

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Број захтева: 32/12-8.2.

Датум: 27.11.2019.

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. ст. 5. тач. 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о усвајању извештаја Комисије за оцену докторске дисертације:

Кандидат **АЛЕКСАНДРА (Стеван) СКНЕПНЕК**, студент докторских студија на студијском програму Прехрамбена технологија, пријавила је докторску дисертацију под називом: „Ферментација чајне гљиве, комбухе, на декоктима одабраних врста медицинских гљива“

из научне области Прехрамбена технологија.

Универзитет је дана 11.04.2013. године, својим актом 02 Број: 61206-791/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: **«КАРАКТЕРИСТИКЕ ЧАЈНЕ ГЉИВЕ - КОМБУХЕ, ФЕРМЕНТИСАНЕ У ПРИСУСТВУ ЕКСТРАКТА ОДАБРАНИХ ВРСТА МЕДИЦИНСКИХ ГЉИВА».**

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 25.09.2019. године, одлуком Факултета број 32/10-8.2. 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 Виктор Недовић, редовни професор, Биохемија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
3. др Предраг Вукосављевић, редовни професор, Наука о конзервисању, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Анита Клаус, ванредни професор, Технолошка микробиологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
5. др Сениша Марков, редовни професор, Биотехнологија, Универзитет у Новом Саду - Технолошки факултет,

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 27.11.2019. године.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Душан Живковић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 32/12-8.2.
Датум: 27.11.2019. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 44. Статута Пољопривредног факултета, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 27.11.2019. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **АЛЕКСАНДРА СКНЕПНЕК, дипл. инж.** и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: **«КАРАКТЕРИСТИКЕ ЧАЈНЕ ГЉИВЕ - КОМБУХЕ, ФЕРМЕНТИСАНЕ У ПРИСУСТВУ ЕКСТРАКТА ОДАБРАНИХ МЕДИЦИНСКИХ ГЉИВА».**

II Универзитет је дана 11.04.2013. године, актом 02 број: 61206-791/2-13 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у научном часопису који га квалификује за одбрану докторске дисертације:

Sknepnek, A., Pantić, M., Matijašević, D., Miletić, D., Lević, S., Nedović, V., Niksić, M. (2018); Novel Kombucha Beverage from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*, with Antibacterial and Antioxidant effects. International Journal of Medicinal Mushrooms, 20(3): 243-258, doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025833

**ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
ДЕКАН**

(Проф. др Душан Живковић)

Доставити: кандидату, ментору, Институту за прехранбену технологију и биохемију, Студентској служби и архиви.

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ
ПОЉОПРИВРЕДНОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**
Датум: 26.09.2019.

Предмет: Извештај Комисије о оцени урађене докторске дисертације Александре С. Скнепнек, дипл. инж.

Одлуком Наставно-научног већа факултета број 32/10-8.2. од 25.09.2019. године, именовани смо у Комисију за оцену и одбрану докторске дисертације под насловом: „Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстракта одабраних врста медицинских гљива“ кандидата Александре Скнепнек дипл. инж., и пошто смо проучили урађену докторску дисертацију, подносимо следећи

ИЗВЕШТАЈ

1. ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација дипл. инж. Александре Скнепнек написана је на 197 страна текста и укључује 20 табела, 36 графика и 12 слика. Испред основног текста налази се резиме са кључним речима, на српском и енглеском језику, листа скраћеница и приказ садржаја. Докторска дисертација садржи осам поглавља, и то: Увод (стр. 1-3), Преглед литературе (стр. 4-48), Циљеви рада (стр. 49-51), Материјал и методе (стр. 52-72), Резултати и Дискусија (стр. 73-150), Закључак (стр. 151-158), Литература (стр. 159-182), Прилог (стр. 183-197). После главног текста приказана је Биографија кандидата и обавезне изјаве. Поглавља Преглед литературе, Циљеви рада, Материјал и методе, Резултати и Дискусија и Прилог садрже више потпоглавља.

2. ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Увод. У Уводу је истакнут значај гљива, са освртом на примену медицинских гљива у производњи функционалне хране и нутрацеутика. Такође је истакнут проблем повезаности квалитета живота са начином исхране, као што је примена синтетичких прехранбених адитива који могу бити токсични за људе. Из тог разлога је у порасту испитивање могућности примене природних адитива, а међу њима и гљива и њихових екстракта. Могућност примене медицинских гљива у производњи комбуха напитака до сада није испитана, као ни потенцијална функционална својства оваквих производа.

Преглед литературе. У Прегледу литературе који има два потпоглавља обрађени су доступни литературни подаци из области која је предмет проучавања дисертације. У првом потпоглављу Медицинске гљиве кандидаткиња описује биоактивне компоненте пореклом из гљива, са посебним акцентом на полисахариде, фенолне компоненте, флавоноиде, протеине и пептиде. Истакнуте су карактеристике, распрострањеност и медицински значај одабраних врста гљива: *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и *Coriolus versicolor*. Истакнуте су до данас познате и описане биолошки активне компоненте одабраних гљива. У делу који се тиче биолошке

активности медицинских гљива описано је њихово антимикубно, антиоксидативно и имуномодулаторно дејство. Истакнуто је да је испитивање антимикубне активности гљива постало значајно након открића пеницилина, као и проблем неадекватне примене постојећих антибиотика, која доводи до све учесталије појаве бактеријске резистенције. Описана су једињења из гљива са антибактеријским, антифунгалним и антивирусним својствима, као и механизам њиховог дејства. У делу о антиоксидативној активности истакнут је значај одржавања баланса између продукције слободних радикала у организму и одбране од њих, услед тога што прекомерна продукција слободних радикала доводи до појаве оксидативног стреса разарајући ћелијске липиде, протеине и ДНК молекуле. Истакнут је и њихов негативан утицај на квалитет и безбедност хране услед формирања потенцијално токсичних једињења. Примена природних конзерванаса у храни се све више испитује, како би се заменили потенцијално токсични синтетички антиоксиданси. Након што је утврђено да метаболити гљива такође неутралишу слободне радикале, испитује се и њихов потенцијал коришћења као антиоксиданса. У делу о имуномодулаторној активности истакнуте су најзначајније компоненте гљива које је поседују, као и механизам имуномодулаторног дејства полисахарида. Дат је и преглед производа од гљива *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и *Coriolus versicolor* која поседују утицај на имуни систем, а која се могу наћи на тржишту. Истакнут је значај гљива у производњи нутрацеутика и функционалне хране и описани су производи на бази медицинских гљива који су развијени у последњих двадесет година, а који испољавају функционална својства. У другом потпоглављу Комбуха дати су основни подаци о симбиотској култури бактерија сирћетног врења и квасаца, као и објашњење које се тиче имена и порекла комбухе. Описан је аеробни и анаеробни метаболизам дисахарида квасаца и дат је детаљан преглед врста квасаца који се јављају током комбуха ферментације. Описана је таксономска класификација бактерија сирћетног врења, карактеристике и биодиверзитет најчешћих родова који се јављају током ферментација. Указано је на најчешћу примену и штетност бактерија сирћетног врења, као и на начин настанка целулозне навлаке, која представља споредни производ током комбуха ферментација, а која значајну примену може наћи у другим областима. У делу описа процеса ферментације комбухе указано је на начин припреме подлоге за ферментацију, начина инокулације, услова ферментације, а описани су и најзначајнији метаболити, начин њиховог настанка током процеса и утицај различитих једињења на крајњи укус и арому напитка. Посебно су истакнута функционална својства комбуха напитка, са освртом на антимикубно, антиоксидативно и антитуморно дејство.

Циљеви рада. Циљеви ове докторске дисертације полазе од хипотезе да се гљиве могу употребити као једини извор азота у подлози за ферментацију комбухе, и да се применом вреле водене екстракције гљива биолошки активне компоненте могу пренети у крајњи производ, односно комбуху. Циљ дисертације је да се утврде физичко-хемијске и микробиолошке промене које се одвијају током ферментације комбухе на подлогама од медицинских гљива. Такође је у крајњим производима испитан садржај биоактивних компонената и функционална својства испитивањем антибактеријске, антиоксидативне и имуномодулаторне активности. У посебном потпоглављу, циљеви су шематски приказани.

Материјал и методе. Методе које су коришћене у дисертацији су представљене у девет потпоглавља. У првом потпоглављу Изолација бактерија сирћетног врења и квасаца из комбухе описан је начин одржавања радне комбуха културе која потиче из колекције Катедре за Технолошку микробиологију, Пољопривредног факултета,

Универзитета у Београду. Приказан је поступак изолације бактерија сирћетног врења и квасаца из ферментационе течности комбухе и начин чувања изолата. У другом потпоглављу Идентификација изолата извршена је биохемијска идентификација изолата квасаца API AUX 20 С тестовима (bioMérieux, Француска) и применом Витек 2 система (bioMérieux, Француска). Као додатни тестови у биохемијској идентификацији коришћени су тест формирања псеудохифа или хифа и тест коришћења Д-ксилозе као јединог извора угљеника. Током молекуларне идентификације изолата извршена је изолација укупне ДНК из квасаца и бактерија сирћетног врења, након чега се приступило умножавању ДНК фрагмената ланчаном реакцијом полимеразе (PCR). Код изолата квасаца уможен је варијабилни регион Д1/Д2 гена за 26S rRNA коришћењем универзалних прајмера за тај регион: НЛ1 и НЛ4. Код изолата бактерија сирћетног врења умножен је варијабилни регион региона гена за 16S rRNA применом специфичних прајмера. Визуелизација продуката ланчане реакције полимеразе бактерија и квасаца је извршена хоризонталном електрофорезом у 1% агарозном гелу, а гел је фотографисан помоћу УВ трансилуминатора (Nippon Genetics Europe GmbH) након чега се приступило пречишћавању продуката применом кита за пречишћавање PCR продуката (FastGene Gel/PCR Extraction Kit, Nippon Genetics Europe GmbH). Секвенцирање узорака је урађено у центру за секвенцирање Microgen sequencing service у Холандији, а анализа секвенци је извршена у програму BLAST, коришћењем NCBI базе података. У трећем потпоглављу Припрема гљива коришћених за производњу комбуха напитака описана је припрема плодноносних тела гљиве *Ganoderma lucidum* која су комерцијални производ произвођача „Alphay Co” (Нантонг, Кина). Мицелијум гљиве *Lentinus edodes* сој М 3776 потиче од произвођача „Mycelia” из Белгије, док мицелијум гљиве *Coriolus versicolor* потиче из колекције култура Катедре за Технолошку микробиологију, Пољопривредног факултета, Универзитета у Београду. Мицелијуми гљива *Lentinus edodes* и *Coriolus versicolor* коришћени су за производњу плодноносних тела на чврстом супстрату, која су касније употребљена за припрему ферментационе подлоге. У потпоглављу четири Припрема подлоге за ферментацију и услови ферментације комбуха од медицинских гљива описан је поступак припреме врелих водених екстраката од плодноносних тела одабраних врста медицинских гљива и услови ферментације комбуха културом. У потпоглављу пет Физичко-хемијске и микробиолошк промене током комбуха од медицинских гљива током једанаест дана праћена је промена укупног броја квасаца на Сладном агару и бактерија сирћетног врења, на YPM агару уз додатак неопходних антибиотика. Промене рН вредности током ферментације праћене су помоћу електричног рН метра (Basic 20, Crison, Шпанија), док је титрабилна киселост одређена титрацијом коришћењем 0,1 М NaOH и фтенолфталеина као индикатора. Утврђен је и квантитативни садржај сахарозе, глукозе, фруктозе и етанола применом течне хроматографије високих перформанси (HPLC) коришћењем система Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) који је садржао колону за угљене хидрате (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca²⁺, 300 mm × 7.7 mm, 8 μm) и RI детектор (RefractoMax 520, ERC, Riemerling, Немачка). У потпоглављу шест Квалитативна и квантитативна хемијска анализа готових производа комбуха од медицинских гљива описан је поступак припреме узорака за анализу и поступак одређивања суве материје гравиметријским сушењем. Код напитака упарених под вакуумом применом упаривача под сниженим притиском (R-II rotovaporу Buchi, Швајцарска) и полисахаридних екстраката извршена је анализа структурних карактеристика применом инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (ATR-FTIR, Shimadzu, Јапан). Садржај укупних полисахарида одређен је применом методе са фенол-сумпором, док је садржај укупних глукана одређен применом ензимског кита Mushroom and Yeast β-glukan Assay

Procedure K-YBGL (Megazyme Int. Wicklow, Ирска). Садржај укупних фенолних једињења одређен је помоћу Folin-Ciocalteu реагенса и галне киселине као стандарда, док су укупни флавоноиди утврђени према методи Oh и сарадника (2013). У седмом потпоглављу Биолошка својства комбуха напитака од медицинских гљива одређена је антиоксидативна, антибактеријска, цитотоксична и имуномодулаторна активност. Антиоксидативна својства течних и вакуум упарених комбуха узорака од гљива *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* и *Coriolus versicolor* у *in-vitro* условима утврђена су применом различитих метода. Испитана је способност хватања слободних 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала према методи Jayabalan и сарадника (2008a), редукциона способност према методи Oh и сарадника (2013), способност хелирања јона гвожђа према методи Oh и сарадника (2013) и инхибиција липидне пероксидације према методи Козарски и сарадника (2011). Антибактеријска активност комбуха напитака испитана је у тренутку када је достигнута комнзумна киселост. Испитана је активност течног узорка, као и узорка упареног под вакуумом. Такође је испитана антибактеријска активност сирћетне киселине, комбуха узорка који је неутрализован и узорак који је денатурисан применом високе температуре. Антибактеријска активност је испитана на девет Грам-негативних и седам Грам-позитивних бактеријских сојева. Сви коришћени микроорганизми пореклом су из америчке колекције типских култура, ATCC (American Type Culture Collection). Примењен је дифузиони тест са бунарићима где је након уношења узорака у бунариће и инкубације, мерен пречник зоне инхибиције раста бактерија. Минималне инхибиторне и бактерицидне концентрације испитане су применом микродилуционе методе у 96-ћелијским микротитар плочама. Као индикатори респираторне активности бактерија коришћене су боје 2,3,5-трифенилтетразолијум хлорид или ресазурин (Sigma Chemical Co.). За испитивање цитотоксичне и имуномодулаторне активности припремљени су полисахаридни екстракти комбуха напитака. Након изолације моноклеарних ћелија периферне крви (PBMC) здравих добровољаца, концентроване ћелије елемената периферне крви су раздвојене на основу разлика у густини применом медијума за градијент густине (Lymphoprep, RAA, Nycomed, Осло, Норвешка). Цитотоксичност полисахаридних екстраката комбуха од гљива, у култури хуманих периферних крвних моноклеарних ћелија, је одређена у плочи са 96 бунарића мерењем метаболичке активности применом МТТ теста додатком 3-[4,5 диметил-тиазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразолијум хлорида (MTT, Sigma). Интезитет боје је прочитан на 570/650 nm (Bahringer ELISA Processor II, Heidelberg, Немачка). Мерење концентрације цитокина обављено је култивисањем култура PBMC у плочи са 96 бунарића у присуству комбуха екстраката и фитохемаглутина (PHA) или само PHA. Концентрације цитокина одређене су применом проточне цитометрије (BD LSR II) помоћу флуоресцентних куглица (BioLegend, San Diego, USA), на основу конструисане стандардне криве. У потпоглављу осам Сензорна анализа комбуха производа од медицинских гљива извршена је применом методе која у оцењивању користи хедонску скалу. Оцењени су неароматизовани и ароматизовани узорци комбуха од медицинских гљива, а у оцењивању је учествовало седамнаест оцењивача лаика. У потпоглављу девет Статистичка анализа урађена је применом Origin Pro 9.0. софтвера. Подаци су подвргнути једнофакторијалној анализи варијансе, док је статистичка значајност утврђена коришћењем Tukey-евог HSD теста. Примењена је линеарна регресиона анализа за утврђивање ефективне и инхибиторне концентрације, као и за утврђивање корелације између променљивих од значаја.

Резултати и Дискусија. Резултати истраживања обрађени су у оквиру пет потпоглавља и приказани су уз текстуална тумачења, слике, прегледне табеле и

графиконе који илуструју истраживања, а добијени резултати су дискутовани уз концизна тумачења. У првом потпоглављу Идентификација микроорганизама из комбухе извршена је биохемијска и молекуларна идентификација девет изолата квасаца и молекуларна идентификација шест изолата бактерија сирћетног врења из комбухе коришћене у ферментацијама. Применом API 20 C AUX тестова, код пет изолата степен сличности је био низак, $< 50\%$. Из тог разлога је идентификација извршена и применом Витек 2 система, када је утврђено да седам изолата припада врсти *Saccharomyces cerevisiae*, док су резултати два узорка показали низак ниво дискриминације и након додатних тестова сврстани у род *Candida lambica*. Молекуларна идентификација изолата квасаца потврдила је присуство рода *Saccharomyces cerevisiae* код седам изолата и утврдила присуство рода *Pichia manshurica* код изолата који су Витек 2 системом сврстани у род *Candida lambica*. Молекуларном идентификацијом изолата бактерија сирћетног врења утврђено је да три изолата припадају врсти *Gluconobacter japonicus*, два врсти *Acetobacter senegalensis* и један врсти *Acetobacter parvum*. У потпоглављу два Праћење тока ферментације комбуха од медицинских гљива *G. lucidum*, *L. edodes* и *C. versicolor* испитана је промена броја квасаца и бактерија сирћетног врења, промена садржаја укупних киселина и рН вредности, као и промена садржаја сахарозе, глукозе, фруктозе и етанола током комбуха ферментација на подлогама од медицинских гљива, током једанаест дана ферментације. Најинтензивнија промена броја квасаца и бактерија сирћетног врења установљена је након 24 часа од почетка ферментације. Највећи број квасаца утврђен другог дана код комбухе од гљиве *Lentinus edodes* (T4), $7,83 \pm 0,01 \log \text{CFU/mL}$, док је максималан број код комбуха од гљиве *Ganoderma lucidum* (T2) био $7,12 \log \text{CFU/mL}$ и *Coriolus versicolor* (T6) $7,50 \log \text{CFU/mL}$, постигнут трећег дана. Највиши број бактерија сирћетног врења постигнут је код узорка T6, трећег дана ($7,56 \log \text{CFU/mL}$), док је у узорку T2 максималан број био петог дана ($7,29 \log \text{CFU/mL}$) и у узорку T4 ($7,18 \log \text{CFU/mL}$), другог дана. Након једанаест дана ферментације, утврђене су веома високе концентрације укупних киселина код сва три узорка и то 33,5, 23,4 и 22,8 g/L, у узорцима T6, T4 и T2, редом. Упркос константном повећању киселина у подлогама које ферментишу, утврђена је успорена промена рН након почетног пада, услед пуферског ефекта који настаје у ферментационој течности. Садржај сахарозе се константно снижавао током ферментације, у сва три узорка комбухе. Садржај глукозе и фруктозе се у узорцима T2 и T6 повећавао током прва два дана, а у узорку T4 током једног дана, након чега је утврђен пад концентрација. Садржај глукозе је у свим узорцима био виши од садржаја фруктозе што указује на то да квасци идентификовани у комбухи преферирају глукозу као извор угљеника. У свим узорцима садржај етанола био је виши од 0,5 % v/v што комбуха напитке од употребљених врста гљива сврстава у нискоалкохолна пића. Највиши садржај етанола је утврђен у узорку T4 трећег дана (4,3 % v/v), у узорку T6 другог дана (3,6 % v/v) док је у узорку T2 био седмог дана (1,8 % v/v). У трећем потпоглављу Хемијска карактеризација комбуха напитака и полисахаридних екстраката од медицинских гљива *G. lucidum*, *L. edodes* и *C. versicolor* приказан је квалитативни и квантитативни састав комбуха узорака и полисахаридних екстраката из комбуха напитака. ATR-FTIR анализа вакуум упарених узорака комбухе од медицинских гљива указује на доминантну полисахаридну фракцију, а утврђено је присуство и протеина, липида, фенола и примарних алкохола. Разлике међу узорцима су утврђене у појединим полисахаридним и моносахаридним компонентама, услед разлика које се јављају међу узорцима у региону $1720 - 1745 \text{ cm}^{-1}$, 1150 cm^{-1} и 987 cm^{-1} . Након алкохолне преципитације полисахарида, FTIR анализа је показала да су полисахариди пречишћени од угљених хидрата мале молекулске масе, а да су у узорцима задржани полифеноли, протеини и липиди, као и да међу узорцима од

различитих гљива постоје разлике у полисахаридном саставу. У тренутку када је достигнута жељена киселост производа утврђен је садржај укупних полифенола чији се садржај смањило након упаравања узорака под вакуумом, док је садржај флавоноида остао непромењен након упаравања. Такође је и садржај укупних полисахарида након упаравања остао непромењен у узорцима и једино је у узорцима комбухе од гљиве *Lentinus edodes* садржај био статистички значајно нижи у односу на друга два узорка. Такође је у овом узорку утврђен и статистички значајно нижи садржај укупних глукана. Садржај укупних глукана износио је 242,2, 166,8 и 237,0 mg/g у узорцима U2 U4 и U6, редом. У сва три узорка, садржај укупних глукана је био у складу са литературним подацима, што указује на то да су биоактивни глукани пренети из гљива у комбуха напиток. Квантитативна анализа полисахаридних узорака комбуха показала је нижи садржај укупних полисахарида код сва три узорка услед уклањања угљених хидрата мале молекулске масе. Најнижи садржај полисахарида поново је утврђен у узорку од гљиве *Lentinus edodes*. Алкохолна преципитација полисахарида утицала је на повећање садржаја полифенола и флавоноида. Највиши садржај полифенола утврђен је у узорку од гљиве *C. versicolor* (TP6), 27,13 mg GAE/mL, а садржај флавоноида је највиши био у узорцима TP2 (од гљиве *G. lucidum*) и TP6, 2,38 и 2,37 mg CE/mL, редом. У четвртм потпоглављу Биолошка својства комбуха производа од медицинских гљива *G. lucidum*, *L. edodes* и *C. versicolor* анализирана су антиоксидативна и антибактеријска својства комбуха производа, као и цитотоксична и имуномодулаторна активност полисахаридних екстраката из комбуха. Најбољу способност хватања DPPH радикала показала је комбуха од гљиве *Ganoderma lucidum* (T2) која је хватала 83,37 %. У упареним узорцима комбуха детектовано је повећање активности са порастом концентрације и најбољом активношћу узорка од гљиве *Ganoderma lucidum* (U2), 86,58 %. Регресионом анализом утврђено је да је способност донирања протона слободним DPPH радикалима зависио од садржаја укупних полисахарида и глукана. Најбољу редукциону способност постигао је узорак комбухе од гљиве *Coriolus versicolor* (T6), 1,64. Код упарених узорака детектовано је повећање апсорбанце са порастом концентрације са највишом постигнутом вредношћу код узорка од гљиве *Coriolus versicolor* (U6), 2,18. Након регресионе анализе, утврђено је да активност зависи од садржаја укупних полифенола и флавоноида. Узорци комбуха су показали низак степен способности хелирања јона гвожђа, са максималном вредношћу од 7,05 % код узорка T6. Комбуха од гљиве *Lentinus edodes* (T4) испољила је најснажнију инхибицију липидне пероксидације (89,8%), као и упарен узорак од исте гљиве (89,2 %). Утврђено је да је активност обрнуто пропорционална садржају укупних полисахарида, као и садржају суве материје. Упарена комбуха од гљиве *G. lucidum* (U2) испољила је тренд смањења инхибиције са порастом концентрације, који је супротан тренду који су испољили остали узорци. На све испитиване Грам-негативне и Грам-позитивне бактеријске сојеве, инхибиторно дејство испољила су сва три комбуха напитка. Најбољу бактерицидну активност узорак комбухе од гљиве *G. lucidum* је испољио према *Y. enterocolitica* и *C. freundii* (0,08 mg/mL), узорак комбухе од гљиве *L. edodes* према *S. epidermidis* (< 0,06 mg/mL), док је комбуха од гљиве *C. versicolor* најактивнија била према *B. spizizenii*, *B. cereus* и *S. aureus* (2,25 mg/mL). Киселине присутне у комбухи од гљиве *L. edodes* и биоактивне материје које потичу из гљиве или су продукти ферментације, испољавају синергетски ефекат на одређене сојеве. Код комбухе од гљиве *C. versicolor* утврђен је значајан утицај синтетисане сирћетне киселине на антибактеријску активност. Анализа цитотоксичне активности полисахаридних узорака из комбуха показала је да не постоји статистички значајна цитотоксична активност. Узорак од гљиве *Coriolus versicolor* (TP6) и *Lentinus edodes* (TP4) довели су до повећања бројности ћелија услед пролиферације само у присуству

фитохемаглутина (РНА), почевши од концентрације 62,5 µg/mL код узорка TP6 и при концентрацији од 125 µg/mL код узорка TP4. Сва три узорка испољила су дејство на продукцију цитокина IL-2, важног за пролиферацију лимфоцита у испитиваном модел систему. Узорак од гљиве *Ganoderma lucidum* (TP2) није утицао на продукцију Th1 цитокина и хемокина, али је довео до снижења Th2 цитокина. Стимулаторно дејство на продукцију TNF-α, IL-6 и IL-8 имао је узорак TP4 при концентрацији од 500 µg/mL и редукцију продукције IL-4, IL-5, IL-10, при свим концентрацијама. Узорак TP6 стимулисао је продукцију TNF-α и IL-8, а инхибирао цитокине IL-4, IL-5 и IL-10. У потпоглављу пет Сензорна анализа комбуха производа од медицинских гљива примењена хедонска скала у оцењивању је показала да комбуха напитака од гљиве *Lentinus edodes* поседује најбоља сензорна својства. Ароматизација аромом кокоса комбуха производа од гљиве *Ganoderma lucidum*, као и комбухе од гљиве *Coriolus versicolor* утицала је на побољшање прихватљивости производа од стране конзумента.

Закључак. У поглављу Закључак кандидаткиња је у кратким тезама изнела најрелевантније закључке до којих је дошла на основу експерименталних истраживања. Идентификација микроорганизама присутних у комбухи која је коришћена у ферментацијама, показала је да се култура састоји од две врсте квасаца и три врсте бактерија сирћетног врења. Број квасаца и бактерија сирћетног врења током ферментација достигала је, у сва три узорка, вредности изнад 7 log CFU/mL. Овим је потврђено да је подлога добијена врелом воденом екстракцијом плодноносних тела одабраних врста медицинских гљива, веома погодна, са нутритивног аспекта, за производњу нових ферментисаних комбуха напитака. Бактерије сирћетног врења су стимулисане да производе сирћетну киселину, што је утицало на скраћење ферментационог процеса. Пуферски ефекат који настаје у ферментационој течности утицао је на успорење промене рН вредности, након неколико дана, иако се садржај киселина у ферментационим течностима константно повећавао. Садржај сахарозе током ферментације бележи константан пад, док је садржај глукозе и фруктозе растао свега један дан. Утврђено је да квасци присутни у комбухи поседују гљукотропни карактер. Највиши број квасаца у узорку Т4 утицао је на највиши садржај етанола у овом узорку. На основу концентрације етанола, сва три комбуха узорка од гљива се могу класификовати као нискоалкохолна пића. Квалитативна ATR-FTIR анализа је показала да је полисахаридна фракција доминантна у узорцима, као и да, међу узорцима, постоји разлика у полисахаридним или моносахаридним компонентама. Након алкохолне преципитације полисахарида, утврђено је да су угљени хидрати мале молекулске масе издвојени, али да и даље постоји разлика у полисахаридном саставу међу узорцима. Концентрација укупних полифенола међу комбуха узорцима се статистички значајно разликовала и била је значајно виша од концентрације укупних флавоноида, док је садржај укупних полисахарида и укупних гљукана био највиши у комбухама од *G. lucidum* и *C. versicolor*. Примена упаравања под вакуумом је утицала на снижење садржаја полифенола и флавоноида, али не и на снижење садржаја полисахарида, док је преципитација етанолом довела до повишења садржаја садржаја укупних полифенола и флавоноида и пречишћавања укупних полисахарида од угљених хидрата мале молекулске масе. Сва три узорка су испољила антиоксидативну активност. Најбољу способност хватања слободних DPPH радикала показала је комбуха од гљиве *G. lucidum*, и упарен узорак од исте гљиве. Веома висок степен негативне корелације утврђен је између EC₅₀ вредности узорка и садржаја укупних гљукана, као и између EC₅₀ вредности и садржаја укупних полисахарида. Узорци од гљиве *C. versicolor* испољили су најбољу редукциона способност, а регресиона анализа је показала корелацију са садржајем полифенола и флавоноида у узорцима. Сви узорци

комбуха од гљива су се показали као лоши хелатори јона гвожђа. Најбољу способност инхибиције липидне пероксидације испољили су узорци комбухе од гљиве *L. edodes*. Узорак комбухе од гљиве *G. lucidum* (U2), са најнижим садржајем полифенола и флавоноида, испољио је тренд опадања активности са повећањем концентрације. Инхибицију бактеријског раста испољили су сви узорци испитиваних комбуха напитака. На велики број сојева бактерија, узорци су испољили и бактерицидно дејство. На антибактеријску активност утичу, поред сирћетне киселине, компоненте екстраховане из гљива или једињења настала током ферментације. Потврђено је да активне компоненте нису термолабилни протеини и ензими велике молекулске масе. Полисахридни екстракти из комбуха не поседују цитотоксичну активност, док је имуномодулаторну активност испољавају на лимфоците и антиген презентујуће ћелије у популацији РВМС. Најснажнији ефекат сва три узорка је испољен при редукцији продукције IL-4 и IL-5 цитокина. Узорак TP6 је показао најснажније дејство на продукцију цитокина IL-2, TNF- α и IL-8 и најслабији ефекат на инхибицију продукције IL-10. Узорак TP2 поседује најснажнији инхибиторни ефекат на IL-4, док је узорак TP4 једини стимулисао продукцију IL-6. Најбољи ефекат би узорци комбуха могли да испоље код популације са пренаглашеним Th2 имуним одговором, као што је случај код астме, алергијских реакција и атопијског дерматитиса. Сензорна оцена је показала добру прихватљивост комбухе од гљиве *Lentinus edodes*, као и потенцијал унапређења сензорних карактеристика напитака, услед побољшања оцена код осталих производа након ароматизације.

Литература. У дисертацији је на правилан начин наведено 235 референци. Избор референци је актуелан и одговара предмету проучавања.

3. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација дип. инж. Александре Скнепек под насловом: „Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстраката одабраних врста медицинских гљива“ представља самостални научни рад који је у потпуној сагласности са планом предвиђеним пријавом дисертације.

Докторска дисертација дип. инж. Александре Скнепек даје увид у могућност примене одабраних врста гљива у добијању нових ферментисаних комбуха производа. 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 је у порасту интересовање људи за функционалном храном, која поред хранљивости садржи и компоненте које нису уобичајене за традиционалне производе, а које доприносе одређеним здравственим ефектима, медицинске гљиве, као богат извор биоактивних једињења, поседују добар потенцијал примене у развоју нових прехранбених производа са функционалним својствима. С обзиром да истраживања о могућности примене медицинских гљива у добијању комбуха напитака до сада није испитана, јасно је да добијени резултати имају велики практични значај. Доказана изузетна антимикуробна, антиоксидативна и имуномодулаторна својства указују на велики потенцијал примене оваквих производа у терапеутске сврхе. Полазећи од тога да су и у свету, знања о процесу ферментације и биолошком потенцијалу комбуха напитака још увек ограничена, ова дисертација доприноси бољем разумевању утицаја медицинских гљива на ток ферментације и биолошка својства производа.

Имајући у виду све изнето, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију кандидаткиње Александре Скнепек, дипл. инж. под насловом: „Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстракта одабраних врста медицинских гљива“ и предлаже Наставно-научном 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,

Чланови комисије:

26.09.2019.

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 Виктор Недовић, редовни професор
Ужа научна област: Биохемија
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

др Синиша Марков, редовни професор
Ужа научна област: Биотехнологија
Универзитет у Новом Саду, Технолошки факултет

др Предраг Вукосављевић, редовни професор
Ужа научна област: Наука о конзервисању и врењу
Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет

Прилог:

Сепарат објављеног рада дипл. инж. Александре Скнепнек у научном часопису на SCI листи

Sknepnek, A., Pantić, M., Matijašević, D., Miletić, D., Lević, S., Nedović, V., Niksic, M. (2018); Novel Kombucha Beverage from Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum*, with Antibacterial and Antioxidant effects. International Journal of Medicinal Mushrooms, 20(3): 243-258, doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2018025833

**Оцена извештаја о провери оригиналности докторске дисертације под насловом:
„Карактеристике чајне гљиве – комбухе ферментисане у присуству екстраката
одабраних врста медицинских гљива”, аутора Александре Скнепнек, дипл. инж.**

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Карактеристике чајне гљиве – комбухе, ферментисане у присуству екстраката одабраних врста медицинских гљива ”**, аутора Александре Скнепнек, дипл. инж., констатујем да утврђено подударање текста износи 9%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду,
26.09.2019.

Ментор:

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