

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

Датум:03.04.2017.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације дипл. инж. Дуње Дувњак

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/6-4.2 од 29.3.2017. године именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: »Акумулација селена у субмерзно и индустријски гајеној гљиви *Coriolus versicolor*», кандидаткиње Дуње Дувњак, дипл. инж. Након што смо детаљно проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Дуње Дувњак, написана је на 219 страна текста и укључује 29 табела, 4 слике и 59 графикона. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи осам поглавља, и то: Увод (стр. 1 - 2), Преглед литературе (стр. 3 - 36), Циљеви истраживања (стр. 37 - 39), Материјал и методе (стр. 40 - 59), Резултати и Дискусија (стр. 60 - 151), Закључак (стр. 152 - 165), Литература (стр. 166 - 198) и Прилог (стр. 199 – 219). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата и обавезне изјаве. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија и Прилог садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је истакнут потенцијал медицинске гљиве *Coriolus versicolor* као извора селена и биолошки активних компоненти од интереса за исхрану људи и фармацеутску индустрију.

Преглед литературе. У Прегледу литературе који има два потпоглавља детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Више гљиве-печурке* кандидаткиња истиче значај печурака, њихових плодноносних тела, мицелијума и различитих екстраката у превенцији и лечењу многих болести. Гљиве се користе као храна и лек, било у облику плодноносних тела, мицелијума или њихових различитих екстраката. Биолошка активност екстраката гљива најчешће се везује за садржај биоактивних компоненти као што су полисахариди и полифеноли. Такође, у прегледу литературе указано је на на последице неселективне

употребе комерцијалних антибиотика и све учесталију појаву антибиотски резистентних сојева патогених микроорганизама. Будући да је резултатима ранијих истраживања великог броја истраживача показано да гљиве садрже једињења која делују антимикубно, интересантно је било испитати антимикубна својства метанолних екстраката *Coriolus versicolor* гљиве, и то гајена на различите начине (на чврстом супстрату и субмерзно). Обзиром на савремени начин живота са собом носи велики број фактора ризика по здравље, као што су стрес, старење, гојазност, и нездраве животне навике људи, истакнут је значај гљива као допуне природном одбрамбеном систему као потенцијалних нових антиоксиданаса. Такође, модеран начин живота често узрокује недовољно уношење свих потребних микроелемената. У другом потпоглављу *Селен*, истакнут је значај селена у исхрани и здрављу људи. Већина прехранбених производа не садржи довољну количину селена. Процењено је да је просечан дневни унос селена у Србији 27 µg, што је испод свих препорука о потребном дневном уносу. Гљиве обogaћене селеном могу бити потенцијалан извор селена, будући да имају способност усвајања микроелемената из супстрата на коме расту. Сматра се да се органски облици селена боље усвајају у организму, и да испољавају мању токсичност у поређењу са неорганским облицима. Висок садржај протеина у гљивама, омогућава висок потенцијал биотрансформације селена из подлоге у органски облик.

Циљеви истраживања. Циљеви ове дисертације полазе од хипотезе да гљива *Coriolus versicolor* током раста на чврстом супстрату и у течној подлози обogaћеној различитим изворима селена може да усвоји значајне количине додатог селена и трансформише га у органски облик. На основу прегледа литературе утврђено је да су гљиве добар извор антиоксидативних једињења и компонената које испољавају значајну антимикубну способност. Научни циљ докторске дисертације је и хемијска карактеризација метанолних екстраката плодноносних тела и мицелијума гљиве. Финални део анализа у овој дисертацији се односио на испитивање антимикубног и антиоксидативног потенцијала метанолних екстраката селеном обogaћених плодноносних тела и биомасе мицелијума гљиве *C. versicolor*.

Материјал и методе. Методе које су коришћене у дисертацији су представљене у седам потпоглавља. За добијање селеном обogaћених плодноносних тела и мицелијума гљиве, *Coriolus versicolor* употребљена су два органска (селенски квасац Sel-Plex[®], комерцијални нетоксични препарат, квасац *Saccharomyces cerevisiae* и селеноуреа и два неорганска извора (натријум селенит, Na₂SeO₃ и натријум селенат, Na₂SeO₄ (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, САД)). Додатно у односу на план предвиђен пријавом дисертације конструисан је биореактор корисне запремине 1,5 l, и пре субмерзног гајења гљиве са додатком различитих извора селена процес је оптимизован праћењем потрошње глукозе (HPLC методом) и мерењем приноса биомасе током времена. Такође, додатно је анализиран утицај додатих извора селена на раст мицелијума гљиве микроскопирањем светлосним микроскопом Leica DMLS опремљеног DC 300 дигиталном камером и Leica IM 1000 софтвером (Leica, Немачка). Анализа микроструктуре добијене мицелије и присуство егзополисахарида на површини мицелијума је испитана помоћу JEOL JSM-6390LV скенирајућег електронског микроскопа.

У другом потпоглављу *Припрема метанолних екстраката* детаљно су описани услови под којима је извршена метанолна екстракција добијених плодноносних тела и мицелијума

гљиве *C. versicolor* Узорци су екстраховани у метанолу а добијена течност је упарена до сува под сниженим притиском у вакуум упаривачу (Buchi, Швајцарска).

У трећем потпоглављу *Квалитативна и квантитативна анализа плодноносних тела и мицелијума гљиве C. versicolor* дат је опис метода коришћених за одређивање садржаја селена и анализу аминокиселинског састава у добијеним узорцима. Садржај укупног селена у анализираним узорцима одређен је употребом оптичког емисионг спектрометра са индуковано-спрегнутом плазмом (ICP-OES систем Thermo iCAP 6500 Duo, Thermo Fisher Scientific, Кембриџ, Велика Британија). Пре анализе узорци су подвргнути дигестији уз употребу пероксида и азотне киселине у затвореном систему микроталасне пећнице „Berghof MWS-3+“. Одређен је укупан аминокиселински састав узорака, садржај L-селенометионина и селено-метил-селено-L-цистеина. За одређивање садржаја метионина и селенометионина примењена је базна хидролиза употребом 5М NaOH, а за одређивање укупног аминокиселинског састава 6М HCl. Узорци су хидролизоване на температури од 110 °C током 16 h. За одређивање садржаја селено-метил-селено-L-цистеина узорци су подвргнути екстракцији у трајању од 6 h на магнетној мешалици у леденом воденом купатилу на температури од 4 °C и 19 на истој температури без мешања. Пре анализе узорци су филтрирани и извршена је дериватизација у аутосемплеру помоћу ортофталдеhidног (ОПА) реагенса. Анализа је рађена на Шимацу NEXERA UHPLC систему. За анализу је употребљена Supelcosil LC-18-DB колона (димензије честица према произвођачу 5 µm, 25 cm x 4,6 mm) произвођача Супелко. Мобилна фаза је била фаза А (50 mM Na(CH₃COOH) пуфер са 0,1 % ацетонитрила (CH₃CN) pH 7,2) и фаза Б (метанол).

У четвртм потпоглављу *Хемијска карактеризација метанолних екстраката плодноносних тела и мицелијума гљиве C. versicolor* дат је опис више метода. ФТИР (Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом) анализа метанолних екстраката је извршена помоћу АТР-ФТИР спектрометра IRAffinity-1 (Шимацу, Јапан), у спектралном опсегу од 4000–600 cm⁻¹ са резолуцијом од 4 cm⁻¹. Садржај укупних полисахарида, протеина, фенола и липида одређен је употребом спектрофотометријских метода. Укупни, α- и β-гљукани одређени су помоћу ензимског кита (Yeast and Mushroom β-glucan Assay Kit, Megazyme Int., Wicklow, Ирска) спектрофотометријски. Моносахаридни састав екстраката одређен је коришћењем HPLC-а Екстракти су подвргнути хидролизи помоћу 2М трифлуоросирћетне киселине на температури од 70 °C у трајању од 2 h. Узорци су пропуштени кроз Luna C-18 (2) колону димензије 250 x 4,6 mm, 5 µm величине пора (Phenomenex Inc., Torrance, СА, САД) са брзином протока од 1,0 ml/мин и UV детекцијом на 245 nm. Као мобилна фаза коришћен је 0,1 М фосфатни пуфер (pH 7,2) са 10 % ацетонитрила (пуфер А) и 25 % ацетонитрила (пуфер Б).

У петом потпоглављу *Одређивање биолошке активности добијених метанолних екстраката* приказано је одређивање антимицробне активности метанолних екстраката у односу на осам Грам позитивних сојева и десет Грам негативних АТЦЦ сојева бактерија као и на два АТЦЦ соја квасца употребом микродилуционе методе. Одређене су минималне инхибиторне (МИС) и минималне бактерицидне концентрације (МВС) екстраката гљиве *C. versicolor*. Додатно, утицај метанолних екстраката је представљен помоћу криви раста. Антиоксидативни потенцијал метанолних екстраката узорака одређен је *in vitro* на основу четири различите спектрофотометријске методе: способност везивања слободних 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (ДППХ) радикала, хелирања јона гвожђа (Fe²⁺),

редукције јона гвожђа (Fe^{3+}) и антиоксидативна активност метанолних екстраката у модел систему линолеинске киселине.

У шестом потпоглављу *Статистичка анализа* наведено је да су добијени подаци подвргнути једнофакторијалној анализи варијансе (АНОВА) у статистичком програму Оригин Про 9.0. За одређивање статистичке значајности између добијених вредности коришћени су Такијев и Фишеров тест на нивоу значајности од $p < 0.05$. Линеарна регресиона анализа је коришћена за утврђивање корелације између променљивих од значаја и ефективне концентрације екстраката гљиве при којој је антиоксидативна активност 50 % (EC_{50}).

Резултати и Дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру пет потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике, прегледне табеле и графиконе који илуструју истраживања, а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења.

Резултати приказани у потпоглављу *Способност акумулације селена из различитих извора од стране гљиве C. versicolor* показали су да је гљива успешно усвојила додати селен из чврстог супстрата и акумулирала га у плодносна тела. Са порастом концентрације у супстрату садржај селена у гљиви је растао. Боља способност усвајања селена је уочена код примене органских једињења. Садржај селена у плодносним телима се кретао између 93,39 $\mu\text{g/g}$ и 97,85 $\mu\text{g/g}$ (концентрација селена у подлози 25 mg/kg , Sel-Plex[®] и селеноуреа респективно) и 198,4 $\mu\text{g/g}$ (селеноуреа 50 mg Se/kg). Уочен је токсични ефекат органских једињења у концентрацији од 50 mg Se/kg , када су добијена неразвијена плодносна тела, при употреби селеноуреа, а при истој додатој концентрацији Sel-Plex[®]-а фруктификација је потпуно изостала.

Мерењем потрошње глукозе током раста у течној подлози установљено је оптимално време гајења гљиве од осам дана што је приказано у другом потпоглављу *Submeržno gajenje C. versicolor gљive*. Гљива је расла у облику сферичних пелета када је течна подлога обogaћена селеноуреом, угрушци диспергованих филамената су формирани када је течној подлози додат Sel-Plex[®], а потпуно распршен раст гљиве је био када је подлози додат натријум селенит. Скенирајућом електронском микроскопијом је утврђено одсуство егзополисахарида на површини мицелијума. Гајењем у течној подлози којој је додата селеноуреа или натријум селенит добијен је мицелијум јарко розе до цигла црвене боје услед редукције селена присутног у високим концентрацијама чиме се смањује његова токсичност на гљиву. Најефикасније усвајање селена је постигнуто применом натријум селенита, али је добијен статистички значајно ($p \leq 0,05$) нижи принос биомасе. Додатком селеноуреа такође је остварена висока акумулација селена (између 1028,65 и 2084,00 $\mu\text{g/g}$ суве биомасе, у зависности од додате концентрације), а виша концентрација (25 mg Se/ml) није статистички значајно ($p \leq 0,05$) утицала на принос биомасе.

У трећем потпоглављу *Одређивање аминокиселинског састава гљиве C. versicolor обogaћене селеном* приказан је аминокиселински састав плодносних тела и мицелијума гљиве. Однос садржаја есенцијалних и неесенцијалних аминокиселина (ЕАА/НЕАА) није се статистички значајно ($p \leq 0,05$) разликовао код различитих узорака селеном обogaћених плодносних тела и задовољавао је ФАО/ВХО препоручену референтну вредност од 0,6. Узорци мицелијума гајени у течној подлози са додатком Sel-Plex[®]-а имали највиши однос ЕАА/НЕАА (0,71-0,79) и највиши проценат удела есенцијалних у укупним аминокиселинама (ЕАА/ТАА (%)) између 41,36 и 44,16 %. Са порастом концентрације

селена додате у супстрат за гајење растао је и садржај Л-селенометионина у узорцима. Узорци плодноносних тела обогаћени органским изворима селена (25 mg Se/g) су имали највећи садржај Л-селенометионина $105,27 \pm 8,54$ mg/g када је супстрату додата селеноура и $91,22 \pm 14,76$ mg/g, при употреби Sel-Plex[®]-а. Најбољи степен конверзије додатог селена у селенометионин (83,68 %) постигнут је код селеноуреа у концентрацији од 10 mg Se/kg. Код узорака добијених субмерзним гајењем, степен конверзије је ишао чак до 95 % (10 mg Se/l, додато употребом Sel-Plex[®]-а). Додатком селеноуреа (10 mg Se/l) остварен је значајан проценат биоконверзије (31,23 %), а као најнеповољнији извор селена се показао натријум селенит. Мале количине селено-метил-селено-Л-цистеина детектоване су у мицелијуму субмерзно гајене гљиве.

У потпоглављу *Хемијска карактеризација метанолних екстраката* дати су резултати више хемијских метода анализе. ФТИР спектроскопијом је утврђено присуство веза карактеристичних за једињења гликозидне структуре. Утврђен је различит степен утицаја начина гајења гљиве и извора селена на садржај селена, полисахарида, протеина, липида и фенолних једињења у метанолним екстрактима гљиве. Детектоване разлике у моносахаридном саставу највероватније указују на утицај додатк различитих извора селена на грађу ћелијског зида гљиве.

У потпоглављу *Одређивање биолошке активности добијених метанолних екстраката* приказани су резултати антибактеријског деловања метанолних екстраката на тестиране бактерије, а њихова успешност је варијала у зависности од узорка и тестиране бактерије. Једино су екстракти мицелијума гљиве гајене у течной подлози обогаћеној селеноуреом у концентрацијама 10 и 25 mg Se/l, и натријум селенитом у концентрацији од 10 mg Se/l деловали смртоносно на *Escherichia coli* Н7:О157. Такође, запажено је да је узорак обогаћен натријум селенитом деловао летално на све тестиране бактерије укључујући и *Listeria* сојеве у концентрацијама од 5 до 40 mg/ml. Ни један узорак није испољио антифунгално деловање. Селеном обогаћени екстракти су показали побољшана антиоксидативна својства. Метанолни екстракт плодносног тела гљиве обогаћеног селеноуреом у концентрацији од 10 mg Se/kg везивао је чак 99,42 % слободних ДППХ радикала. Сличну ефикасност су имали и екстракти мицелијума обогаћени натријум селенитом (96,00 %) и селеноуреом (95,3 %) у концентрацији од 10 mg Se/l. Најбољу способност хелирања јона гвожђа показао је екстракт плодноносних тела гљиве обогаћене Sel-Plex[®]-ом (10 mg Se/kg) ($EC_{50}=1,16$ mg) mL^{-1} . У оквиру екстраката мицелијума, узорак обогаћен натријум селенитом (10 mg Se/l) који хелирао око 88,98 % јона. Екстракти плодноносних тела су показали нешто нижу способност редукције (Fe^{3+}) јона у односу на екстракте мицелијума. Запажена је редукциона способност екстраката мицелијума, узорка обогаћеног натријум селенитом (10 mg Se/l) који је достигао исти ниво при највишој тестираној концентрацији као и позитивне контроле, аскорбинска и лимунска киселина. Утврђено је да ни један екстракт није довео до смањења липидне пероксидације за 50 % у тестираном опсегу концентрација (0,1-10 mg mL^{-1}).

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. На основу резултата приказаних у овој дисертацији може се закључити да субмерзни поступак гајења *C. versicolor* гљиве има низ предности у односу на гајење гљиве на чврстом супстрату. Наиме, применом субмерзног поступка скраћено је време гајења, параметри процеса су контролисани а могућност контаминације микроорганизмима из ваздуха је сведена на

минимум. Висока способност биотрансформације усвојеног селена у облику Л-селенометионина од стране *C. versicolor* гајене гљиве као и приказани резултати биолошке активности њених метанолних екстраката дају основ за даљи развој субмерзних процеса гајења различитих гљива у циљу добијања производа са медицинским и нутритивним својствима. Све то, заједно са употребом подлоге за гајење тачно дефинисаног састава отвара пут ка стандардизацији целокупног процеса производње селеном обогаћених гљива.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 317 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дип. инж. Дуње Дувњак под насловом: »Акумулација селена у субмерзно и индустријски гајеној гљиви *Coriolus versicolor*« представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације. Докторска дисертација дип. инж. Дуње Дувњак даје значајан допринос разумевању процеса гајења гљива обогаћених различитим изворима селена.

Кандидаткиња је у експерименталном делу истраживања успешно применила више различитих савремених метода које су јој омогућиле добијање релевантних резултата које је правилно тумачила и коментарисала у складу са расположивим литературним подацима. Закључци су добро формулисани и правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Дисертација представља оригиналан научни рад актуелан и значајан, с обзиром да истраживања у Србији, везана за употребу гљива обогаћених селеном а посебно врста *Coriolus versicolor* нису до сада урађена. Имајући у виду да су прехранбени производи у појединим деловима Србије дефицитарни у садржају селена јасно је да добијени резултати имају и велики практични значај и примену у фармацеутској и прехранбеној индустрији. Ова дисертација доприноси и бољем разумевању утицаја селена на антиоксидативна и антимицробна својства ове врсте гљива.

Гљиве гајене на чврстом супстрату или субмерзно од стране *C. versicolor* су показале високу способност биотрансформације усвојеног селена у облику Л-селенометионина. Приказани резултати биолошке активности метанолних екстраката дају основ за даљи развој субмерзних процеса гајења, као процеса који се лакше контролише, а ово омогућава и развој нових поступака гајења других различитих врста гљива у циљу добијања производа са медицинским и нутритивним својствима. Све то, отвара пут ка стандардизацији целокупног процеса производње селеном обогаћених гљива.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Дуње Дувњак, дипл. инж. под насловом: „Акумулација селена у субмерзно и индустријски гајеној гљиви *Coriolus versicolor*“ и предлаже Научно-наставном већу Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду, да ову позитивну оцену усвоји и тиме омогући кандидаткињи да пред истом Комисијом јавно брани докторску дисертацију.

У Београду,
03.04.2017.

Чланови комисије:

др Миомир Никшић, редовни професор
Ужа научна област: Технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Виктор Недовић, редовни професор
Уже научне области: Наука о конзервисању и Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Љубинко Јовановић, редовни професор
Ужа научна област: Физиологија биљака
Универзитет Едуконс, Факултет еколошке пољопривреде

др Милена Пантић, доцент
Ужа научна област: Технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Стева Левић, доцент
Ужа научна област: Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Анита Клаус, ванредни професор
Ужа научна област: Технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Дуње Дувњак у научном часопису на СЦИ листи

Дувњак, Д., Пантић, М., Павловић, В., Недовић, В., Левић, С., Матијашевић, Д., Скнепнек А., Никшић, М. (2016): Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. Innovative Food Science&Emerging Technologies 34: 1-8.