

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
Број захтева: 461/8-7.1.  
Датум: 24.05.2017.

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 **ДАНКА (Милан) МАТИЈАШЕВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: "Утицај Se(IV)- и Se(VI)- модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикуробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*",

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 11.04.2013. године, својим актом број 61206-801/2-13, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: "Утицај Se(IV)- и Se(VI)- модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикуробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*".

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 29.03.2017. године, одлуком Факултета број 461/6-4.1, 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 Милена Пантић, доцент, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Сања Јевтић, доцент, Неорганска хемија, Универзитет у Београду - Технолошко-металуршки факултет,
4. др Владимир Павловић, редовни професор, Физика кондензованог стања, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Анита Клаус, ванредни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет.

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 24.05.2017. године.

**ДЕКАН ФАКУЛТЕТА**

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ  
Број: 461/8-7.1.  
Датум: 24.05.2017. године  
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 128. Закона о високом образовању и члана 38. Правилника о правилима академских студија другог и трећег степена, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 24.05.2017. године, донело је

### О Д Л У К У

**I ПРИХВАТА СЕ** извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ДАНКА МАТИЈАШЕВИЋ, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«УТИЦАЈ SE(IV)- И SE(VI)- МОДИФИКОВАНОГ ЗЕОЛИТА НА АНТИОКСИДАТИВНО И АНТИМИКРОБНО ДЕЈСТВО ГЉИВА *PLEUROTUS OSTREATUS* И *CORIOLUS VERSICOLOR*».**

**II** Универзитет је дана 11.04.2013. године, својим актом број 61206-801/2-13, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

**III** Рад кандидата у часопису међународног значаја:

**Matijašević D.,** Pantić M., Rašković B., Pavlović V., Duvnjak D., Sknepnek A., Nikšić M. (2016): The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in Microbiology*, 7:1226, doi: 10.3389/fmicb.2016.01226

**ПРЕДСЕДНИК  
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА  
ДЕКАН**

---

**(Проф. др Милица Петровић)**

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

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ  
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА  
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**  
Датум:03.04.2017.

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације Данке Матијашевић, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/6-4.1 од 29.03.2017. године, именовани смо у Комисију за оцenu и одбрану докторске дисертације под насловом: „Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикуробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*“ кандидата Данке Матијашевић дипл. инж., и пошто смо проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

## **ИЗВЕШТАЈ**

### **1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ**

Докторска дисертација дипл. инж. Данке Матијашевић написана је на 165 страна текста и укључује 18 табела, 20 графикана и 13 слика. Испред основног текста налази се резиме са кључним речима, на српском и енглеском језику и приказ садржаја. Докторска дисертација садржи седам поглавља, и то: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-41), Циљеви рада (стр. 42), Материјал и методе (стр. 43-58), Резултати и Дискусија (стр. 59-131), Закључак (стр. 132-140) и Литература (стр. 141-165). После главног текста приказана је Биографија кандидата (стр. 166) и обавезне изјаве. Поголавља Преглед литературе, Материјал и методе и Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

### **2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

**Увод.** У Уводу је истакнут медицински значај гљива, као и њихова способност апсорпције и акумулације микронутријената из супстрата на којем се гаје. Указано је на важну улогу селена за нормално функционисање организма и на чињеницу да земљиште Србије, као и животне намирнице спадају међу селеном најсиромашније у свету. Познато је да минерал зеолит додат у подлогу за гајење гљива побољшава хемијски састав плодноносних тела, као и да нема штетно дејство на здравље људи и животиња. Могућност акумулације селена из модификованог зеолитског туфа на којем су адсорбовани селенит- и селенат-јони није раније испитивана.

**Преглед литературе.** У *Прегледу литературе* који има шест потпоглавља обрађени су доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације.

У првом потпоглављу *Више гљиве – царство Fungi* кандидаткиња истиче нутритивни и медицински значај гљива, са посебним акцентом на врсте *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*. Истакнуте су до данас познате и описане биолошки активне компоненте одабраних гљива.

У другом потпоглављу *Антимикробна дејства* дат је осврт на почетак употребе антибиотика, као и на актуелни проблем све учесталије појаве резистенције микроорганизама. Преглед истраживања која су се базирала на могућности коришћења гљива из раздела базидиомикота као извора једињења са антимикробним својствима детаљно је описан. Наведене су и компоненте идентификоване у екстрактима гљива за које је доказана антибактеријска активност као и механизми њиховог дејства. У трећем потпоглављу *Оксидативни стрес и реактивне хемијске врсте* обрађене су теоријске основе формирања слободних радикала у организму, као и механизми њиховог неутралисања системима антиоксидативне заштите. Истакнута је и основна улога и карактеристике ензимских компонената примарне антиоксидативне заштите у које спадају супероксид-дисмутаза, каталаза, глутатион-пероксидаза и глутатион-редуктаза. У четвртном потпоглављу *Антиоксидативна својства гљива* описане су јестиве и медицински важне гљиве за које је утврђено да поседују значајан антиоксидативни потенцијал. Наведене су и компоненте екстракта гљива којима се приписује антиоксидативна активност. У петом потпоглављу *Селен* указано је на неопходност селена за нормалан метаболизам ћелија, а дат је и преглед животних намирница које представљају важан извор овог елемента. Посебно су истакнута бројна истраживања која су имала за циљ да испитају способност јестивих и медицинских гљива да акумулирају селен, затим да идентификују једињења присутна у селеном обогаченим гљивама као и да испитају биодоступност у организму. Скренута је пажња на бивалентни ефекат селена, односно на последице прекомерног и недовољног уноса. У шестом потпоглављу *Природни зеолити* објашњена је грађа зеолита и образовање кристалне решетке. Порозност, адсорпција и јоно-измењивачка својства зеолита детаљније су описана. Наведена је и примена овог минерала у различитим областима пољопривреде, индустрије и заштити животне средине.

**Циљеви рада.** Циљеви ове докторске дисертације полазе од хипотезе да гљиве осим што представљају важан извор биолошки активних компоненти, са позитивним дејством на људски организам, поседују и способност акумулације микронутриената, попут селена из супстрата на којем се гаје. Циљ дисертације је да пружи детаљнији увид у могућност примене гљива обогачених селеном у терапеутске сврхе. На основу усвојивости селена од стране гљива утврђен је најбољи извор овог елемента и потом је установљен његов утицај на активност ензима примарне антиоксидативне заштите. Испитивањем антиоксидативних и антимикробних својстава екстракта изолованих из гљива обогачених селеном тестиран је њихов биолошки потенцијал.

**Материјал и методе.** Методе које су коришћене у дисертацији су представљене у девет потпоглавља. Мицелијум гљиве *Coriolus versicolor* потиче из колекције култура Катедре за технолошку микробиологију, док је гљива *Pleurotus ostreatus* P80 комерцијални сој италијанске фирме Italspawn.

У првом потпоглављу *Модификација зеолитског туфа и адсорпција селенит- и селенат- јона* описан је поступак модификације зеолитског туфа пореклом из лежишта Златокоп, у близини Врањске Бање у Србији. Зеолитски туф модификован раствором гвожђе(III)-сулфата коришћен је за адсорпцију селенит- и селенат-јона. Концентрација селена одређена је применом атомске апсорпционе спектроскопије. У другом потпоглављу *Одређивање брзине раста мицелије на лабораторијским хранљивим подлогама* испитан је утицај селена додатог у виду различитих једињења,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  и  $\text{Se(IV)}$ - и  $\text{Se(VI)}$ -модификованог зеолита на раст мицелијума одабраних врста гљива. Раст је праћен на сладном агару (HiMedia) као и на пшеничној слами. У трећем потпоглављу *Индустријски поступак гајења гљива* детаљно је описан примењени супстрат, као и поступак и услови неопходни за добијање свежих плодноносних тела одабраних врста гљива.

У четвртом потпоглављу *Одређивање ензимских антиоксиданата у свежим плодноносним телима* утврђена је активност ензима супероксид-дисмутазе, спектрофотометријски, методом по Beauchamp и Fridovich (1971). Активност ензима глутатион-пероксидазе одређена је применом Ransel кита (Randox Laboratories Ltd., UK), а по методи Paglia и Valentine (1976), док је активност каталазе утврђена методом коју је описао Claiborne (1984). Распоред протеинских бендова за узорке гљива са и без додатог селена анализиран је методом по Laemmli-ju (1970) применом SDS-PAGE гел електрофорезе.

У петом потпоглављу *Одређивање садржаја укупног селена у плодноносним телима гљива и метанолним екстрактима* утврђен је садржај селена применом масене спектрометрије са индуктивно куплованом плазмом (Agilent 8800 QQQ ICP-MS). У шестом потпоглављу *Припрема метанолних екстраката* описан је поступак добијања екстраката из осушених узорака гљива применом метанола. Добијени супернатанти су упарени на ротационом вакуум упаривачу модел R-II (BUCHI, Швајцарска).

У седмом потпоглављу *Хемијска карактеризација метанолних екстраката* у добијеним екстрактима одређен је садржај укупних угљених хидрата - спектрофотометријски фенол-сумпорном методом, садржај укупних протеина методом по Bradford-у (1976) и садржај укупних липида применом сулфо-фосфо-ванилинског реагенса и холестерола као стандарда. Укупни феноли су одређени помоћу Folin-Ciocalteu реагенса и галне киселине као стандарда, док су укупни флавоноиди утврђени према методи Jia и сарадника (1999). Садржај укупних,  $\alpha$ - и  $\beta$ -гљукана одређен је помоћу ензимског кита Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay Procedure K-YBGL (Megazyme Int., Ирска). Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ATR-FTIR, Shimadzu, Јапан) примењена је за идентификацију органских компоненти у метанолним екстрактима гљива. У осмом потпоглављу *Биолошка својства метанолних екстраката* одређена су антиоксидативна и антимикробна својства екстраката припремљених из контролних и гљива обогаћених селеном. Антиоксидативна својства екстраката гљива *Coriolus versicolor* и *Pleurotus ostreatus* у *in-vitro* условима утврђена су применом различитих метода. Испитана је способност инхибиције липидне пероксидације коњуген-диенском методом, способност хватања слободних 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикала методом по Bilos-у (1958), редукциона способност методом по Oyaizu-у (1986) и способност хелирања јона гвожђа према модификованој методи Dinis-a и сарадника (1994). Испитивање антимикробних својстава метанолних екстраката гљива урађено је на девет Грам позитивних, десет Грам негативних бактерија и два квасца. Сви коришћени микроорганизми пореклом су из америчке типске колекције култура, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације испитане су применом микродилуционе методе у 96-ћелијским микротитар плочама. Као индикатори респираторне активности коришћене су боје 2,3,5-трифенилтетразолијум хлорид и ресазурин (Sigma Chemical Co.). Кинетика раста микроорганизма одређена је мерењем оптичке густине помоћу читача микротитар плоча (ELx808, BioTek Instruments, Inc., USA) контролисаног Gen5<sup>TM</sup> софтвером. Морфолошке и ултраструктурне промене бактеријских ћелија настале под дејством екстраката гљива посматране су помоћу скенирајућег електронског микроскопа JEOL JSM-6390LV (JEOL USA, Inc.) и трансмисионог електронског микроскопа JEM-1400 (JEOL USA, Inc.). У деветом потпоглављу *Статистичка анализа података* наведено је да је обрада података извршена применом Origin Pro 9.0 и Ms Excel програма. Експериментални подаци су подвргнути једнофакторијелној анализи варијанси и Tukey-евом тесту да би се утврдила статистички значајна разлика на нивоу  $\alpha \leq 0,05$  између средњих вредности.

За одређивање корелације између променљивих коришћен је Pearson Correlation Coefficient Calculator.  $EC_{50}$  вредност одређена је линеарном регресионом анализом помоћу сајта <http://easycalculation.com/statistics/regression.php>.

**Резултати и Дискусија.** Резултати истраживања обрађени су у оквиру седам потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике, прегледне табеле и графиконе који илуструју истраживања, а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења. У првом потпоглављу *Se(IV)- и Se(VI)-обогаћени зеолит* урађена је карактеризација модификованог зеолитског туфа (Златокоп, Врањска Бања) коришћеног у раду. Рендгенска анализа узорка зеолитског туфа показала је да он садржи 72,6 мас.% клиноптилолита, док се као примесе појављују фелдспат и кварц. Елементном EDS-анализом Fe(III)-модификованог зеолита, који је коришћен као адсорбент селенит- и селенат-јона, је показано да се након модификације масени удео гвожђа у туфу повећао, док је TEM-анализом утврђено да је секундарни порозни слој присутан на површини зеолита аморфан и да одговара оксиду гвожђа. Установљено је да из раствора селенит-јона Fe-обогаћени зеолит веже  $21 \text{ mg Se g}^{-1}$ , док из раствора са селенитом веже  $17 \text{ mg Se g}^{-1}$ . Механизам адсорпције анализиран је EXAFS- и XANES-методом при чему је показано да се Se за површину Fe-зеолита везао успостављањем Fe(III)-O-Se и Se-O-Si веза. У другом потпоглављу *Одређивање брзине раста мицелије гљива Pleurotus ostreatus и Coriolus versicolor на лабораторијским хранљивим подлогама* приказан је утицај различитих једињења са селеном додатих у подлогу на раст мицелија гљива. Као најбољи извор селена, при свим испитиваним концентрацијама, издвојио се Se(IV)-обогаћен зеолит, док је највећа инхибиција раста мицелије одабраних гљива установљена додатком  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . У трећем потпоглављу *Усвајање селена у плодносна тела гљива Pleurotus ostreatus и Coriolus versicolor* испитан је утицај различитих једињења са селеном додатих у супстрат на акумулацију овог елемента у плодносна тела гљива. Са повећањем концентрације селена додате у супстрат повећала се и апсорбована концентрација од стране гљиве *P. ostreatus*. Највећа концентрација селена, утврђена у карпофору ове гљиве је постигнута додатком  $75 \text{ mg Se kg}^{-1}$  у виду  $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$  и била је око 450 – 550 пута већа у поређењу са контролним узорком. За разлику од буковаче, већа концентрација селена додата у супстрат, резултирала је смањењем способности акумулације овог елемента од стране гљиве *C. versicolor*. Додатком селена у супстрат у концентрацији од  $62,5 \text{ mg kg}^{-1}$  у виду  $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$  установљено је да је његов садржај у плодносном телу био и до два пута већи у поређењу са додатком  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  и  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ . У четвртм потпоглављу *Одређивање активности ензимских антиоксиданата у свежим плодносним телима гљива Pleurotus ostreatus и Coriolus versicolor* анализиран је утицај селена додатог у супстрат у виду Se-обогаћеног зеолита ( $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$ ) на активност ензима супероксид-дисмутазе, глутатион-пероксидазе и каталазе. Јача активност ензима супероксид-дисмутазе и глутатион-пероксидазе установљена је код свих узорака гљиве *P. ostreatus* одгајеним на супстрату са додатком селена у поређењу са контролним узорком. Активност каталазе је зависила од концентрације селена додате у подлогу и јача активност је детектована додатком ниже концентрације ( $50 \text{ mg Se kg}^{-1}$ ) у супстрат. Активност ензима гљиве *C. versicolor* зависила је од једињења и концентрације селена додате у подлогу. Додатком  $50 \text{ mg Se kg}^{-1}$  у виду Se(IV)-обогаћеног зеолита установљена је јача активност глутатион-пероксидазе, док се активност супероксид-дисмутазе и каталазе није статистички значајно разликовала од контролног узорка. За узорке  $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$  62,5,  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$  50 и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$  62,5 утврђена је јача активност супероксид-дисмутазе и каталазе, док се активност ензима глутатион-пероксидазе смањила у односу на контролну гљиву.

Применом SDS-PAGE гел електрофорезе за гљиву *C. versicolor* детектован је већи број протеинских фракција и шири опсег молекулских маса у поређењу са гљивом *P. ostreatus*. Установљено је и да селен присутан у узорцима није утицао на промену молекулских маса протеина испитиваних гљива.

У петом потпоглављу *Принос екстраката гљива* показано је да не постоји статистички значајна разлика у приносу екстраката добијених из контролних и гљива обогаћених селеном. Установљено је и да је принос екстраката гљиве *P. ostreatus* био приближно пет пута већи у поређењу са екстрактима изолованим из гљиве *C. versicolor*, што је вероватно последица припадности различитим родовима. У шестом потпоглављу *Хемијска карактеризација метанолних екстраката гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor** анализиран је садржај различитих компонената присутних у екстрактима. Садржај селена у метанолним екстрактима гљиве *P. ostreatus* обогаћене овим елементом је био између  $8\text{--}27\ \mu\text{g Se g}^{-1}$ , док је у екстрактима гљиве *C. versicolor* утврђен доста већи садржај од око  $105\text{ до }140\ \mu\text{g Se g}^{-1}$ , што указује на другачију дистрибуцију селена у испитиваним гљивама. Већи садржај полисахарида, укупних глукана,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глукана детектован је у свим екстрактима изолованим из гљиве *P. ostreatus* обогаћене селеном у поређењу са контролним узорком, док је у екстрактима гљиве *C. versicolor* већи садржај ових полисахаридних компоненти установљен само додатком ниже концентрације ( $50\ \text{mg Se kg}^{-1}$ ) у супстрат. Садржај укупних липида и протеина у екстрактима гљиве *P. ostreatus* зависио је од концентрације селена додате у подлогу. Додатком  $75\ \text{mg Se kg}^{-1}$  ( $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 75$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 75$ ) у супстрат примећен је већи садржај липида и протеина у односу на контролни екстракт, док је концентрација од  $50\ \text{mg Se kg}^{-1}$  условила смањење садржаја ових једињења у екстракту. Већи садржај липида и протеина детектован је у свим екстрактима гљиве *C. versicolor* обогаћене селеном у поређењу са контролним узорком. Садржај укупних фенола у екстрактима добијеним из гљиве *P. ostreatus*, одгајене на супстрату са додатком селена, се повећао у односу на контролни екстракт, док је њихов садржај у екстрактима гљиве *C. versicolor* зависио од концентрације додатог селена. Већи садржај укупних флавоноида установљен је код свих екстраката добијених из гљива обогаћених селеном у односу на контролне екстракте. Применом FT-IR анализе није уочена значајнија разлика у спектрима између екстраката изолованих из гљива *P. ostreatus* и *C. versicolor* одгајеним на супстрату са и без додатка селена. Најизраженије спектралне разлике између контролних и екстраката припремљених из селеном обогаћених гљива се детектују у амидном региону, на око  $1630\ \text{cm}^{-1}$ , који указује на присуство протеина.

У седмом потпоглављу *Биолошка својства метанолних екстраката* испитана су антиоксидативна и антимикробна својства екстраката гљива *P. ostreatus* и *C. versicolor*, како контролних тако и обогаћених селеном. Метанолни екстракти изоловани из гљиве *P. ostreatus* обогаћене селеном испољили су јаче антиоксидативно дејство у процесу инхибиције пероксидације липида у модел систему линолеинске киселине, затим бољу способност хватања слободних DPPH радикала, јачу способност редукције Fe(III)-јона и способност хелирања Fe(II)-јона у односу на контролни екстракт у испитиваном опсегу концентрација. Најјачи антиоксидативни потенцијал, у свим испитиваним методама, установљен је за екстракте  $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$ . Способност инхибиције пероксидације липида, као и способност хватања слободних DPPH радикала екстраката гљиве *C. versicolor* зависиле су првенствено од концентрације селена додате у супстрат. Екстракт  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$  испољио је најјачи степен инхибиторне активности, док су се екстракти  $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 62,5$  и  $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$  издвојили као најбољи хватачи слободних DPPH радикала и при концентрацији од  $2,5\ \text{mg ml}^{-1}$  та способност је износила 92,1 односно 91,7%.

Сви метанолни екстракти изоловани из гљиве *C. versicolor* обогачене селеном испољили су јачу способност редукције јона гвожђа и јачи хелирајући ефекат у односу на контролне екстракте. Регресиона анализа је показала да је антиоксидативни потенцијал, у зависности од врсте екстракта и примењене методе, у корелацији са садржајем укупних фенола и флавоноида, као и са садржајем укупних полисахарида,  $\beta$ -глюкана и селена. Антимикробна својства метанолних екстраката гљива *P. ostreatus* и *C. versicolor* испитивана су применом различитих метода. На основу микродилуционе методе и установљених минималних инхибиторних (MIC) и минималних бактерицидних концентрација (MBC) уочено је да су сви екстракти испољили јаче антибактеријско деловање на Грам позитивне у односу на Грам негативне бактерије. Најосетљивије Грам позитивне бактерије на дејство екстраката су биле *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus epidermidis* и врсте из рода *Bacillus*, док су међу тестираним Грам негативним бактеријама најниже инхибиторне концентрације утврђене за *Shigella sonnei* и *Yersinia enterocolitica*. Најшири спектар антибактеријског дејства је утврђен за екстракт Se<sub>VI</sub>-CLI 62,5 изолован из гљиве *C. versicolor* који је деловао бактерицидно на 15 од 19 тестираних бактерија. Праћењем кинетике раста бактерија мерењем оптичке густине (OD) омогућено је одређивање фазе раста у којој екстракти испољавају дејство. За поменути екстракт (Se<sub>VI</sub>-CLI 62,5) је уочено да је условио изостанак фаза раста ћелија *Salmonella* Enteritidis, док су у присуству контролног екстракта ћелије ушле у експоненцијалну фазу, али је она краће трајала и крајње достигнуте OD вредности су биле ниже у поређењу са ћелијама *S. Enteritidis* раслим у одсуству екстракта. За Se<sub>VI</sub>-CLI 62,5 и контролни екстракт су претходно дефинисане исте минималне инхибиторне концентрације. Применом SEM и TEM техника утврђене су морфолошке и ултраструктурне промене које настају на бактеријама под дејством екстраката гљива. Након дејства метанолних екстраката уочене су издуженије и деформисаније ћелије *Staphylococcus aureus*, а код појединих ћелија су детектоване и промене на ћелијском зиду у виду пукотина. Добијене микрографије указују да је дошло до иреверзибилних оштећења цитоплазматичне мембране и губитка њене пермеабилности. Код ћелија *S. Enteritidis* третираних екстрактима примећено је оштећење ћелиског зида и то претежно у близини септалне регије и на половима. Такође, установљено је да се ћелије под дејством екстраката групишу и да се ћелијски садржај излива у међућелијски простор. Значајно антимикробно дејство екстраката гљива указује да се они могу сматрати потенцијалним агенсом за спречавање раста микроорганизама пореклом из хране.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. Праћењем утицаја различитих једињења са селеном на раст мицелије гљива *P. ostreatus* и *C. versicolor* на лабораторијским хранљивим подлогама утврђено је да су се Se-обогачени зеолити показали као добар извор овог елемента. Додатком Se-обогаченог зеолита садржај селена у плодној телу гљиве *P. ostreatus* је био између 210 – 250  $\mu\text{g g}^{-1}$  што је знатно већа концентрација у поређењу са додатком Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> и Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>. Боља усвојивост овог елемента из Se-обогаченог зеолита доказана је и за гљиву *C. versicolor*. Праћењем утицаја Se<sub>IV</sub>-CLI и Se<sub>VI</sub>-CLI на активност ензима антиоксидативног система заштите у свежеј плодној телу гљиве *P. ostreatus* установљено је да је боља активност свих испитиваних ензима, за око 16 до 61%, детектована додатком ниже концентрације селена (50  $\text{mg kg}^{-1}$ ) у супстрат. Код гљиве *C. versicolor* најјача активност супероксид-дисмутазе и каталазе, ако и најслабија активност глутатио-пероксидазе је утврђена додатком Se<sub>VI</sub>-CLI у концентрацији од 62,5  $\text{mg Se kg}^{-1}$ .

Садржај селена у метанолним екстрактима гљиве *P. ostreatus* се кретао између 8–27  $\mu\text{g g}^{-1}$ , док је знатно већи садржај од 85–120  $\mu\text{g Se g}^{-1}$  утврђен у екстрактима гљиве *C. versicolor*. Хемијском карактеризацијом метанолних екстраката гљиве *P. ostreatus* установљено је да се додатком селена повећао садржај укупних полисахарида (7–13%), укупних глукана и  $\beta$ -глукана (5–16%), као и фенола (5–15%) и флавоноида (6,5–12%) у поређењу са контролном гљивом док је садржај липида и протеина зависео од концентрације додате у супстрат. Код гљиве *C. versicolor* додаток селена условио је повећање садржаја липида (1,5 до 3 пута), протеина (17–127%) и флавоноида (2 до 4,5 пута), док је садржај полисахарида, укупних глукана,  $\beta$ -глукана и фенола зависео од концентрације селена додате у супстрат. На основу тестираних метода показано је да су сви екстракти изоловани из гљиве *P. ostreatus* обогаћене селеном испољили јачи антиоксидативни потенцијал у односу на контролни екстракт. Боља редукциона способност и способност хелирања јона гвожђа утврђена је и за све метанолне екстракте изоловане из гљиве *C. versicolor* обогаћене селеном, док је способност инхибиције пероксидације липида и хватања слободних DPPH радикала зависила од концентрације селена и боља активност је доказана додатком 62,5 mg Se  $\text{kg}^{-1}$ . Испитивањем антимикуробне активности показано је да су екстракти показали јаче дејство на Грам позитивне у поређењу са Грам негативним бактеријама. Најшири спектар антибактеријског дејства уочен је за екстракт Se<sub>VI</sub>-CLI 62,5 изолован из гљиве *C. versicolor* за који је утврђено бактерицидно дејство на већину испитиваних бактерија. SEM и TEM микрографије ћелија *S. aureus* третираних метанолним екстрактима указују да је дошло до иреверзибилних оштећења цитоплазматичне мембране и губитка њене пермеабилности, док се као последица дејства екстраката на ћелије *S. Enteritidis* јавља пуцање ћелијског зида и губитак ћелијског материјала.

**Литература.** У дисертацији је на правилан начин наведено 269 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

### 3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дип. инж. Данке Матијашевић под насловом: „Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикуробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације. Докторска дисертација дип. инж. Данке Матијашевић даје бољи увид у могућност примене гљива одгајених на супстрату са додатком Se(IV)- и Se(VI)-обогаћеног зеолита у терапеутске сврхе. 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. Имајући у виду да су прехранбени производи у појединим деловима Србије дефицитарни у садржају селена, да наша земља располаже великим количинама клиноптилолита, као и да истраживања о могућности гајења гљива на супстрату са додатком Se-обогаћеног зеолита нису до сада вршена, јасно је да добијени резултати имају и велики практични значај. Доказана изузетна антимикуробна и антиоксидативна својства указују на могућност примене гљива обогаћених селеном у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Полазећи од тога да су и у свету, знања о биолошком потенцијалу гљива обогаћених селеном још увек ограничена, ова дисертација доприноси бољем разумевању утицаја селена на антиоксидативна и антимикуробна својства гљива.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Данке Матијашевић, дипл. инж. под насловом: „Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикуробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *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 Милена Пантић, доцент  
Ужа научна област: Технолошка микробиологија  
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Сања Јевтић, доцент  
Ужа научна област: Неорганска хемија  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Др Владимир Павловић, редовни професор  
Ужа научна област: Физика кондензованог стања  
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. Данке Матијашевић у научном часопису на SCI листи

**Matijašević D.**, Pantić M., Rašković B., Pavlović V., Duvnjak D., Sknepnek A., Nikšić M. (2016): The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in Microbiology*, 7:1226, doi: 10.3389/fmicb.2016.01226