obezmašćenog termički tretiranog kozjeg mleka (TM) i optimizovane formulacije mikroinkapsulata (TM/ME/GPE).



Slika S2: Elektroforegrami polipeptidnog profila optimizovane formulacije mikroinkapsulata (TM/ME/GPE) i kontrolnog (TM) praha, analizirani SDS-PAGE u redukujućim uslovima (SDS-R-PAGE).

8 Biografija autora

Ana Plečić je rođena 03. maja 1996. godine u Trebinju, Bosna i Hercegovina gde je završila osnovnu školu „Sveti Sava” i srednju školu „Pero Slijepčević” (smer gimnazija). Osnovne akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisana je 2014/15., na smeru Prehrambena tehnologija, modul Tehnologija konzervisanja i vrenja, koje je završila 2018. godine sa prosečnom ocenom 8,90 i ocenom 10,00 na završnom radu pod nazivom „Razvoj i karakterizacija biofilmova sa inkorporiranim ekstraktom žalfije” i stekla zvanje diplomirani inženjer tehnologije. Školske 2018/19. godine upisala je master akademske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Prehrambeni inženjering. Master rad pod nazivom „Formulacija sastava krioprotektanata za liofilizaciju probiotskih kultura” odbranila je 2019. godine sa ocenom 10,00 i stekla zvanje master inženjer tehnologije. Doktorske studije upisala je 2019/20. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na studijskom programu Prehrambena tehnologija. Bila je član organizacije studentskog nacionalnog takmičenja „Ecotrophelia” zasnovanog na kreiranju ekoinovativnih prehrambenih proizvoda, uzastopnih trinaest godina. Član je organizacije osmog po redu naučno-stručnog simpozijuma „Pivo, pivarske sirovine i pivarska industrija”, Zrenjanin. Član je Udruženja Prehrambenih tehnologa Srbije. Služi se engleskim (C1) i nemačkim (A2) jezikom.

U zvanje istraživač-pripravnik imenovana je 30.01.2020. godine za oblast: Biotehničke nauke, granu: Prehrambeno inženjerstvo, naučnu disciplinu: Prehrambena biotehnologija i užu naučnu disciplinu: Tehnologija slada i piva. Kao student demonstrator i dalje je aktivna na realizaciji praktičnih vežbi iz predmeta: Tehnologija slada i Tehnologija piva i dve godine bila aktivna na realizaciji vežbi iz Tehnologije prirodnih i mineralnih voda. 27.04.2023. godine, stiče zvanje istraživač-saradnik. Veće naučnih oblasti biotehničkih nauka 17.01.2023. godine je dalo saglasnost na odluku Nastavno-naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta (br. 32/13-4.3 od 28.12.2022) o prihvatanju teme doktorske disertacije Ane Plečić, pod nazivom „Mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti iz semenki grožđa sorte Prokupac i gljive *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer i njihova primena u proizvodnji dehidrisanih prehrambenih proizvoda”, pod mentorstvom prof. dr Viktora Nedovića i prof. dr Mirjane Pešić (br. 61206-53/2-23).

Bila je aktivna na sledećim projektima: Razvoj novih fermentisanih proizvoda obogaćenih ekstraktima biljaka i gljiva, strateški projekat sa Kinom, 2021-2023, Republika Srbija, Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja – Program nauke i tehnološkog razvoja – zajedničko finansiranje razvojnih i istraživačkih projekata Republike Srbije i Narodne republike Kine; Funkcionalni proizvodi na bazi proteina kozjeg mleka i bioaktivnih jedinjenja ekstrahovanih iz kornje grožđa i jestivih pečuraka – FUNPRO, IDEJE, Grant No 7744714, Fond za Nauku Republike Srbije, 2022-2025 godine.

Do sada je kao autor ili koautor objavila 4 naučna rada, od toga jedan rad u međunarodnom časopisu (kategorija M22), tri rada u vodećem međunarodnom časopisu (kategorija M21) i 7 saopštenja koja su predstavljena na međunarodnim naučnim skupovima (kategorija M34).

9 Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Ana A. Plećić

Broj indeksa: TH190041

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti iz semenki grožđa sorte Prokupac i gljive *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer i njihova primena u proizvodnji dehidrisanih prehrambenih proizvoda”

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za stizanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

10 Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ana A. Plećić

Broj indeksa TH190041

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov rada „Mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti iz semenki grožđa sorte Prokupac i gljive *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer i njihova primena u proizvodnji dehidrisanih prehrambenih proizvoda”

Mentor prof. dr Viktor A. Nedović, redovni profesor

Drugi mentor prof. dr Mirjana B. Pešić, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

11 Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Mikroinkapsulacija bioaktivnih komponenti iz semenki grožđa sorte Prokupac i gljive *Agrocybe aegerita* (V. Brig.) Singer i njihova primena u proizvodnji dehidrisanih prehrambenih proizvoda”

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.