

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 461/8-7.3.
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 **ЈОВАНА (Ђуро) ВУНДУК**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: "Хемијска карактеризација и биолошка својства полисахаридних екстраката гљива *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* и *Hericium erinaceus*",

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 07.07.2014. године, својим актом број 61206-2122/2-14, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: "**Хемијска карактеризација и биолошка својства полисахаридних екстраката гљива *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* и *Sparassis crispa***".

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 29.03.2017. године, одлуком Факултета број 461/6-4.3, 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 Анита Клаус, ванредни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Драгица Јаковљевић, научни саветник, Хемија полимера, Универзитет у Београду - Институт за хемију, технологију и металургију,
4. др Маја Козарски, доцент, Биохемија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор, Биотехнологија и биохемијско инжењерство, Универзитет у Београду - Технолошко-металуршки 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: 461/8-7.3.
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 **ЈОВАНА ВУНДУК, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И БИОЛОШКА СВОЈСТВА ПОЛИСАХАРИДНИХ ЕКСТРАКТА ГЉИВА *FOMES FOMENTARIUS*, *AURICULARIA AURICULA-JUDAE* И *SPARASSIS CRISPA*».**

II Универзитет је дана 07.07.2014. године, својим актом број 61206-2122/2-14, дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Petrović, P., Žižak, Ž., Nikšić, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2015). Did the Iceman know better? Screening of the medicinal properties of the Birch Polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms 17: 1113-1125.

**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.

Предмет: Извештај Комисије за оцену урађене докторске дисертације Јоване Вундук, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 461/6-4.3 од 29.03.2017., именовани смо у Комисију за оцену урађене докторске дисертације под насловом: »Хемијска карактеризација и биолошка својства полисахаридних екстраката гљива *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* и *Sparassis crispa*», кандидата Јоване Вундук, дипл. инж. Након што смо детаљно проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Јоване Вундук, написана је на 166 страна текста и укључује 38 табела, 35 слика и 9 графикона. Испред основног текста написан је резиме са кључним речима на српском и енглеском језику. Докторска дисертација садржи осам поглавља, и то: Увод (стр. 1 - 3), Преглед литературе (стр. 4 - 26), Циљеви истраживања (стр. 27 - 28), Материјал и методе (стр. 29 - 43), Резултати и Дискусија (стр. 44 - 136), Закључак (стр. 137 - 145), Литература (стр. 146 - 157) и Прилози (стр. 158 – 166). На крају текста дисертације налази се Биографија кандидата и обавезне изјаве. Поглавља Преглед литературе, Материјал и методе, Резултати и Дискусија садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У уводу је истакнута улога функционалних намирница и гљива као потенцијалних извора биолошки активних компонената у савременој исхрани, прехранбеној и фармацеутској индустрији. Полисахариди су најзначајнија компонента гљива, међутим, поступци њиховог изоловања и утицај структуре на биолошку активност још увек нису довољно истражени.

Преглед литературе. У *Прегледу литературе* који има седам потпоглавља детаљно су обрађени доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу *Медицински значајне гљиве* кандидаткиња дефинише шта се подразумева под појмом »медицински значајне гљиве« и која медицинска својства им се приписују (укупно 126). Такође, дат је преглед народних сазнања везаних за коришћење гљива у медицинске сврхе. У потпоглављима *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* и *Sparassis crispa* дат је опис макро и микро-морфолошких особина наведених гљива, класификација, традиционална сазнања везана за њихово коришћење, као и резултати савремених истраживања везани за хемијску структуру и биолошку активност. У петом потпоглављу *Биолошка активност и биоактивна једињења гљива* дефинисано је значење појма биолошка активност, а полисахариди су истакнути као најзначајнија компонента гљива. Објашњена је структура полисахарида гљива као молекула са највећом структурном варијабилношћу у природи, као и механизам њиховог деловања, тј. модификација биолошког одговора. Такође је дат кратак преглед осталих

биоактивних компонената пореклом из гљива. У потпоглављу *Хемијске модификације екстраката гљива* истакнути су начини на које се врше различите трансформације полисахарида, односно како се то одражава на њихову биолошку активност. Хемијска модификација сирових полисахаридних екстраката је један од начина да се побољшају њихове функционалне особине. У потпоглављу *Гљиве-функционална храна, нутрицеутици, лекови или суплементи у исхрани?* разјашњене су честе недоумице које се јављају у пракси, а везане су за терминологију функционалних компонената хране. Истакнута је и потреба да се прецизира законска регулатива и медицинске гљиве интензивније укључе у прехранбене и фармацеутске токове.

Циљеви истраживања. Циљеви ове дисертације полазе од хипотезе да гљиве испољавају бројне медицинске ефекте, при чему су и нутритивно вредне. Циљ дисертације је изоловање полисахарида одабраних гљива, трансформација добијених полисахарида применом ензима који хидролизују α -D-гликозидну везу, анализа биолошких особина обе групе екстраката, те довођење у везу хемијске структуре, као последице примењених поступака екстракције и ензимске модификације, и биолошких особина полисахарида. Научни циљ докторске дисертације је и дефинисање утицаја α -гљукана на биолошки потенцијал полисахарида гљива.

Материјал и методе. Методе које су коришћене у дисертацији су представљене у пет потпоглавља. У првом потпоглављу *Гљиве коришћене у раду* наведен је испитивани материјал-плодоносна тела гљива *F. fomentarius* (сакупљена на локалитету планине Гоч, република Србија), *A. auricula-judae* и *S. crispa* (од произвођача Lu Yuan Lin, Кина). Идентификација и реидентификација извршена је применом кључа за идентификацију по Breitenbach и Kränzlin-у (1986). У другом потпоглављу *Припрема екстраката* описани су поступци вреле водене и алкалне екстракције, дијализа врелог воденог екстракта и ензимска модификација сукцесивном применом изоамилазе, β -амилазе, α -амилазе и проназе. Треће потпоглавље *Хемијска карактеризација екстраката* обухватало је анализу полисахарида која је извршена одређивањем садржаја укупних угљених хидрата помоћу фенол сумпорне методе по Du Bois и сарадницима (1956), одређивањем садржаја укупних, α - и β -гљукана помоћу Mushroom and Yeast β -гљукан кита K-YBGL (Megazyme Int., Ирска), инфрацрвеном спектроскопијом са Фуријеовом трансформацијом (ВОНЕМ, Hartmann & Braun, Франкфурт, Хемачка), планарном хроматографијом изведеном силазном техником на Whatman No. 1 папиру у систему растварача етил-ацетат-пиридин-вода методом по Chaplin и Kennedy (1987). Укупна фенолна једињења одређена су помоћу Folin-Ciocalteu реагенса методом по Barros и сарадницима (2007), док су укупни протеини измерени модификацијом методе по Bradfordу коју је дао Kruger (2002). У четвртм потпоглављу *Биолошка својства екстраката* испитане су: антимикробна активност помоћу три методе (дифузија са филтер дискова, микродилуциона метода на микротитарским плочама са 96 бунарића по методи Klaus и сарадника (2015) и макродилуционом методом за праћење кинетике раста микроорганизама, у нултом сату, као и након 3, 6, 9 и 24 сата, по методи коју су дали Klaus и сарадници (2015), што је мерено на читачу микротитарских плоча (BioTek, ELx808, USA). Екстракти гљива тестирани су на 14 ATCC сојева (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland), од чега 12 бактерија и 2 квасца. Резултати су изражавани као минимална инхибиторна концентрација и минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација). Антиоксидативна активност је одређена применом пет спектрофотометријских метода (инхибиција липидне пероксидације у систему линолеинске киселине методом по Klaus и сарадницима (2011), способност редукције јона гвожђа по Kozarski и сарадницима (2011), способност хелирања јона гвожђа методом по Dinis-у и сарадницима (1994), способност редукције јона бакра методом по Öztürk-у и сарадницима (2011) и способност хватања слободних DPPH радикала по методи коју су дали Kozarski и сарадници (2011). Резултати су читавани на

UV/VIS спектрофотометру (Shimadzu UV-1800, Јапан). Способност инхибиције I-ангиотензин конвертујућег ензима је урађена по модификованој методи коју су дали Cushman и Cheung (1971). Резултати су добијени мерењем апсорбанце преостале хипуринске киселине помоћу UV/VIS спектрофотометра (Shimadzu UV-1800, Јапан) и цитотоксична својства која су испитана МТТ тестом по Mosmann-у (1983) и Ohno и Abe-у (1991) на четири туморске ћелијске линије (хумане ћелије рака грлића материце, тј. HeLa ћелије, ћелије карцинома дојке MDA-MB-453, фибробласти плућа MRC-5 и ћелије мијелоидне леукемије K562). У петом потпоглављу *Статистичка обрада резултата* је наведено да је обрада резултата извршена применом рачунарског софтвера STATSOFT10 уз примену анализе варијансе (ANOVA) и Tukey HSD теста на нивоу значајности $p < 0.05$. Корелација између променљивих одређена је помоћу Pearson Correlation Coefficient Calculator-a.

Резултати и Дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру једанаест потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике и прегледне табеле који илуструју истраживања, а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења. У првом потпоглављу *Идентификација гљива* описан је поступак идентификације врста коришћених у овом раду, а који је обухватао одређивање микроскопских карактеристика утврђених микроскопирањем (Olympus Cx21, USA) као и макроскопских особина описаних у кључу по Breitenbach и Kränzlin-у (1986). У потпоглављу *Принос екстраката гљива* разматран је утицај примењеног начина екстракције као и ензимских модификација. Утврђено је да принос зависи од начина екстракције, те да је алкална екстракција имала за резултат највећи принос код гљива *F. fomentarius* и *A. auricula-judae*. Код гљиве *S. crispa* највећи принос постигнут је врелом воденом екстракцијом. Ензимским модификацијама додатно је редукован принос екстраката што је била последица раскидања α -D-гликозидних веза, а смањење је било најизраженије код модификованих алкалних екстраката. Дијализовани водени екстракти су имали најмањи губитак масе након модификације, јер су поступком дијализе већ уклоњени молекули малих молекулских маса. У трећем потпоглављу *Полисахаридне компоненте екстраката гљива* утврђено је да се принос полисахарида кретао од 40 до 97%, што је зависило од врсте гљиве и поступка екстракције. Сирови водени и делимично пречишћени екстракти садржали су више укупних полисахарида од оних који су добијени алкалном екстракцијом. Значајна количина полисахарида уклоњена је дијализом и алкохолном преципитацијом, 57% код *F. fomentarius* и 85% код *A. auricula-judae*. Ензимски третман довео је до додатног смањења садржаја укупних полисахарида, нарочито код алкалних екстраката, и то *F. fomentarius* (90%) и *A. auricula-judae* (93%), као и воденог екстракта гљиве *S. crispa* (96%). Осим садржаја укупних полисахарида у трећем потпоглављу се наводи и количина укупних глукана у узорцима. Делимично пречишћени водени екстракти садржали су највише укупних глукана, док их је у врелим воденим екстрактима било више него у алкалним. Изузетак су били екстракти гљиве *S. crispa* код које је услед ензимске модификације садржај укупних глукана повећан у односу на сирове екстракте. Сирови алкални екстракти садржали су више α -глукана од врелих водених екстраката, мада то није био случај код гљиве *A. auricula-judae*. Ензимски третирани узорци имали су значајно мању количину α -глукана, што је била последица активности ензима који хидролизују α -D-гликозидну везу. Највише β -глукана измерено је у дијализованим екстрактима, а сирови водени екстракти били су богатији овом компонентом од силових алкалних екстраката. Ензимском модификацијом садржај β -глукана је снижен у воденом и делимично пречишћеном екстракту, а код алкалног екстракта дошло је до концентрисања. У потпоглављу *Садржај укупних фенолних једињења у екстрактима гљива* изнето је да се примењеним поступцима екстракције и модификације помоћу ензима не могу потпуно уклонити фенолна једињења, чији је садржај ишао до 22%. Највише фенолних једињења

издвојено је врелом воденом екстракцијом, док је ензимска модификација довела до значајног смањења ове компоненте. Екстракти гљиве *S. crispa* нису садржали фенолна једињења. У петом потпоглављу *Садржај протеина у екстрактима гљива* утврђено је да су узорци садржали од 0.13 до 9.60% протеина. *F. fomentarius* имао је највећи удео протеина, док су друге две гљиве садржале око 1%. Највише протеина измерено је у сировим алкалним екстрактима, осим код гљиве *S. crispa*. Додатак проназе током ензимског третмана одразио се на смањење садржаја протеина у модификованим узорцима. У шестом потпоглављу *FT-IR спектроскопија екстраката гљива* потврђено је да је ензимска модификација успешно изведена. Екстракти су показали спектре типичне за гљиве. Са спектра се могло уочити да је у свим узорцима дошло до депротеинизације, али и до повећања интензитета трака у шећерном региону ($1200-800\text{ cm}^{-1}$). Анализа моносахаридног састава полисахаридних екстраката дата је у седмом потпоглављу *Планарна хроматографија киселинског хидролизата полисахаридних екстраката*. Глукоза је била доминантан полисахарид у свим узорцима, док су у узорцима *F. fomentarius* у мањим количинама били присутни маноза и фукоза, у узорцима *A. auricula-judae* галактоза, маноза, ксилоза и галактуронска киселина, а код *S. crispa* маноза и галактоза. У потпоглављу *Антимикробна активност гљива* приказани су резултати диск дифузионе методе, микро и макродилуционе методе. Екстракти све три испитиване гљиве показали су антимикробну активност у диск дифузионој методи, мада у слабијој мери од комерцијалног антибиотика. Микробицидно дејство није забележено, а модификовани екстракти показивали су мање зоне инхибиције од сирових екстраката. Јаче антимикробно деловање у овој методи примећено је код узорака са већим садржајем α -глюкана. *Yersinia enterocolitica* била је најосетљивија према алкалним екстрактима *F. fomentarius* (17,5 mm), као и *Staphylococcus aureus* са зоном инхибиције од 17,0 mm. Модификовани екстракти *F. fomentarius* били су ефикаснији према Грам негативним бактеријама, а најосетљивија је била *Y. enterocolitica* са зоном инхибиције 11,0 mm у присуству модификованог воденог екстракта. Алкални екстракт *A. auricula-judae* најинтензивније је инхибирао раст *Pseudomonas aeruginosa*, а зона инхибиције износила је 15,8 mm. Модификовани екстракти ове гљиве инхибирали су раст Грам позитивних бактерија, док је деловање било најизраженије на бактерију *Escherichia coli* (7,6 mm). Антимикробно дејство *A. auricula-judae* праћено диск дифузионом методом није забележено на сојева *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus hauseri*, *Y. enterocolitica* и *E. coli* O157:H7. Сирови алкални екстракт *S. crispa* имао је снажно антимикробно дејство према *S. enteritidis* (18,1 mm), док код сојева *P. hauseri* и *Shigella sonnei* није дошло до инхибиције раста. Модификовани екстракти гљиве *S. crispa* нису били делотворни према многим тестираним сојевима, а најснажнији ефекат примећен је код модификованог алкалног екстракта према *S. enteritidis* (12,7 mm). Ни један од узорака није инхибирао раст квасаца. Екстракти све три врсте гљива показали су антимикробно дејство при врло ниским концентрацијама у макродилуционој методи, док су многи испољили и бактерицидно деловање. Фунгистатичко дејство није забележено. Сирови алкални екстракти најефикасније су инхибирали раст бактерија док су модификовани узорци били значајно слабији, у појединим случајевима и више од 200 пута. Водени и алкални екстракт *F. fomentarius* деловали су микробицидно на *L. monocytogenes* при врло ниској концентрацији (0,039 mg/ml), а водени екстракт деловао је и микробицидно према истој бактерији при концентрацији 1,25 mg/ml. Изражено антимикробно деловање екстракти *F. fomentarius* показали су и према *Enterococcus faecalis*, *P. hauseri* и *Y. enterocolitica*, а MIC вредности биле су у распону од 0,312 до 0,625 mg/ml. Најслабији ефекат екстракти су испољили на *E. coli* и *E. coli* O157:H7. Модификовани екстракти у мањој мери су инхибирали раст бактерија, а најефикаснији су били модификовани алкални и водени екстракт према *S. aureus* (MIC = 5,0 mg/ml). Сирови полисахаридни екстракти *A. auricula-judae* имали су израженије антимикробно дејство, праћено макродилуционом методом, од модификованих, како према Грам позитивним тако и према Грам негативним бактеријама.

Од свих тестираних бактеријских сојева *E. faecalis* је био најосетљивији (MIC = 0,039 mg/ml, MBC = 1,25 mg/ml). Раст *S. sonnei* је инхибиран у распону концентрација 0,625 до 1,25 mg/ml. Модификовани алкални екстракт *A. auricula-judae* најјаче је деловао на *Bacillus cereus* и *Pseudomonas aeruginosa* (5,0 mg/ml), док је модификовани водени екстракт инхибирао *E. faecalis* при истој концентрацији. Ензимским третманом дијализованог екстракта антимикуробна активност је смањена 256 пута. Сирови полисахаридни екстракти *S. crispa* ефикасније су инхибирали раст бактерија од модификованих, за које се MIC кретао од 5-40 mg/ml. Најнижу MIC остварили су водени и алкални екстракт при инкубацији са *E. faecalis* (0,156 mg/ml) и *B. cereus* (0,156 mg/ml водени и 0,039 mg/ml алкални екстракт). Макродилуциони поступак потврдио је резултате микродилуционе методе. Такође, ни у овој методи није примећено да неки од екстраката показује антифунгално дејство. Уколико је постојало антимикуробно/микробицидно деловање на вегетативне форме јављало се у првих 6-9 сати. Код спорогених бактерија раст је био успорен током првих 12 сати након чега се неометано настављао. Сирови екстракти су били ефикаснији од модификованих чије се дејство, уколико је постојало, јављало током првих 6 сати инкубирања. У овој методи сирови алкални екстракт *F. fomentarius* био је најефикаснији према *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* и *P. hauseri*, према којима је испољио микробицидно дејство, што је утврђено и микродилуционом методом. Динамика раста *Geobacillus stearothermophilus*, *E. coli*, *S. sonnei*, *Y. enterocolitica* и *E. coli* O157:H7 није била значајније измењена када су инкубирани са екстрактима *F. fomentarius*. Сирови водени и алкални екстракти *A. auricula-judae* утицали су на постепено смањење популациј *E. faecalis*, док су на *S. aureus* деловали бактериостатички. Сирови алкални екстракт *S. crispa* инхибирао је раст спорогених бактерија *G. stearothermophilus* и *B. cereus*. Модификовани екстракти ове гљиве нису значјно утицали на кинетику раста испитиваних микроорганизама. Запажени резултати указују на антимикуробни потенцијал силових полисахаридних екстраката гљива *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* и *S. crispa*. Они могу представљати алтернативу комерцијалним антибиотицима или се могу додавати храни да би се спречио развој патогена, без примене средстава која испољавају нежељне ефекте. У потпоглављу *Антиоксидативна активност екстраката гљива* разматрана је антиоксидативна способност екстраката применом пет метода. Немодификовани узрци свих гљива, осим *S. crispa*, имали су израженију способност хватања слободних DPPH радикала, а зависност између ефекта и концентрације била је логаритамска. Најефикаснијим су се показали екстракти *F. fomentarius*, чија је EC₅₀ вредност била више од 10 пута нижа него у случају катехина који је коришћен као стандард. Утврђено је да је најјача корелација између садржаја фенолних једињења и способности хватања слободних DPPH радикала, тј. да начин екстракције утиче на ову способност. Сирови полисахаридни екстракти све три гљиве били су ефикасни инхибитори липидне пероксидације при нижим концентрацијама (0,025 mg/ml), док је дејство при вишим концентрацијама било прооксидативно. Код екстраката *F. fomentarius* садржај фенолних једињења и β-глюкана највише је утицао на антиоксидативну способност праћену конјуген диенском методом. Како количина α-глюкана није била пресудна у овој методи, модификовани екстракти нису били значајно слабији од силових екстраката. То није био случај са гљивом *A. auricula-judae*, код које је утврђена снажна корелација инхибиције липидне пероксидације и садржаја α-глюкана и фенолних једињења. Нешто другачије резултате показали су екстракти *S. crispa* код које је јаче антиоксидативно дејство имао модификовани алкални екстракт. Примећено је да способност инхибиције липидне пероксидације потиче од синергистичког дејства компонената екстраката, као и да се губитком једне од њих ефекат несразмерно смањује. При тестирању способности редукције јона гвожђа ензимски третирани узорци показали су се значајно слабијим, а ефекат је генерално растао са порастом концентрације. Само је код гљиве *F. fomentarius* било могуће одредити EC₅₀ вредности, те установити корелацију. Тако је утврђено да је садржај фенолних једињења најзначајнији за способност екстраката

да редукују јоне гвожђа. Сви екстракти показали су релативно слабу способност хелирања јона гвожђа, а пораст концентрације условио је логаритамску промену активности код сирових полисахаридних екстраката. Код модификованих екстраката зависност способности хелирања јона гвожђа и концентрације мењала се линеарно. Најизраженију способност хелирања јона гвожђа испољили су алкални екстракти *F. fomentarius* и *A. auricula-judae*. Ипак, EC_{50} вредности нису установљене при тестираним концентрацијама. Садржај α - и β -глюкана једнако је утицао на способност хелирања јона гвожђа од стране екстраката *S. crispa*. Способност редукције јона бакра била је слабо изражена осим у случају екстраката из гљиве *F. fomentarius*, чији су сирови екстракти при максималној концентрацији испољили исти интензитет ефекта као и стандарди ВНТ и α -токоферол. Праћена способност била је значајно умањена код ензимски третираних екстраката. Корелација је одређена само код гљиве *F. fomentarius* док код друге две није било могуће одредити EC_{50} вредности. Садржај протеина и α -глюкана показао се као најзначајнији за ову антиоксидативну способност. У десетом потпоглављу *Способност инхибиције I-ангиотензин конвертујућег ензима* испитивана је способност екстраката да инхибиторно делују на ангиотензин I-конвертујући ензим (ACE), а показало се да сви узорци поседују ову способност, иако у значајно мањој мери у односу на комерцијални препарат. Врела водена екстракција негативно се одразила на ову способност, те су сирови алкални екстракти били најефикаснији. Садржај протеина највише је утицао на способност инхибиције ACE од стране екстраката *F. fomentarius*, док је код друге две гљиве најзначајнија била количина α - и β -глюкана. Применом ензимског третмана способност екстраката да инхибирају ACE се смањила. У једанаестом потпоглављу *Антитуморна својства екстраката* дискутовани су резултати цитотоксичности екстраката на 3 туморске ћелијске линије. Сви екстракти су деловали цитотоксично при чему су сирови полисахаридни екстракти (осим код гљиве *S. crispa*) били ефикаснији у спречавању пролиферације туморских ћелија у *in vitro* условима. Потврђени су и литературни наводи да се са повећањем растворљивости екстраката у води повећава и њихово цитотоксично деловање. Садржај фенолних једињења и α -глюкана био је најзначајнији за ову активност.

У поглављу **Закључак** кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. Хемијска карактеризација показала је да поступак екстракције значајно утиче на садржај појединих компонената, те да је највећи принос екстраката остварен врелом алкалном екстракцијом, док је ензимска модификација имала за резултат смањење приноса. Доминантна компонента екстраката били су угљени хидрати, чији се садржај кретао од 40 до 96%, а протеини и фенолна једињења били су присутни у знатно мањој мери. Највиши садржај фенолних једињења измерен је у екстрактима гљиве *F. fomentarius* (22%), док их екстракти из *S. crispa* нису садржали. Утврђено је да је остварен циљ ензимске модификације, односно, да су из узорака у значајној количини уклоњени α -глюкани. Најзаступљенији моносахарид у свим екстрактима била је глукоза. Сви екстракти испољили су антимикробно дејство у мањој или већој мери, мада ни један није показао антифунгално дејство. Резултати диск дифузионе методе нису били у сагласности са резултатима микро и макродилуционе методе, што је и очекивано имајући у виду релативно слабу растворљивост екстраката. Сирови полисахаридни екстракти све три гљиве били су ефикасни при врло ниским концентрацијама према бактеријама *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *P. hauseri* и *Y. enterocolitica*, *S. sonnei* и *B. cereus*, у распону од 0,039-0,625 mg/ml). Модификовани екстракти имали су значајно слабије антимикробно дејство, у неким случајевима и више од 200 пута. Није уочено селективно дејство само према Грам позитивним бактеријама или само према Грам негативним. Праћење динамике раста бактерија у присуству екстраката показало је да се антимикробно дејство испољава махом у периоду између 6 и 9 сата, тј. током експоненцијалне фазе раста. Код спорогених бактерија екстракти су деловали само у почетку, тачније док се бактерије не прилагоде

неповољним условима. Сирови полисахаридни екстракти имали су израженију способност хватања слободних DPPH радикала, док је способност инхибиције липидне пероксидације била скоро иста за обе групе екстраката. Уочено је да екстракти при вишим концентрацијама делују прооксидативно. Обе активности у великој мери су зависиле од садржаја фенолних једињења. Само је код гљиве *S. crispa* ензимски третман резултирао интензивирањем способности инхибиције липидне пероксидације. Способност екстраката да редукују јоне гвожђа била је најизраженија код екстраката *F. fomentarius*, захваљујући високом садржају фенолних једињења. Сви екстракти показали су се као слаби хелатори јона гвожђа, а имали су и слабу способност редукције јона бакра. Осим код гљиве *F. fomentarius*, није установљена корелација ове способности са неком од компонената екстраката. Сви екстракти су се показали као добри инхибитори АСЕ, премда слабији од комерцијалног препарата. Установљено је да се ова способност смањује након ензимског третмана. Негативан ефекат губитка α -глюкана примећен је и при анализи цитотоксичности екстраката, која је била релативно изражена када су туморске ћелије инкубирани са сировим полисахаридним екстрактима све три гљиве. На основу резултата биолошких активности утврђено је да постоји веза између различитих биолошких ефеката и садржаја α -глюкана у екстрактима медицинских гљива. Показано је и да изабране гљиве представљају добар извор компонената које испољавају антимикуробно, антиоксидативно, цитотоксично дејство и способност инхибиције АСЕ, те да се могу користити као функционални додатак човековој исхрани.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 119 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дип. инж. Јоване Вундук под насловом: „Хемијска карактеризација и биолошка својства полисахаридних екстраката гљива *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judaei* и *Sparassis crispa*“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације.

Докторска дисертација дип. инж. Јоване Вундук даје значајан допринос бољем разумевању хемијске структуре и њеног утицаја на биолошке особине медицинских гљива. Кандидаткиња је у експерименталном делу истраживања успешно применила више различитих актуелних метода које су јој омогућиле добијање релевантних резултата које је правилно тумачила и коментарисала у складу са расположивим литературним подацима.

Закључци су добро формулисани и правилно изведени и у потпуности произилазе из добијених резултата. Дисертација представља оригиналан научни рад, актуелан и значајан, с обзиром да истраживања у Србији, везана за хемијске модификације и њихов утицај на биолошке особине екстраката гљива нису до сада вршена. Резултати хемијске карактеризације и евалуација биолошких особина полисахаридних екстраката дају добру основу за разумевање утицаја структуре на активност полисахарида гљива, и пружају увид у могућност њихове примене, као и могућност корекција биолошких особина применом одговарајућих хемијских алата.

Полазећи од тога да се биолошка активност полисахарида гљива приписивала углавном садржају и структури β -глюкана, знања о утицају хемијске структуре тиме су проширена,

чиме је омогућено боље разумевање биолошких особина гљива, те пружен увид у могућности трансформације полисахарида како би се учинили биолошки ефикаснијим.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Јоване Вундук, дипл. инж. под насловом: „Хемијска карактеризација и биолошка својства полисахаридних екстраката гљива *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judaei* *Sparassis crispa*“ 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 Анита Клаус, ванредни професор
Ужа научна област: Технолошка микробиологија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Драгица Јаковљевић, научни саветник
Ужа научна област: Хемија полимера
Институт за хемију, технологију и металургију,
Универзитет у Београду

Др Маја Козарски, доцент
Ужа научна област: Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Др Сузана Димитријевић-Бранковић, редовни професор
Ужа научна област: Биотехнологија и биохемијско инжењерство
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Јоване Вундук у научном часопису на SCI листи.

Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Petrović, P., Žižak, Ž., Nikšić, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2015). Did the Iceman know better? Screening of the medicinal properties of the Birch Polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17: 1113-1125.