

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 277/2-7-5
Датум: 17.09.2014. године

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

**за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама**

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **МИЛЕНА (Драгослав) САВИЋ**, дипл. инж., студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: «АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА»,

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 25.01.2011. године, својим актом број 6-189/10 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: «АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА».

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 28.05.2014. године, одлуком Факултета број 277/8-7.5., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Миомир Никшић, редовни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
2. др Мирослав Врвић, редовни професор, Биохемија, Универзитет у Београду – Хемијски факултет,
3. др Љубинко Јовановић, редовни професор, Физиологија биљака, Универзитет Едуконс - Факултет еколошке пољопривреде,
4. др Анита Клаус, доцент, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет,
5. др Маја Козарски, научни сарадник, Биохемија, Универзитет у Београду – Пољопривредни факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 17.09.2014. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА
Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: ВС - 277/2-7.5.
Датум: 17.09.2014. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 17.09.2014. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **МИЛЕНА САВИЋ**, дипл. инж. и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: «**АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА**».

II Универзитет је 25.01.2011. године, својим актом број 6-189/10 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Milena Savić, I. Anđelković, Dunja Duvnjak, Danka Matijašević, Aleksandra Avramović, Dragana Pešić-Mikulec and M. Nikšić (2012): The fungistatic activity of organic selenium and its application to the production of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp., *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64 (4), 1455-1463.

**П Р Е Д С Е Д Н И К
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
Д Е К А Н**

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, ментору др Миомиру Никшићу, редовном професору, Институту за прехранбenu технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

Универзитет у Београду
Пољопривредни факултет
Београд – Земун
Датум: 28.05.2014.

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАКУЛТЕТА

ПРЕДМЕТ: Извештај о оцени урађене докторске дисертације Милене Д. Савић

Одлуком Наставно-научног већа Пољопривредног факултета бр.277/8-7.5. од 28.05.2014., именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом „АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА“, коју је поднео кандидат дипл. инж. **Милене Д. Савић**.

Комисија у саставу: др Миомир Никшић, редовни професор Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, др Мирослав Врвић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, др Љубинко Јовановић, редовни професор Факултета за еколошку пољопривреду Универзитета Едуконс, др Анита Клаус, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду и др Маја Козарски, доцент Пољопривредног факултета Универзитета у Београду, прегледала је и оценила докторску дисертацију и подноси Већу следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација **Милене Д. Савић**, под насловом „АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА“, написана је према Упутству за обликовање штампане и електронске верзије докторске дисертације Универзитета у Београду, на 187 нумерисаних страна, у оквиру којих се налази 23 табеле и 78 слика. Поред уводних садржаја (*насловне стране на српском и енглеском језику; стране са списком чланова комисије; стране са изразима захвалности; стране са апстрактном на српском и енглеском језику; списак скраћеница; садржаја*), докторска дисертација има седам нумерисаних поглавља: **1 - Увод** (1-3. стр.); **2 – Преглед литературе** (4-42. Стр.); **3 – Циљеви** (43.стр.); **4 - Материјал и методи** (45-56. стр.); **5 – Резултати и дискусија** (57-122.стр.); **6 – Закључци** (123-133.стр.); **7 – Литература** (134-159.стр.); докторска дисертација садржи и **8 – Прилог: А-Хроматограми моносахаридног састава полисахарида гљива *Pleurotus spp.* (160-169.стр.), Б-Хроматограми аминокиселинског састава плодносног тела *Pleurotus spp.* (170-176.стр.) и Ц- FT-IR спектри добијени снимањем полисахаридних екстраката гљива *Pleurotus spp.* (177-187.стр.); **9 - страну са биографијом кандидата; и скениране попуњене и потписане изјаве дате као Прилог 1, 2 и 3.****

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Кандидат *Милена Д. Савић* је у **Уводу** истакла значај индустријских гљива у прехранбеној индустрији и исхрани. Истакнута је способност гљива да метаболички трансформишу биљне лигноцелулозне остатке ниске хранљиве вредности у високовредне деликатесне намирнице богате протеинима. Кандидат је истакла значај гљива са становишта биолошки активних компонената са лековитим, најчешће анти-канцерогеним, антиоксидативним, антивиралним, антимикуробним дејствима, затим са могућношћу снижавања крвног притиска и холестерола. Такође, истакнут је значај базидиомицета као добрих антиоксиданата са могућношћу везивања слободних радикала. Истакнута је способност гљива да разлажу материје из супстрата на којем се гаје и њихов велики значај за коришћење у биоремедијацији, али и усвајање корисних микронутријената неопходних за човека. Кандидат се такође у уводу осврће на значај селена као есенцијалног микронутријента за сисаре, птице и бактерије, антиоксидант, неопходан за правилан рад хормона и имуног система. Истакнута је опасност од појаве обољења изазваних недовољним уносом селена широм света и да недостатак селена може довести до низа поремећаја у организму, као што су мишићна слабост, обструктивна миокардиопатија и тумор. Концентрација селена у намирници директно зависи од садржаја протеина и органски селен има велики значај. Наведен је податак који указује на то да се садржај селена у сувој маси гљива креће између 0.57 и 19.46 mg/kg, зависно од врсте, године и места налажења.

Кандидат је указала на потребу испитивања могућности примене и других потенцијалних извора селена, органских једињења са селенским квасцем као најзанимљивијим извором селена у виду селенометионина. Потенцијална употреба нових органских једињења селена има низ предности у односу на неоргански. Објаснила је да селенски квасац и друга органо једињења селена су потенцијални безбедан извор који се може користити у добијању новог дијететског суплемента на бази гљива. Гљиве имају различит капацитет усвајања селена, што зависи од врсте медијума на којем је гљива одгајана, од врсте гљиве као и од облика и концентрације у ком је селен додат у супстрат. Кандидат је истакла значај гљиве рода *Pleurotus* које имају изразиту нутритивну вредност, спадају у гљиве које су популарне и лаке за индустријско гајење те се на њима најједноставније може пратити акумулација и трансформација селена.

У поглављу **Преглед литературе**, које се састоји из више делова, изнети су доступни литерарни извори из области која је предмет проучавања ове докторске дисертације.

Први део прегледа литературе посвећен је **вишим гљивама**. Наводећи литературне податке, објашњена је грађа базидиомицета. Дато је објашњене грађе хифа (вегетативног тела) и плодносног тела гљиве. Такође, објашњен је и начин размножавања базидиомицета.

У делу који се односи на **индустријске гљиве**, кандидат се осврнула на историју гајења лигницилних гљива, на гајење и значај истих. Приказан је раст производње гљива у протеклих двадесет година широм света за најпопуларније гљиве. Такође, кандидат је приказала просечан хемијски састав гљиве и кроз навођење литературних података дала објашњење о утицају састава супстрата и суплементације истог као и о утицају старости плодносног тела гљиве на хемисјки састав гљиве.

У делу **гљиве као функционална храна**, кандидат наводи литературне податке о значају биоактивних компонената изолованих из базидиомицета. Наводи значај фенолних једињења као најефектинијих антиоксиданаса у гљивама. Затим, описани су полисахариди, са акцентом на β -глюкане који су најпознатија биоактивна једињења са применом у клиничким третманима. Наглашена је разлика у биолошкој активности полисахарида зависно од хидрофилности, величине молекула, гранања и форме. Истакнут је комерцијални значај полисахарида гљива са становишта функционалне хране и наглашено је да глукани базидиомицета као растворни у води имају дуготрајнији ефекат на имуни систем сисара што омогућава да се гљиве користе у

производњи намирница и фармацеутских препарата. Истакнути су подаци који се односе на значај глукана гљиве буковаче која садржи један од најпознатијих, плеуран који има широку примену услед позитивног деловања на интестинални тракт, на редукцију лошег холестерола и крви и инхибиторним ефектом на продукцију неких микотоксина. Осим значаја полисахарида, у дисертацији је истакнут и велики значај протеина са биолошком активношћу који се могу употребити у биотехнолошким процесима за синтезу нових лекова и укључују лигноцелилозне ензиме, лектине, протеазе и протеаза инхибиторе. Наглашена је антимикробна, антифунгална и имуномодулаторна активност. Издвојен је значај ензима гљива које расту на чврстом супстрату који представља индустријски отпад у смислу искоришћења за липидну модификацију, за производњу сира, примену у пекарској индустрији и примену лаказа у стабилизацији воћних сокова и вина уклањањем фенола.

У следећем подпоглављу описују се **гљиве рода *Pleurotus***. Кандидат је изложила литературне податке о наведеном роду гљиве осврћући се на распрострањеност широм света, на индустријски и економски значај производње буковаче. Изнети су подаци о хемијском саставу буковаче. Објашњен је комерцијални и медицински значај гљиве рода *Pleurotus* уз наглашавање аниоксидативне активности, имуномодулаторног ефекта, антитуморне активности, антивиралног и антиинфаматорног потенцијала уз могућност смањења холестерола у крви. Наводи се да су ове гљиве извор ловастатина заслужног за ова медицинска својства уз садржај од око 0.22-0.5mg/100mg β -глукана рачунато на суву масу гљиве. Због изузетног значаја. Кандидат објашњава примену буковаче у дерматологији и превенцији срчаних обољења, дијабетеса, високог крвног притиска. Наглашава се податак да разлика у хемијском саставу и садржају биоактивних компонената у гљиви гајеној на чврстој подлози и субмерзно пре свега потиче од разлике у степену развијености гљиве и фазе животног циклуса базидиомицете. Кандидат је изнела литературне податке о коришћеним комерцијалним врстама *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus salmoneostramineus*, *Pleurotus ostreatus*.

У подпоглављу **селен у гљивама**, кандидат објашњава хипотезе дисертације. Изнети су подаци о могућности гљива да акумулирају метале из супстрата и да се користе као индикатори загађења околине и агенси за биоремедијацију. Објашњено је да анализирани гљиве нормално углавном садрже $<1 \mu\text{g Se/g}$ суве масе и да су до сада су рађена истраживања на великом броју јестивих и медицинских гљива (*Ganoderma lucidum*, *Pleurotus sp.*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Hericiium erinaceum*) где је утврђено да се селен у плодноном телу базидиомицета највећим делом налази у облику селенометионина, селеноцистеина, селенометилселеноцистеина, селенита и других неидентификованих једињења. Затим да се селен највећим делом у гљиви налази у облику нискомолекуларних протеина, у облику селенополисахарида, фракцијама нуклеинске киселине од чега су највећим делом у питању видирастворне компоненте. Кандидат на основу литературних података објашњава да је до сада рађен велики број истраживања уз додатак неорганских соли селена, али нису рађена испитивања о могућности суплементације гљиве буковаче селеном из квасца. Претпоставка је да ће овакве гљиве имати израженију активност увећану за присуство селена.

У следећем подпоглављу, изнети су литературни подаци о **физичко-хемијским својствима елемента селена** као микронутријента заступљеног у намирницама и у облику дијететског суплекмента у неорганској и органској форми.

У делу **селен у литосфери**, кандидат објашњава важност садржаја селена у земљишту јер се у организам селен уноси кроз циклус земљиште-биљка-животинја-човек. Изнет је важан утицај фактора на садржај селена у литосфери попут геолошких, географских и других, при чему је важна форма селена коју биљка може да усвоји. Изнет је податак из 90-их година о концентрацији селена у водама и земљишту широм земаља света.

У делу **селен у исхрани**, дате су препоручене РДА вредности за унос селена. Кандидат износи чињеницу да је могуће лако вршити детаљну анализу хемијског састава хране укључујући

селен и де је уочена велика разлика у уносу селена код испитаника различите старосне доби, пола, различите исхране. Изнет је податак о уносу селена анималног порекла код Срба. Кандидат наглашава предност органског селена у односу на неорганске форме.

У делу **биолошка улога селена** кандидат износи литературне податке о значају селена по здравље човека (превенција обољења као што су тумор, кардиоваскуларна обољења, цироза јетре, дијабетес, заштита ћелија од деловања слободних радикала, редокс регулација, регулација функције штитне жлезде). Услед недовољног уноса селена и витамина Е, кандидат наглашава настанак поремећаја у организму као што је некроза јетре доказана на лабораторијским животињама или кардиомиопатске Кешанске болести код човека. Кандидат наглашава чињеницу да недовољан унос селена нарочито погађа популацију са ослабљеним имунитетом и да се биолошка улога селена доводи у везу са селнопротеинима који су укључени у редокс регулацију и одговор на оксидативни стрес, регулацију активности штитне жлезде и друго. Кандидат износи податке о биосинтези селенопротеина код еукариота која укључује конкуренцију између сумпора и селена, повезаност метаболизма метионина и цистеина и њихових селеноаминокиселина. Наглашено је да код квасца није детектован механизам који обогућава специфичну инкорпорацију SeCys у протеине и да метаболизам нижиг гљива и виших биљака не прави разлику између сумпора и селена. Кандидат се такође осврће и на метаболизам селена код сисара наводећи да се селен апсорбује преко гастроинтестиналног система, а расподела зависи од облика и количине елемента. Од великог значаја је селен у облику селенопротеина.

У делу који се односи на **токсичност селена**, изнети су подаци о дуалној природи селена који је неопходан у малим количинама, а у већим постаје токсичан. Кандидат даје податке о максимално дозвољеном дневном уносу селена и симптомима услед тровања тим елементом.

У следећем делу, кандидат пише о **комерцијално доступним суплементима на бази селена** у органској или неорганској форми и селеном обогаћеног квасца. Кандидат наглашава употребу селенског квасца за који је доказано да је погодан за директну употребу и посебна пажња је усмерена на коришћен препарат у овом раду, комерцијални Sel-Plex® (Alltech, USA).

У делу **неорганске соли селена**, кандидат представља синтезу неорганских соли натријум селената и натријум селенита коришћеног у дисертацији.

У делу **селеносемикарбазонски комплекси**, кандидат објашњава структуру коришћеног једињења и износи податке о досадашњим сазнањима о биолошкој активности комплекса.

У трећем поглављу –**Циљеви** кандидат истиче да су имајући у виду да су гљиве функционална храна и да је додатно селеном обогаћене гљиве потенцијално могуће користити у свежем и сушеном стању или као дијететски суплемент циљеви дисертације били: 1. Праћење раста мицелијума различитих врста јестивих индустријски и медицински важних гљива *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum* на лабораторијским хранљивим подлогама и индустријском производном супстрату обогаћеном неорганским једињењем селена и органским једињењима селена у односу на контролни узорак. 2. Проучавање усвајања и трансформације селена у плодносног телу модела гљиве *Pleurotus spp.* због бољег разумевања метаболизма усвајања селена, 3. Проучавање култивације и дефинисање најбољег начина за што ефикасније обогаћивање гљива селенским квасцем, како би се њиховим коришћењем кориговао недостатак у људској исхрани. Праћен је раст гљиве *Pleurotus ostreatus* на супстрату са додатком различитих концентрација селена. Анализирана су плодносна тела добијена у различитим фазама плодношења. На моделу гљиве *Agaricus bisporus*, додавањем селена у различитим фазама култивације, дефинисан је најбољи моменат суплементације производног супстрата селеном за добијање обогаћених гљива. Испитано је антифунгално деловање препарата селенског квасца.

У четвртом поглављу –*Материјал и методе*, кандидат објашњава шеснаест коришћених метода у изради дисертације.

За *одређивање брзине раста мицелије* коришћени су сојеви из колекције Катедре за технолошку микробиологију Пољопривредниг факултета у Београду. Испитиван је утицај натријум селенита концентрације 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, комплекса $\text{Zn}[(\text{dapsesc})]$ концентрације 1-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и селенског квасца- комерцијалног препарата Sel-Plex® (Alltech Inc., Lexington, USA) концентрације 1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Инокулум је постављен у центар петри кутије и пораст је праћен на сладном агару са и без додатих једињења. Мерен је раст мицелијума сваки други дан и просечна стопа раста израђена је у $\text{mm}/\text{дан}$. Коначна просечна стопа раста сваког соја на подлози са и без додатог селена добијена је као средња вредност пораста мицелијума у току свих дана култивације. Сва мерења су рађена у три понављања.

Индустријски поступак гајења гљива подразумевао је припрему инокулума на влажној пшеници која је стерилисана. Индустијски супстрат за гајење буковаче, припремљен је на бази сламе (29%), букове пиљевине (24%), букове шушке (42%) и гипса (5%). У воду за влажење супстрата (60%) додата су једињења са селеном: 100 mg/kg натријум селенита, 100 mg/kg селенског квасца и 50 mg/kg комплексног једињења $[\text{Zn}(\text{dapsesc})]$ изражено као концентрација селена на суву масу супстрата. Испитивана је могућност акумулације и трансформације селена из селенита, селенског квасца и комплексног једињења у одабраном моделу - плодносном телу гљиве *P. ostreatus* P70 одгајене под лабораторијским условима са циљем да се нађе најпогодније једињење као извор селена. Код осталих испитиваних сојева (*P. ostreatus* P80, *P. salmoneostramineus* и *P. cornucopiae*) који су одгајани у гајилишту „Mycorex Mushroom Limited“ (Larnak, Cyprus), праћена је само могућност усвајања селена из селенског квасца као најпогоднијег извора селена. Гљиве су произведене према стандардној произвођачкој пракси прилагођеној условима гајилишта. Плодносна тела су сушена у струји топлог ваздуха и као таква служила су за даљу анализу.

За *одређивање садржаја укупног селена* у плодносном телу гљива, полисахаридним и протеинским екстрактима, коришћена је киселинска дигестија узорка у затвореном систему микроталасне пећнице уз додатак. За киселинску дигестију 0.3g осушеног и фино уситњеног узорка коришћен је затворен систем микроталасне пећнице. Узорци су дигестовани у тефлонским судовима уз додатак 6mL HNO_3 (65%) и 2mL H_2O_2 (30%). Укупан садржај селена у дигестовним узорцима мерен је на оптичком емисионом спектрометру са индуковано спрегнутом плазмом, ИЦП-ОЕС. Добијене вредности су изражене у $\mu\text{g}/\text{g}$ суве масе узорка. За конструисање калибрационе криве коришћен је стандард Se^{+4} . Сва мерења су рађена у три понављања.

За *добијање полисахаридног екстракта* из плодносног тела гљива коришћен је поступак екстракције врелом водом и алкалне екстракције уз алкохолну преципитацију. Fino самлевени прах суве гљиве третиран је етанолом уз мешање (24h), филтриран и талог је осушен, а затим екстрахован у МилиQ води на 121°C, 45 минута. Супернатант је сконцентрисан до запремине од 10% загревањем на 100°C, а затим су полисахариди таложени у двострукој запремини 96% етанола на 4°C преко ноћи. Заостали талог након вреле водене екстракције, коришћен је за добијање непречишћеног алкалног екстракта полисахарида уз коришћење 1M NaOH. Добијени екстракт је неутрализован сирћетном киселином, супернатант је декантован и подвргнут алкохолној преципитацији. Добијени талог је испран 70% алкохолном, осушен под вакуумом.

Протеини растворни у води су из плодносног тела екстраховани су у Трис пуферу након чега је уследела ацетонска преципитација чиме се добија висок принос високомолекуларних и нискомолекуларних фракција протеина. Протеински талог је сакупљен и осушен у атмосфери азота, а затим растворен у 30mm Трис-HCl (pH 7.5) за одређивање укупног садржаја селена на уређају ИЦП-ОЕС. На овај начин су добијени сирови водени екстракти протеина.

Садржај укупних фенола одређен је коришћењем Фолиновог реагенса. апсорбанца је очитана на спектрофотометру на 725nm. Садржај укупних фенола је изражен као еквивалент галне киселине (ГАЕ) у mg/g суве масе екстракта гљиве или полисахарида. Сва мерења су рађена у три понављања.

Садржај укупних угљених хидрата у целим гљивама и полисахаридним екстрактима одређен је колориметријски фенол-сумпорном методом. Очитана је апсорбанца на спектрофотометру на таласној дужини од 490 nm. За конструисање стандардне криве коришћена је глукоза и резултат је изражен као еквивалент глукозе у mg/g суве масе гљиве. Сва мерења су рађена у три понављања

Садржај укупних глукана и α -глукана одређен је у непречишћеним врелим воденим и алкалним екстрактима полисахарида коришћењем ензимског кита Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure, K-YBGL 07/11 (Megazyme Int., Ireland). Садржај β -глукана добијен је као разлика садржаја укупних и α -глукана. Резултат је изражен као mg/g суве масе екстракта. Сва мерења су рађена у три понављања.

Концентрација протеина у екстрактима полисахарида одређена је методом по Брадфорду. Апсорбанца је очитана на спектрофотометру на 595 nm. Као стандард коришћен је еквивалент албумина из говеђег серума, БСА и резултат је изражен као еквивалент БСА у mg/g суве масе екстракта. Сва мерења су рађена у три понављања.

За *одређивање садржаја липида*, узорци гљива екстраховани су хлороформом према АОАЦ, 1995. Екстракција је трајала око 6h, са брзином екстракције око 5-6 капи/с. За сваки узорак је рађена екстракција у три понављања

Течна хроматографија полисахаридних екстраката гљива рађена је тако што су полисахаридни екстракти хидролизоване са 2M трифлуоросирћетном киселином. Пре анализе, урађена је дериватизација узорака у NaOH (1.5M) и метанолном раствору 1-фенил-3-метил-5-пиразолоне (0.5M) и затим неутралисани помоћу HCl (0.5M). Коришћени су стандарди: D-ксилоза, D-рибоза, D-арабиноза, D-маноза, D-фукоза, D-галактоза, D-рамноза, D-глукоза, D-глукозамин, D-галактозамин. Моносахаридни састав је одређен коришћењем HPLC система са C18 колоном димензије 5 μ m величине пора

FT-IR спектри сувих узорака екстраката полисахарида снимани су методом пресовања сусптанце у KBr пастили у области таласних дужина 4000-400 cm^{-1} .

Скрининг протеинског профила (SDS-PAGE гел електрофореза) урађена је тако што су протеини из гљиве екстраховани у дестилованој води, а затим је урађена преципитација са $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до 90% засићења на 4°C током ноћи. Талог је након тога дијализован коришћењем мемване непропустљиве за молекуле чија је молекулска маса преко 8-10 kDa у 50mM Tris-HCl (pH 7.2) у три понављања. Скрининг протеинског профила урађен је за све испитиване сојење гљиве *Pleurotus*, са и без додатог селена. Распоред протеинских бендова у њима анализиран је SDS-PAGE методом по Laemmli –ју. Овај тип електрофорезе вршен је на 4% концентришућем и 10% раздвајајућем полиакриламидном гелу. Стандард за детекцију широког опсега молекулских маса протеинаш 10-200 kDa, коришћен је за одређивање молекулских маса протеина. Вертикална мини гел електрофореза коришћена је за електрофорезу. Дензитометрија у циљу одређивања молекулске масе протеинских фракција, вршена је у програму Densitometrija Sigma Gel Jandel Corporation, верзија 1.0.

Аминокиселински састав плодносног тела гљива одређен је HPLC методом након што су гљиве хидролизоване у 6M HCl. За детекцију селенометионина и метионина примењен је поступак базне хидролизе са 5M NaOH. Након хидролизе узорци су неутралисани до pH 7.0. Дериватизација узорака вршена је у аутосемплеру коришћењем о-фталалдехидног (ОПА) реагенса. Коришћена је LC-18-DB колона (5 μ m честица). Стандардни раствор аминокиселина је мешавина L-аспарагинске киселине, L-глутаминске киселине, L-серина, L-хистидина, L-глицина, L-триптофана, L-аргинина, L-аланина, L-тирозина, L-метионина, L-валина, L-фенола,

L-изолеуцина, L-леуцина, L-лизина, а одређен је и L-селенометионин. Сва мерења су рађена у три понављања.

Антифунгално деловање квасца испитивано је на сојевима плесни *Trichoderma harzianum* Ko1T6, *Trichoderma harzianum* P1T6, *Mycogone pernicioso* P1M2, *Cladobotryum dendroides* Kal1C6 и *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V1V3 добијених од Института за пестициде и заштиту животне средине (Београд, Србија), претходно изолованих из различитих гајилишта шампињона и буковаче у Србији. Антифунгална активност селенског квасца одређена је коришћењем дифузионог теста са бунарићима у Петри-кутијама. Комадићи мицелије инокулисани су на петри плоче. Након два дана развијања мицелије, бунарићи су направљени у агару на 1cm од ивице мицелије коришћењем корк-борера и у њих су додате испитиване концентрације квасца. IC50 вредност за антифунгално деловање селенског квасца су одређене инокулисањем комада мицелије на средину агара. Мерење је вршено у три различита смера, у 3 понављања и приказана је средња вредност. Процент инхибиције раста плесни одређен је мерењем редукције раста мицелије и поређењем са растом на негативној контроли.

Статистичка анализа података је такође урађена. Сви подаци су представљени као средња вредност три мерења \pm стандардна грешка. За поређење хемијског састава различитих сојева гљиве *Pleurotus spp.* урађена је статистичка обрада података у програму за анализу једнофакторијалне варијансе (АНОВА), а затим је коришћен Fisher-ов LSD тест са 5% вероватноће како би се дефинисало између којих сојева гљиве постоји разлика у хемијском саставу. Студентов т тест са 5% вероватноће коришћен је за поређење хемијског састава између контролне и гљиве обogaћене селеном једног соја гљиве. Линеарна регресиона анализа коришћена је за рачунање IC50 вредности инхибиторног деловања селенског квасца на антагонистичке гљиве. Корелациони коефицијент, r , одређен је за различите делове плодносног тела гљиве са селеном. За статистичку анализу коришћен је програм MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional).

Поглавље **Резултати и дискусија** представља најважнији део докторске дисертације и састоји се од 6 подпоглавља. Кандидат је у овом поглављу на прегледан начин, кроз графиконе и табеле приказала резултате истраживања и вршила и њихово поређење са резултатима других аутора који су радили на истој или сличној проблематици.

У подпоглављу *одређивање брзине раста мицелије* мицелијарни раст мерен је као пречник раста чисте културе на агару са додатком различитих концентрација једињења са селеном. Неорганска со, натријум селенит је деловала најтоксичније на раст мицелијума буковаче. Снажно инхибиторно деловање примећено је већ при најмањим концентрацијама. За *P. ostreatus* P70 селенски квасац се показао као најбољи додаток селена и у мањим концентрацијама стимулисао је раст мицелије. Комплексно једињење у мањим концентрацијама је такође деловало стимулативно на раст мицелијума гљива. Раст гљиве *Ganoderma lucidum* био је стимулисан неорганским једињењем селена, а највећу стимулацију раста показао је селенски квасац. Када је у питању гљива *Lentinus edodes*, најбољи извор селена био је натријум селенит, а комплексно једињење и селенски квасац нису били задовољавајући извор селена због великог инхибиторног деловања на раст мицелијума већ при нижим концентрацијама.

Усвајање селена у плодносна тела гљива Pleurotus spp. У раду је испитивана могућност акумулације и трансформације селена из селенита (100 mg Se/kg супстрата), селенског квасца (100 mg Se/kg супстрата) и комплексног једињења (50 mg Se/kg супстрата) у плодносно тело модела гљиве *P. ostreatus* P70 произведене у лабораторијским условима. Код осталих испитиваних сојева (*P. ostreatus* P80, *P. salmoneostramineus* и *P. cornucopiae*) који су одгајани у гајилишту □Mycorex Mushroom Limited□ (Ларнак, Сургус), праћена је само могућност усвајања селена из селенског квасца (100 mg Se/kg супстрата) као најпогоднијег извора селена. Гљиве су произведене у индустријским условима. Укупан садржај селена у гљивама одређен је на уређају ИЦП-ОЕС након киселинске хидролизе са водоник пероксидом и азотном киселином.

Селен из селенита концентрације 100 mg/kg ефектно је усвојен из супстрата и акумулиран у плодносно тело *P. ostreatus* P70 (120 µg Se/g суве масе). Није уочена разлика у морфологији плодносног тела без и са додатим селеном.

Селен је из органског комплексног једињења успешно усвојен и акумулиран у плодносна тела гљиве. Садржај селена у обогаћеној гљиви кретао се у просеку 65 µg/g. Није примећена разлика у изгледу плодносних тела без и са додатим селеном.

Изучаване врсте гљива имају различиту могућност апсорпције селена додатог у супстрат у форми селенског квасца. Фруктификација је каснила 3-5 дана код узорака са додатим селенским квасцем у количини од 50 mg/kg Se. Укупан садржај селена је био највећи код соја *P. salmoneostramineus* 197.93 µg/g, затим *P. ostreatus* P80 137.84 µg/g, *P. cornucopiae* 122.11 µg/g, *P. ostreatus* P70 133.12 µg/g.

Усвајање и присуство метала у плодносном телу гљива зависи од еколошких фактора, генетских карактеристика сваке врсте појединачно, старости гљиве, као и облика у ком се елементи налазе у земљишту. Супстрат одређује мобилност и доступност метала. Коришћење селенског квасца је потенцијални извор Se са низом предности. Изложеност неорганским једињењима Se изазива краткорочне и дугорочне здравствене проблеме код човека. Додатком високих концентрација селенског квасца у супстрат, 70-100 mg/kg Se, селен ће успорити раст гљива 3-5 дана, али ће плодносна тела усвојитивисок садржај селена, у просеку око 100 µg/g за *Pleurotus spp.* рачунато на суву масу узорка.

Испитиван је *нутритивни састав гљива са селеном* у циљу утврђивања утицаја селена на евентуалну разлику у хемијском саставу и праћења трансформације усвојеног селена у плодносном телу. Одређиван је укупан садржај угљених хидрата, протеина, липида и фенола и мерен је укупан садржај селена у протеинима и полисахаридима одговорним за акумулацију највећег дела селена.

1. Садржај укупних угљених хидрата у целим гљивама одређен је колориметријски коришћењем фенол-сумпорне методе уз D-глукозу као стандард. Постојала је статистички значајна разлика у садржају угљених хидрата између свих сојева буковаче обогаћене селеном, 20-42.89%. Код свих испитиваних сојева, садржај укупних угљених хидрата у гљивама обогаћеним селеном из квасца био је до 25% већи у односу на контролу. Када се посматра утицај неорганског једињења или комплекса, разлика у резултату између контролног и обогаћеног узорка није статистички значајна. Добијени резултати свакако потврђују да се селен везује за угљене хидрате као и то да врста једињења селена вероватно утиче на екстракцибилност угљених хидрата.

2. Укупан селен у протеинима одређен је на уређају ИЦП-ОЕС. Узорак је екстрахован у Tris-HCl (pH 7.5) пуферу након чега је изврћана преципитација ацетоном. Разлика у садржају непречишћених протеина најпре је изазвана разликама у врсти, али и у производном супстрату и условима гајења гљиве. Утврђено је да постоји значајна разлика у протеинском садржају између различитих сојева са додатим селеном из квасца (13.31-23%). Такође је утврђено и да различита једињења селена код *P. ostreatus* P70 доводе до значајне разлике у садржају протеина (11.32-13.24%). Само је садржај протеина код гљиве обогаћене селеном из неорганске соли (11.32%) био значајно нижи у односу на контролу.

3. Садржај липида у плодносном телу гљива одређен је поступком који је описан у АОАЦ, 1995. Садржај липида се у гљивама са додатим селеном кретао 1.71-3.09%. Није постојала статистички значајна разлика између узорака са и без повећаног садржаја селена. Код свих испитиваних сојева, при додатку селена из селенског квасца дошло је до смањења у садржају липида, међутим код *P. ostreatus* P70 са додатком селена из комплекса или неорганске соли, садржај укупних липида је био већи у односу на контролне узорке. Присутан селен је мењао концентрацију липида, али не значајно.

4. Садржај укупних фенола одређен је спектрофотометријски коришћењем Фолиновог реагенса. Садржај фенола је код гљива са селеном био за око 30-40% већи у односу на садржај фенола код

контролних гљива, осим у случају додавања комплекса [Zn(dapsesc)] где је садржај фенола био нешто мањи у односу на друге узорке гљиве *P. ostreatus* P70. Повећан садржај фенола може имати везе са инхибицијом ензима полифенолоксидазе селено-компонентама као снажним антиоксидантима. Из тог разлога се може претпоставити да су гљиве са селеном снажнији антиоксиданси у односу на гљиве без додатог селена.

Хемијска карактеризација полисахаридних екстраката са селеном ражена је у циљу праћења трансформације усвојеног селена у плодносно тело гљиве, рађена је хемијска карактеризација непречишћених врелих водених и алкалних екстраката полисахарида. Одређиван је укупан садржај селена, угљених хидрата, β -глюкана, протеина, и фенола у екстрактима. Такође је урађена структурна анализа екстракта FT-IR спектроскопијом и одређен је моносахаридни састав HPLC методом. За добијање полисахаридног екстракта из плодносног тела гљива коришћен је поступак екстракције врелом водом и алкалне екстракције уз алкохолну преципитацију са 96% етанолом на хладном, 24 часа.

1. Након обогачивања гљива селеном, примећено је значајно смањење приноса полисахаридних екстраката, како водених тако и алкалних највероватније као последица смањења њихове растворљивости везивањем селена. Код свих екстраката, примећена је негативна корелација између приноса екстраката и садржаја селена у узорцима гљива. Принос полисахарида добијених врелом алкалном екстракцијом био је већи у односу на принос врелом воденом екстракцијом. Претпоставља се да је разлог овоме то што је врели алкални третман био ефективнији у деградацији ћелијског зида и водонерастворних материјала које су заостале након издвајања водорастворних компонента.

2. Испитивањем садржаја укупног селена у врелим воденим (мерење на ИЦП-ОЕС након киселинске хидролизе), а и алкалним полисахаридним екстрактима гљива, уочено је да се врло висок садржај селена задржава у полисахаридима. У поређењу са полисахаридом изолованим из плодносног тела гљиве *P. ostreatus* P70 обогачене селеном из неорганског извора, органски је у већој мери инкорпориран у полисахариду. Поредити резултате добијене за сојеве гљива обогачене селеном из квашчевог препарата, концентрација селена у обогаченим узорцима била је значајно већа у односу на контролне узорке. Доказана позитивна корелација између целих гљива и водених ($r=0.895$) и алкалних екстраката ($r=0.725$) када је реч о садржају селена. Статистичком анализом, утврђено је постојање најмање дупло веће концентрације селена у врелим воденим него у алкалним полисахаридним екстрактима, што значи да се селен највећим делом задржава у водорастворним компонентама. Алкални екстракт гљиве *P. salmoneostramineus* имао је највећу концентрацију селена и значајно се разликовао у односу на све остале сојеве.

3. Присутан селен који се везује за угљене хидрате, утицао је на садржај укупних угљених хидрата у полисахаридним екстрактима како врелим воденим тако и алкалним. Концентрација угљених хидрата у врелим воденим екстрактима са повећаном концентрацијом селена за *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus*, *P. ostreatus* P80 и *P. ostreatus* P70 кретала се редом 225.6mg/g, 457.6 mg/g, 412 mg/g и 420.4 mg/g. Разлика у односу на контролне гљиве није била значајна. С обзиром на то да су у питању непречишћени врели водени екстракти, претпоставља се да су на принос поред присутног селена утицале и друге присутне компоненте у екстракту, што поново зависи од сојева гљиве. Такође, као у случају врелог воденог екстракта, у алкалним екстрактима гљива са повећаним садржајем селена *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus*, *P. ostreatus* P80 и *P. ostreatus* P70 садржај укупних угљених хидрата био је већи у односу на контролне екстракте 684.3 mg/g, 665 mg/g, 696.4 mg/g и 577.2 mg/g. Могуће је да већи садржај ових полисахарида представља вид одбране од оксидативних оштећења. Такође, могућ је утицај селено једињења на ензиме гљиве. У алкалним екстрактима било је више угљених хидрата као последица разградње ћелијског зида под утицајем растварача.

4. Коришћењем бета глюкан кита, утврђено да се садржај β -глюкана у врелим воденим екстрактима са повећаном концентрацијом селена кретао 26.1-138.2 mg/g суве масе екстракта.

Код свих врелих водених екстраката са повећаним садржајем селена, детектован је значајно виши садржај β -гљукана. У случају соја *P. ostreatus* P70, код воденог екстракта са селеном добијеном из гљиве која је расла на супстрату са неорганским селеном и комплексом, дошло је до статистички значајног смањења садржаја β -гљукана. Из овога се претпоставља да врста једињења коришћења у суплементацији има важну улогу у садржају гљукана и предност је у коришћењу органског једињења селена. Примећено је да се у алкалним екстрактима налазило и до пет пута више β -гљукана у односу на одговарајуће вреле водене екстракте. У свим узорцима, осим у екстрактима гљиве *P. salmoneostramineus*, садржај β -гљукана био је статистички значајно мањи у односу на контролу, 100.7-224.8 mg/g суве масе екстракта.

5. Код воденог и алкалног екстракта свих узорака, постојала је значајна разлика у садржају фенолних једињења између контролних и екстраката са повећаним садржајем селена добијених код свих додаваних селено једињења. У врелим воденим екстрактима, укупан садржај фенола код узорака са повећаним садржајем селена био је за око 10-30% већи у односу на контролне узорке, осим у случају узорка са додатком селена из комплекса [Zn(dapsesc)]. Садржај фенолних једињења у обогаћеним екстрактима селеном из квасца кретао се од 3.82 mg/g до 15.6 mg/g. Код алкалних екстракта ефекат је био супротан, укупан садржај фенола код узорака са повећаним садржајем селена био је и до 80% мањи у односу на контролне узорке.

6. Концентрација протеина у екстрактима полисахарида одређена је спектрофотометријски методом по Брадфорду. Садржај укупних протеина за вреле водене екстракте са повећаним садржајем селена кретао се 327-526 mg/g, а у алкалним екстрактима са селеном 13.3-23.9 mg/g суве масе екстракта. У воденим екстрактима добијеним из селеном обогаћених *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus* и *P. ostreatus* P80 добијено је значајно већи принос протеина у односу на контролне екстракте. Код гљиве *P. ostreatus* P70, било је обрнуто, с тим што је највећи удео протеина нађен у екстрактима из гљиве са додатим неорганским селеном у односу на друга два органска извора. Највећи део протеина издвојен је врелом воденом екстракцијом док се алкалном екстракцијом издваја до 20 пута мање протеина. Овим се такође објашњава знатно нижа концентрација селена у алкалним екстрактима.

Полисахаридни екстракти представљају мешавину полисахарида, протеина и полифенола који су и даље присутни након вреле водене/алкалне екстракције и алкохолне преципитације из чега се изводи генералан закључак да на нутритивни састав утиче не само додаток селена већ и врста, старост, услови гајења гљиве, облик једињења селена додат у подлогу и касније поступак екстракције коришћен у припреми полисахарида. Врела водена екстракција праћена алкохолном преципитацијом нису биле довољан услов за потпуно уклањање протеина из екстракта. Из приложеног се види да су непречишћени врели водени екстракти заправо комплекс полисахарида и протеина, чиме се и објашњава висок проценат селена који је квантификован у екстрактима.

8. У циљу одређивања присутних гликозидних веза у полисахаридним екстрактима гљива, узорци су анализирани FT-IR спектроскопском методом, пресовањем КВг дискова. Добијени FT-IR спектри указују на то да полисахаридни екстракти имају спектре карактеристичне за угљене хидрате. Врели водени екстракти добијени из узорака гљива обогаћених селеном из квасца имали су израженије пикове α - и β -гликозидних веза него контролни екстракти. Такође, само код ових узорака детектоване су слабе апсорпционе траке карактеристичне за хемицелулозу. Посматрајући алкалне екстракте, једино су спектри карактеристични за α -гљукане били слични у узорцима са и без додатог селена. Апсорпционе траке карактеристичне за β -гљукане биле су интензивније у контролним екстрактима него у екстрактима са додатим селеном за све сојеве гљива. Претпоставља се да се селен везује за угљене хидрате и могуће је да је током алкалне екстракције отежана екстракција услед присуства селена. У алкалним екстрактима највећег броја узорака пик карактеристичан за β -гљукан био је одсутан, што указује на то да врела алкална екстракција деградира полисахариде нарочито у основном низу. На основу добијених

резултата, може се извести закључак да комбинација селена вероватно не утиче на главну структуру полисахарида. Поред наведеног, снимљени спектри указују и на присуство протеинске структуре, феонолне компоненте чиме се указује на присуство ароматичних једињења, вероватно пигмената. Пикови који указују на присуство хитина, тако да се претпоставља да су α -глюкани ковалентно везани за друге полимере као што је хитин за који се сматра да је главна фибриларна компонента полисахарида у ћелијском зиду врста гљиве *Pleurotus*.

9. Одређен је моносахаридни састав полисахаридних екстраката за 10 моносахарида. Полисахаридни екстракти хидролизоване су са трифлуорсирћетном киселином. Пре анализе вршена је ПМП дериватизација узорка и узорци су анализирани на RP-HPLC уређају. Код свих испитиваних сојева, најзаступљенији моносахариди били су редом глукоза, галактоза и маноза. Једино се за све екстракте испитиваних сојева гљиве може закључити да се ниво глукозе повећава у алкалним екстрактима у односу на вреле водене. Садржај галактозе и манозе је зависио од соја и врсте гљиве. Може се претпоставити да код соја P70 и сам тип једињења селена и начин екстракције утиче на моносахаридни састав полисахарида. Код гљиве *P. salmoneostramineus* фукоза је била значајно присутна код врелих водених екстраката, и то 2.82-6.64%. Могуће је да на детекцију моносахарида утицај врше и друге присутне компоненте које отежавају детекцију. Није било значајне разлике у моносахаридном саставу између контроле и обогаћених узорка, као ни између водених и алкалних екстракта. Остали детектовани моносахариди су такође компарабилни, али су присутни у знатно мањој концентрацији са доста ниским пиковима у односу на наведена 3 хексозна моносахарида. Може се извести закључак да на моносахаридни састав екстраката утичу тип селеноједињења, сој гљиве, услови гајења, старост гљиве и растворљивост у различитим растварачима. Разлика у моносахаридном саставу непречишћених врелих водених и алкалних екстраката може се објаснити тиме што су водорастворни полисахариди нерастворни у алкалијама и обрнуто. Ово утиче на разлику у моносахаридном саставу. Током алкалне екстракције, ћелијски зид се разара и интрамолекуларски полисахариди прелазе у растварач.

Урађена је и хемијска карактеризација протеина са селеном с обзиром на то да садржај протеина у гљивама зависи од састава супстрата, од таласа, времена бербе и врсте гљиве. Садржај протеина се брзо смањује током стајања убране гљиве. Циљ праћења трансформације селена у протеинима је између осталог побољшање статуса биоактивних протеина у гљивама, њихов биомедицински потенцијал и будуће перспективе у развијању нових фармацеутских производа из гљива.

1. Укупан садржај селена у водорастворним протеинима одређен је на ИЦП-ОЕС уређају. Добијени резултати указују на укупан садржај селена у протеинима од 54.68-134.6 $\mu\text{g/g}$ рачунато на суву масу. Удео селена у протеинима у односу на целу гљиву био је у просеку 44.45-70.34%, што је у складу са резултатима истраживања других аутора.

2. Урађена је квантификација 15 есенцијалних аминокиселина и додатно селенометионина за све испитиване врсте рода *Pleurotus*. Аминокиселински састав плодносног тела гљива одређен је на HPLC уређају. За детекцију селенометионина и метионина примењен је поступак базне хидролизе са 5M NaOH на 110°C у трајању од 16h. Након неутрализације, урађена је ОПА дериватизација узорка. Утврђено је да се аминокиселински састав различитих врста гљива није међусобно разликовао. Такође, утврђено је да није постојала статистички значајна разлика између гљиве са и без повећаног садржаја селена за сва испитивана једињења селена у гљивама, када је реч о есенцијалним аминокиселинама. То значи да заправо присутан селен не мења аминокиселински профил гљива, осим када је реч о аминокиселинама са сумпором.

Аминокиселинска анализа *Pleurotus* врста указује на доминантне глутаминску киселину (13.13-28.46 mg/g суве масе) и аспарагинску киселину 6.81-12.55 mg/g суве масе. Разлог може бити тај што су ове аминокиселине прекурсори из којих се формирају бочни ланци аминокиселина и то су складишне форме азота. У свим гљивама са повећаним садржајем селена, метионина је било

више у односу на селенометионин. Однос ове две аминокиселине код *P. ostreatus* P80 је око 10:1, *P. cornucopiae* 7:1, *P. salmoneostramineus* 9.5:1, а за *P. ostreatus* P70 0.8:1-2:1 зависно од врсте додатог једињења. То значи да супстрат на којем се гљива гаји и параметри гајења знатно утичу на однос ове две добијене киселине с обзиром на то да је једино гљива *P. ostreatus* P70 гајена у другачијим условима у односу на остале. Код анализе аминокиселинског састава, доказано је да је селенски квасац био најбољи извор селена у односу на друга два једињења. Овим се потврђује да непречишћени екстракти протеина због додатних нечистоћа не дају довољно прецизне резултате за тврдњу о расподели селена у плодносној телу гљиве.

Молекулске масе водорастворних протеина гљива анализирани су коришћењем натријум додецил сулфат полиакриламид гел електрофорезе (SDS-PAGE) методом по Leammli-ју. Овај тип електрофорезе вршен је на 4% концентришућем и 10% раздвајајућем полиакриламидном гелу. Добијене фракције су разврстане према молекулској маси. Узорци гљиве су имали широк опсег протеинских фракција, од око 9.5-110 кДа. Распоред фракција на SDS-PAGE гелу показује постојање значајне интраспецијске разлике. Протеинске фракције од око 15 кДа и између 30 и 40 кДа биле су доминантне за све проучаване сојева. Између сојева и врста проучаваних гљива било је приметне разлике у присутним протеинским фракцијама, међутим присутан селен у различитим облицима није утицао на промену молекулских маса. У соју *P. ostreatus* P70, доминантне су биле фракције од око 46 кДа, 36 кДа и 18 кДа. У соју *P. salmoneostramineus*, од око 36 кДа и 17 кДа, а у соју *P. ostreatus* P80 од око 40 кДа, 33 кДа и 18 кДа. У соју *P. cornucopiae*, доминантне су биле фракције од око 48 кДа, 40 кДа и 18 кДа.

Оптимизација процеса производње гљива урађена је у циљу дефинисања начина за што ефикасније обогаћивање гљива селеном из селенског квасца, у суви супстрат за гајење буковаче додат је селенски квасац у концентрацијама 25, 50, 75 и 100 mg/kg суве масе супстрата. Гљива је расла у лабораторијским условима под контролисаним параметрима. Способност апсорпције селена се смањивала пропорционално са повећањем количине селена додатог у супстрат. Токсични ефекат на раст гљива појавио се додавањем квасца са 75 mg/kg Se и више. Плодносна тела добијена у другом таласу имала су око 50% мање Se од оних у првом таласу. Могућност усвајања селена из селенског квасца потврђена је и на гљиви *Agaricus bisporus* када је апликација селенског квасца извршена у три стадијума производње: након засејавања, након покривања, након грабуљања. Гљива *Agaricus bisporus* највише селена је усвојила у плодносно тело додатком селенског квасца у компост одмах након инокулације мицелијумом. Велика разлика у количини усвојеног селена, зависно од тренутка апликације, објашњава се чињеницом да се селен задржао у покривци јер у каснијим фазама гљива има слабију способност апсорпције селена. Најнефикасније концентрације селенског квасца које су инхибирале раст плесни јесу концентрације 70-200 mg/kg селена. Препарат је показао фунгистатичко деловање на микопатогене гљиве. Додавањем концентрације од 100 mg Se/kg супстрата, селен ће успорити фруктификацију гљива за пар дана, али ће плодносна тела усвојити високе концентрације селена, око 100 µg/g за *Pleurotus spp.* рачунато на суву масу гљиве. На овај начин постигнут је двоструки ефекат гајења гљива са додатком селенског квасца у производни супстрат-смањење контаминације у погонима и добијање плодносног тела гљиве са високим садржајем селена, довољним за задовољење дневних потреба човека.

У поглављу **Закључци** кандидат је у кратким тезама изнела најрелевантније чињенице до којих је дошла на основу својих истраживања. На основу добијених резултата кандидаткиња је изнела закључке којима су остварени циљеви и потврђене хипотезе докторске дисертације.

Закључено је да усвајање и присуство метала у плодносној телу гљива зависи од еколошких фактора, генетских карактеристика сваке врсте појединачно, старости гљиве, као и облика у ком се елементи налазе у земљишту. Коришћење селенског квасца је потенцијални извор Se са низом предности.

Добијени резултати свакако потврђују да се селен везује за угљене хидрате као и то да врста једињења селена вероватно утиче на екстракцибилност угљених хидрата. Повећан садржај фенола у гљивама са додатим селеном може имати везе са инхибицијом ензима полифенолоксидазе селено-компонентама као снажним антиоксидантима.

Код свих испитиваних сојева, при додатку селена из селенског квасца дошло је до смањења у садржају липида, међутим код *P. ostreatus* P70 са додатком селена из комплекса или неорганске соли, садржај укупних липида је био већи у односу на контролне узорке. Присутан селен је мењао концентрацију липида, али не значајно.

Статистичком анализом, утврђено је постојање најмање дупло веће концентрације селена у врелим воденим него у алкалним полисахаридним екстрактима, што значи да се селен највећим делом задржава у водорастворним компонентама.

Код воденог и алкалног екстракта свих узорака, постојала је значајна разлика у садржају фенолних једињења између контролних и екстраката са повећаним садржајем селена добијених код свих додаваних селено једињења.

Највећи део протеина издвојен је врелом воденом екстракцијом док се алкалном екстракцијом издваја до 20 пута мање протеина. Овим се такође објашњава знатно нижа концентрација селена у алкалним екстрактима.

Хемијском анализом су потврђени литературни наводи да полисахаридни екстракти представљају мешавину полисахарида, протеина и полифенола који су и даље присутни након вреле водене/алкалне екстракције и алкохолне преципитације из чега се изводи генералан закључак да на нутритивни састав утиче не само додаток селена већ и врста, старост, услови гајења гљиве, облик једињења селена додат у подлогу и касније поступак екстракције коришћен у припреми полисахарида.

Добијени FT-IR спектри указују на то да комбинација селена вероватно не утиче на главну структуру полисахарида.

Није било значајне разлике у моносахаридном саставу између контроле и обогаћених узорака, као ни између водених и алкалних екстракта.

Такође је закључено да на моносахаридни састав екстраката утичу тип селеноједињења, сој гљиве, услови гајења, старост гљиве и растворљивост у различитим растварачима. Разлика у моносахаридном саставу непречишћених врелих водених и алкалних екстраката објашњена је тиме што су водорастворни полисахариди нерастворни у алкалијама и обрнуто. Током алкалне екстракције, хелијски зид је разорен и интрамолекуларски полисахариди прелазе у растварач.

Удео селена у протеинима у односу на целу гљиву био је у просеку 44.45-70.34%, што је у складу са резултатима истраживања других аутора. Утврђено је да се аминокиселински састав различитих врста гљива није међусобно разликовао. Такође, утврђено је да није постојала статистички значајна разлика између гљиве са и без повећаног садржаја селена за сва испитивана једињења селена у гљивама, када је реч о есенцијалним аминокиселинама. То значи да заправо присутан селен не мења аминокиселински профил гљива, осим када је реч о аминокиселинама са сумпором.

Код анализе аминокиселинског састава, доказано је да је селенски квасац био најбољи извор селенау односу на друга два једињења. Овим је потврђено да непречишћени екстракти протеина због додатних нечистоћа не дају довољно прецизне резултате за тврдњу о расподели селена у плодноном телу гљиве.

Велика разлика у количини усвојеног селена, зависно од тренутка апликације, објашњена је чињеницом да се селен задржао у покривци јер у каснијим фазама гљива има слабију способност апсорпције селена. Додавањем концентрације од 100 mg Se/kg супстрата, селен је успорио фруктификацију гљива за пар дана, али је плодно тело усвојило високе концентрације селена, око 100 µg/g за *Pleurotus spp.* рачунато на суву масу гљиве. На овај начин постигнут је двоструки ефекат гајења гљива са додатком селенског квасца у производни

супстрат-смањење контаминације у погонима и добијање плодносног тела гљиве са високим садржајем селена, довољним за задовољење дневних потреба човека.

У поглављу *Литература*, наведено је 260 референци које представљају избор најзначајнијих радова објављених у овој области. Цитиране референце обухватају широк спектар извора литературе што указује на темељно проучену проблематику од стране кандидата. Избор литературних извора је актуелан, а цитирање је изведено на правилан начин.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација *дипл. инж. Милене Савић* представља самостални научни рад у области могућности акумулације и трансформације селена у индустријским гљивама. Докторанткиња је систематски проучила резултате истраживања других аутора, дефинисала предмет и програм испитивања, поставила циљ, основне хипотезе, прикупила податке, применила адекватне математичко–статистичке методе за анализу и процену добијених резултата.

Резултати целокупног истраживања указују на то да јестиве гљиве имају низак садржај селена у плодносном телу, чиме се потврђује проблем дефицита у исхрани услед осиромашености земљишта. Добијени резултати указују на то да гљиве могу да акумулирају селен из неорганских и органских једињења селена којима се даје предност и која су први пут у овом раду испитивана на модел гљиви *Pleurotus spp.* Према резултатима експеримената, највећим делом се селен инкорпорира у полисахаридним и протеинским фракцијама растворним у води. Једним делом селен се налази и у облику селенометионина како је и претпостављено и у складу са литературним подацима. Такође, резултати указују на то да присутан селен утиче на нутритивни састав гљива и њихових полисахаридних екстракта. Добијени су прелиминарни резултати који се односе на трансформацију селена из органског једињења селена, као најпогоднијег извора селена за добијање обогаћених гљива. Селенски квасац у већим концентрацијама показује фунгистатичко деловање и омогућава производњу гљиве са високим садржајем селена у безбедним условима. У овом раду је по први пут поређена усвојивост селена у три различита облика посматрањем различитих врста једног рода гљиве. Такође, у раду је доказано да супстрат и услови гајења играју важну улогу у формирању нутритивног састава селеном обогаћених гљива. По први пут је испитано антифунгално деловање препарата селенског квасца на антагонистичке гљиве и усвојивост селена додатог у различитим фазама гајења.

Методе коришћене у истраживањима омогућиле су кандидату да адекватно и у потпуности провери постављену хипотезу и тако оствари постављени задатак и циљ. Рад је написан јасним стилем, а резултати су коректно објашњени, документовани и дискутовани. Током израде докторске дисертације, на темељу добијених резултата, проистекао је рад објављен у часопису међународног значаја категорије М23 и преко 30 научних радова у међународним и домаћим часописима са рецензијом и у зборницима радова са међународних и домаћих скупова.

Резултати које је добила кандидаткиња значајни су за ширење примене индустријских гљива, за детаљније разумевање утицаја различитих фактора гајења на хемијски састав гљиве и разлике међу сојевима. Резултати указују на то да се гљиве могу користити као потенцијални дијететски суплементи у циљу корекције исхране где је то потребно услед могућности апсорпције елемента селена присутног у различитим облицима једињења. Истраживања у овој докторској дисертацији су урађена у сагласности са планом и програмом који је предложен у Пријави докторске дисертације.

На основу свега изнетог, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију *дипл. инж. Милене Савић* „АКУМУЛАЦИЈА И ТРАНСФОРМАЦИЈА СЕЛЕНА У ИНДУСТРИЈСКИМ ГЉИВАМА“, и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета Универзитета у Београду да прихвати позитивну оцену и омогући кандидату јавну одбрану.

Чланови Комисије:

др Миомир Никшић, редовни професор
(област Технолошка микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Мирослав М. Врвић, редовни професор
(област Биохемија)
Универзитет у Београду, Хемијски факултет

др Љубинко Јовановић, редовни професор
(област Физиологија биљака)
Универзитет Едуконс, Факултет еколошке пољопривреде

др Анита Клаус, доцент
(област Технолошка микробиологија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Маја Козарски, доцент
(област Биохемија)
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Рад дипл. инж. Милене Савић објављен у научном часопису на SCI листи

Milena Savić, I. Anđelković, Dunja Duvnjak, Danka Matijašević, Aleksandra Avramović, Dragana Pešic-Mikulec and M. Nikšić (2012): The fungistatic activity of organic selenium and its application to the production of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp., *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64 (4), 1455-1463.