

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На VI редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 17. 04. 2015. године, прихваћен је извештај ментора др Мирјане М. Стајић, ванредног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Јелене Б. Вукојевић, редовног професора Биолошког факултета Универзитета у Београду о урађеној докторској дисертацији **Александра З. Кнежевића**, истраживача сарадника на Биолошком факултету Универзитета у Београду, под насловом **„Лигнинолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes* Fr.”**, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу др Мирјана Стајић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Вукојевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Илија Брчески, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду. Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидата и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација кандидата **Александра З. Кнежевића** под насловом **„Лигнинолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes* Fr.“** садржи: насловну страну на српском и енглеском језику, страну са подацима о менторима и члановима комисије, захвалницу, стране са подацима о докторској дисертацији на српском и енглеском језику (Резиме, Кључне речи, Научна област, Ужа научна област и УДК број), Садржај, текст рада по поглављима, Литературу, Биографију аутора, Изјаву о ауторству, Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјаву о коришћењу. Дисертација је написана на 161 страни, садржи 21 табелу (једна у поглављу Материјал и методе, 20 у поглављу Резултати и дискусија), 18 графика (у поглављу Резултати и дискусија), 15 слика (7 у поглављу Увод, једна у поглављу Материјал и методе и 7 у поглављу Резултати и дискусија) и 515 библиографских јединица. На почетку дисертације приложен је резиме на српском и енглеском језику (без пагинације). Пагинирани текст подељен је у 6 поглавља: Увод (39 страна), Циљеви рада (1 страна), Материјал и методе (15 страна), Резултати и дискусија (68 страна), Закључци (3 стране) и Литература (35 страна).

Анализа докторске дисертације:

У докторској дисертацији кандидат **Александар З. Кнежевић** је приказао: 1. оптимизацију услова култивације *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. са аспекта продукције и активности Mn-оксидујућих пероксидаза и лаказа и разлагања лигнина, хемицелулозе и целулозе одабраног биљног отпада; 2. ефекат различитих култивационих фактора на профиле Mn-оксидујућих пероксидаза и лаказа *T. gibbosa*; 3. интер- и интраспецијску варијабилност у својствима Mn-оксидујућих пероксидаза и лаказа, као и у нивоу деполимеризације лигнина, хемицелулозе и целулозе унутар рода *Trametes*; 4. антифунгалну, антиоксидативну, генопротективну и цитотоксичну активност екстракта плодноносних тела и мицелије *T. gibbosa*, *T. hirsuta* и *T. versicolor* као и њихов потенцијал инхибиције ацетилхолинестеразе и тирозиназе. У поглављу **УВОД**, кандидат је у оквиру четири потпоглавља дао детаљан приказ савремених истраживања која се односе на проблематику докторске дисертације, са посебним освртом на род *Trametes* и врсте *T. gibbosa*, *T. hirsuta*, *T. multicolor*, *T. pubescens*, *T. suaveolens* и *T. versicolor*. Представљена је

улога гљива у разградњи биљног отпада као и примена лигнинолитичких ензима у биотехнологији. Кандидат такође наводи различите аспекте медицинског значаја врста рода *Trametes* и кроз преглед досадашњих истраживања даје смернице за свој рад.

У складу са тим, кандидат је у поглављу **ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА** поставио неколико теза: тестирање различитих аспеката услова култивације у циљу постизања оптималних услова за продукцију и активност лигнинолитичких ензима и деградацију одабраног биљног отпада; карактеризацију Мп-оксидујућих пероксидаза и лаказа проучаваних врста и сојева; одрђивање антифунгалног, антиоксидативног, генопротективног и цитотоксичног потенцијала екстраката плодноносних тела и мицелије одабраних врста рода *Trametes*; утврђивање способности наведених екстраката да инхибирају активност ацетилхолинестеразе и тирозиназе.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** организовано је у 6 потпоглавља. Представљене су тестиране врсте и сојеви рода *Trametes*, њихово порекло и начин култивације. Описани су поступци припреме инокулума, култивације мицелије на одабраном биљном материјалу, екстракције и карактеризације лигнинолитичких ензима. Приказане су аналитичке процедуре за квантитативну анализу хемицелулозе, целулозе и лигнина у биљном отпаду (Ван Сестова и Класонова метода). Дате су методе култивације одабраних врста рода *Trametes* и екстракције добијене мицелије и плодноносних тела. Представљене су тестиране врсте микромицета и микродилуциона метода за одређивање антифунгалног потенцијала екстраката. Антиоксидативни потенцијал екстраката одређиван је спектрофотометријски коришћењем DPPH, ABTS и FRAP теста. Спектрофотометријски је одређиван садржај фенола и флавоноида као и коефицијент њихове корелације са нивоом антиоксидативне активности. Описан је Комет тест као метода за одређивање степена оштећења ДНК. МТТ-тестом је праћена цитотоксична активност екстраката према ћелијским линијама хуманог аденокарцинома грлића материце (HeLa), хуманог карцинома дебелог црева (LS174) и хуманог аденокарцинома плућа (A549). *In vitro* је одређиван потенцијал екстраката да инхибирају активност ацетилхолинестеразе и тирозиназе. У статистичкој обради података коришћене су параметарске статистичке анализе (ANOVA, GLM и χ^2 тест) у програму STATISTICA, верзија 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) и програмском окружењу R, верзија 3.2.0 (R Core Team, 2014).

У поглављу **РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА**, кандидат је резултате систематизовао у три потпоглавља и на адекватан начин их приказао, тумачио и дискутовао поредећи их са савременим научним сазнањима у овој области.

У првом потпоглављу су приказани резултати оптимизације услова култивације *T. gibbosa* ВЕОФВ 310 као модел организма у циљу повећања активности лигнинолитичких ензима и степена деградације биљног отпада. Показано је да је чврста ферментација лигноцелулозе ефикаснији приступ са аспекта продукције лигнинолитичких ензима и деградације лигнина а да је пшенична слама бољи извор угљеника од пиљевине букве. Такође је забележено да постоји динамика у активности Мп-оксидујућих пероксидаза и лаказа и да је 19. дан оптималан како за активност тестираних ензима тако и за лигнинолизу. Најбољи извор азота је био $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ а оптимална концентрација 10,0 mM, док је додавање пшеничних мекиња у уделу од 10% додатно стимулисало активност Мп-зависне пероксидазе. Присуство Zn и Mn у медијуму је имало стимулативни ефекат на активност Мп-оксидујуће пероксидазе а Zn и Fe на лаказе. Fe је у концентрацији од 0,5 mM довело до највеће селективности у разградњи лигнина у односу на целулозу (54,7% према 23,2%).

У другом потпоглављу је описана интер- и интраспецијска варијабилност у својствима Мп-оксидујућих пероксидаза и лаказа и нивоа деградације лигнина, хемицелулозе и целулозе унутар рода *Trametes* (6 врста са укупно 11 сојева) при ферментацији пшенична слама/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /мекиње медијума обогаћеног са *p*-анизидином, односно вератрил алкохол као индуцерима ензимске активности. Резултати су показали да постоји значајна варијабилност у одговору на третман овим једињењима између испитиваних сојева. Показано је да су фактори који утичу на ензимску активност и ефикасност деградације сој, третман и њихова међусобна интеракција, и да је Мп-зависна пероксидаза ензим од највећег значаја за процес разградње лигнина. Вератрил алкохол је имао стимулативно дејство како на активност Мп-оксидујућих пероксидаза тако и лаказа код

највећег броја испитиваних сојева. Додавање *p*-анизидина медијуму је водило најефикаснијој лигнинолизи, тј. највећој разлици у нивоу деградације лигнина у односу на целулозу, у присуству *T. hirsuta* ВЕОФВ 30.

У трећем потпоглављу приказан је упоредни преглед приноса биомасе мицелије три тестиране врсте рода *Trametes*, антифунгалног, антиоксидативног, генопротективног и цитотоксичног ефекта екстраката њихових плодоносних тела и мицелије, као и потенцијала инхибиције ацетилхолинестеразе и тирозиназе. Показано је да етанолни екстракти базидиокарпа и мицелије нису имали значајну антифунгалну активност, с обзиром да су вредности добијене за МИС биле изузетно високе, а свега један екстракт је испољио фунгицидни ефекат. Базирано на МИС вредностима екстраката антифунгални капацитет је опадао следећим редоследом: *Candida parapsilosis* > *C. albicans* > *Aspergillus glaucus* > *C. krusei* > *A. fumigates* > *A. flavus*. Резултати су показали да се екстракти мицелије одликују умереним а екстракти плодоносних тела знатно већим потенцијалом неутрализације DPPH и ABTS радикала као и редукције Fe²⁺ у поређењу са синтетичким антиоксидансом, L-аскорбинском киселином. Феноли и флавоноиди су детектовани у свим екстрактима а њихов садржај је био у позитивној корелацији са нивоом неутрализације DPPH и ABTS радикала. Такође је показано да су тестирани екстракти имали генопротективну активност на леукоците пре- и пост-третиране са H₂O₂ која се огледала у смањењу укупног броја ћелија са ДНК оштећењима. МТТ-тестом је утврђена цитотоксична активност свих тестираних екстраката на HeLa, LS174 и A549 ћелије. IC₅₀ вредностима је показано да су HeLa ћелије биле најосетљивије на тестиране екстракте а мицелијски екстракт *T. hirsuta* се одликовао задовољавајућим нивоом селективности на тестиране ћелијске линије канцера. Екстракти плодоносних тела и мицелије проучаваних врста су показали изузетан потенцијал у инхибицији ацетилхолинестеразе и тирозиназе а ниво инхибиције се кретао у опсегу од 24,7% до 28,9% односно 49,5% до 92,7%. У поређењу са којичном киселином као синтетичким инхибитором тирозиназе, екстракти *T. versicolor* су били значајно бољи инхибитори овог ензима.

У сваком од наведених потпоглавља кандидат дискутује добијене резултате поређењем са најновијим сазнањима из области и истиче могућност њихове примене. Цитирана је релевантна литература и дати могући правци будућих истраживања. Кандидат истиче да ова истраживања представљају добру полазну основу за наставак проучавања са циљем ефикаснијег коришћења сојева различитих врста рода *Trametes* у процесима делигнификације биљног отпада као и добијања природних помоћних средстава.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидат сумира добијене резултате и изводи закључке везане за: 1. оптимизацију процеса ферментације пшеничне сламе са *T. gibbosa*, 2. интер- и интраспецијску варијабилност у продукцији лигнинолитичких ензима и лигнинолизи одабраним сојевима врста рода *Trametes* и 3. одређивање антифунгалне, антиоксидативне, генопротективне, цитотоксичне и антинеуродегенеративне активности етанолних екстраката плодоносних тела и мицелије тестираних врста.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 515 библиографских јединица. Литературни извори су адекватно одабрани из обимне литературе и на одговарајућим местима цитирани у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

B1. Радови у часописима међународног значаја

1. **M21** Ćilerdžić, J., Stajić, M., Duletić-Laušević, S., Vukojević, J., **Knežević, A.** (2011): Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *Bioresources*, 6(3): 2885-2895.
2. **M21** **Knežević, A.**, Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., Ćilerdžić, J. (2013): Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117-123.
3. **M21** Stajić, M., Vukojević, J., **Knežević, A.**, Duletić Laušević, S., Milovanović, I. (2013): Antioxidant protective effects of macromycete metabolites. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(21): 2660-2676.
4. **M21** **Knežević, A.**, Živković, L., Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, M., Spremo-Potparević, B. (2015): Antigenotoxic effect of *Trametes* spp. extracts against DNA damage on human peripheral white blood cells. *Scientific World Journal*, DOI. 10.1155/2015/146378.
5. **M22** **Knežević, A.**, Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2013). Potential of *Trametes* species to degrade lignin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85: 52-56.
6. **M22** **Knežević, A.**, Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, I. (2014). The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 152-156.

B2. Радови у часописима домаћег значаја

1. **M51** **Knežević, A.**, Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2013). *Trametes suaveolens* as ligninolytic enzyme producer. *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad*, 124: 437-444.

B3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M33** **Knežević, A.**, Simonić, J., Stajić A. i Vukojević, J. (2009). Effect of selected plant raw material on production of laccase and lignin peroxidase by *Trametes hirsuta*. V International conference "The Study of Fungi in Biogeocenoses", Perm, Russia, 7th-13th. September, Proceedings: 120-123.
2. **M33** Vukojević, J., Stajić, M., Simonić, J. i **Knežević, A.** (2009). Production of Mn-oxidizing peroxidases by *Ganoderma* and *Trametes* species of different plant residues. V International conference "The Study of Fungi in Biogeocenoses", Perm, Russia, 7th-13th. September, Proceedings: 59-62.
3. **M33** Stajić, M., **Knežević, A.**, Vukojević, J. (2011). Effect of selected nitrogen sources on Mn-oxidizing peroxidases activity in *Trametes gibbosa*. 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom products. Arcachon, France 4th -7th October. Proceedings: 150-154.
4. **M34** **Knežević, A.**, Stajić, M., Vukojević, J. (2011). Diversity assessment in ligninolytic enzyme production by selected *Trametes* species (higher Basidiomycetes). The sixth International Medicinal Mushroom Conference. Zagreb, Croatia. 25th – 29th September. Book of abstracts: 21-22.
5. **M34** **Knezevic, A.**, Milovanovic, I., Stajic, M., Cilerdzic, J., Vukojevic, J. (2012). Effect of wheat bran on ligninolytic enzyme production by *Trametes gibbosa*. 3rd African Conference on Edible and Medicinal Mushrooms (ACEMM). Windhoek, Namibia. 24-28 June.

6. **M34** Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. (2012). Potential of selected *Trametes* species to degrade lignin of wheat straw. 4th Congress of Ecologists of The Republic of Macedonia With International Participation, Ohrid, FYR Macedonia. 12-15 October. Abstract book: pp 28-29.
7. **M34** Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2013). Antioxidant properties of *Trametes versicolor* and *T. hirsuta*. The 7th International Medicinal Mushroom Conference. Beijing, China. 26th – 29th August. Book of abstracts: 148-149.
8. **M34** Živković, L., Spremo-Potparević, B., Knežević, A. (2013). Protective effects of *Trametes versicolor* extract against oxidative stress induced by H₂O₂ in human lymphocytes *in vitro*. The 7th International Medicinal Mushroom Conference. Beijing, China. 26th – 29th August. Book of abstracts: 149-150.
9. **M34** Knežević, A., Milovanović, I., Živković, L., Stajić, M., Vukojević, J., Spremo-Potparević, B. (2013). Antioxidant and genoprotective properties of *Trametes gibbosa* extracts. 4th Croatian Botanical Symposium with international participation. Split, Croatia. 27th – 29th September. Book of Abstracts: 143.

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

1. **M64** Knežević, A., Šesterikov, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2010). Ability of ligninolytic enzymes production by selected medicinal mushrooms. VII Kongres Mikrobiologa Srbije. 03.-05. jun 2010. (7th Congress of Serbian Microbiologists. 3rd – 5th June).

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација Александра З. Кнежевића под насловом “**Лигниолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes Fr.***” представља свестрано и савремено урађену студију из области микологије. По свом обиму, садржају, оригиналности резултата, начину њиховог представљања и интерпретацији, уз осврт на релевантну и обимну литературу, представљени текст има све одлике квалитетне докторске дисертације. На квалитет рада је утицао спој знања и умећа кандидата који је аутор и коаутор публикација у врхунским и истакнутим међународним часописима и водећем часопису националног значаја што потврђује актуелност истраживања и могућност даљег развоја.

Комисија сматра да докторска дисертација Александра З. Кнежевића по приступу и резултатима представља значајан допринос како познавању лигниолитичког система тако и медицинским својствима екстракта одабраних врста рода *Trametes*. Поред одговора на постављене циљеве истраживања, кандидат на основу резултата вишегодишњих проучавања указује и на смернице за будућа истраживања и могућност мултидисциплинарног приступа овој проблематици уз сарадњу са иностраним експертима, тимовима и институцијама.

Чланови Комисије, са посебним задовољством, истичу да је кандидат резултате докторске дисертације представио у 4 рада публикована у врхунским међународним часописима и 2 рада у истакнутом међународном часопису, од чега је на 4 рада први аутор. Такође, учествовао је и са 9 саопштења на међународним научним скуповима, међу којима су 3 штампана у целини а са једним саопштењем штампаним у изводу је учествовао на скупу националног значаја.

Кандидат је у току досадашњег научно-истраживачког рада публиковао укупно 12 радова у међународним научним часописима (6 у врхунским међународним часописима (M21), 2 у истакнутом међународном часопису (M22) и 4 рада у међународном часопису (M23)), 2 рада у водећем часопису националног значаја и 21 саопштење на међународним и домаћим научним скуповима. Треба нагласити да се ради о веома добро профилисаном и вредном кандидату који је показао завидно знање и вештине у оквиру перспективне области истраживања којом се бави.

На основу свега изложеног, Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри јавну одбрану докторске дисертације кандидата **Александра З. Кнежевића** под насловом „**Лигниолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes Fr.***” пред комисијом у истом саставу, др Мирјана Стајић, ванредни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Јелена Вукојевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду и др Илија Брчески, ванредни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду.

У Београду, 15. 07. 2015. године.

КОМИСИЈА:

Др Мирјана Стајић, ванредни професор
Биолошки факултет Универзитета у Београду

Др Јелена Вукојевић, редовни професор
Биолошки факултет Универзитета у Београду

Др Илија Брчески, ванредни професор
Хемијски факултет Универзитета у Београду