

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Danka M. Matijašević

**UTICAJ Se(IV)- I Se(VI)- MODIFIKOVANOG
ZEOLITA NA ANTIOKSIDATIVNO I
ANTIMIKROBNO DEJSTVO GLJIVA
PLEUROTUS OSTREATUS I
*CORIOLUS VERSICOLOR***

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Danka M. Matijašević

**THE INFLUENCE OF Se(IV)- AND Se(VI)-
MODIFIED ZEOLITE ON ANTIOXIDANT AND
ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FUNGI
PLEUROTUS OSTREATUS AND
*CORIOLUS VERSICOLOR***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor:

Dr Miomir Nikšić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Članovi komisije:

Dr Milena Pantić, docent,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Sanja Jevtić, docent,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Vladimir Pavlović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Dr Anita Klaus, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Miomiru Nikšiću na dragocenim savetima, poverenju i podršci koju mi je pružio tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem doc. dr Mileni Pantić, za nesebičnu podršku, sjajne ideje i stalnu motivaciju, za pruženu pomoć i sve kreativne savete i sugestije.

Doc. dr Sanji Jevtić zahvaljujem se na saradnji i podršci, prijateljskoj i stručnoj pomoći, kao i značajnim sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Doc. dr Aniti Klaus iskreno se zahvaljujem na korisnim savetima i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr Vladimiru Pavloviću na ukazanoj pomoći, dragocenim sugestijama i izdvojenom vremenu pri izradi eksperimentalnog dela disertacije, kao i za sve korisne savete koje mi je dao prilikom pisanja ove disertacije.

Deo ove doktorske disertacije je urađen na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo zbog čega veliku zahvalnost dugujem dr Nemanji Stanisavljeviću.

Zahvaljujem se i dr Nemanji Mirkoviću za svesrdnu pomoć i reči podrške.

Zahvaljujem se doc. dr Božidaru Raškoviću na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu i dr Jasmini Živanović sa Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” na divnoj saradnji i podršci.

Hvala svim kolegicama i kolegama sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Katedre za ekološku mikrobiologiju i Katedre za konzervisanje i vrenje na prijateljstvu, nesebičnoj pomoći i podršci tokom svih ovih godina.

Najveću zahvalnost na bezrezervnoj podršci, razumevanju, strpljenju i pomoći u svakom trenutku dugujem mojim roditeljima, sestri i mom Jugoslavju.

Autor

Uticaj Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita na antioksidativno i antimikrobno dejstvo gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

REZIME

Poslednjih nekoliko decenija sve veća pažnja se posvećuje nutritivnim i medicinskim svojstvima gljiva. Gljive mogu transformisati biljne lignocelulozne ostatke niske hranljive vrednosti u visoko vredne delikatesne namirnice. Dokazano je i da mogu usvojiti selen, iz supstrata na kojem rastu, i da ta sposobnost zavisi od vrste gljive, kao i od oblika i koncentracije dodatog selena. Selen je esencijalni mikronutrijent, neophodan za normalno funkcionisanje organizma. Istraživanja o zastupljenosti ovog elementa ukazuju da zemljište Srbije, kao i životne namirnice spadaju među selenom najsiromašnije u svetu. Sa druge strane, Srbija raspolaže značajnim količinama zeolita i procenjuje se da se najveće zalihe ovog minerala u Evropi nalaze u blizini Vranjske Banje. Zeolitski tuf može biti modifikovan i potom upotrebljen kao adsorbent selenit- i selenat-jona.

Uticaj Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita (Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI) na aktivnost enzima antioksidativnog sistema zaštite praćen je u svežim plodonosnim telima gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*. Jača aktivnost enzima superoksid-dismutaze i glutation-peroksidaze je utvrđena u svim uzorcima gljive *P. ostreatus* odgajenim na supstratu sa dodatkom selena u odnosu na kontrolu. Kod većine uzoraka gljive *C. versicolor*, obogaćene selenom, ustanovljena je jača aktivnost enzima superoksid-dismutaze i katalaze i slabija aktivnost glutation-peroksidaze u poređenju sa kontrolom. Primenom SDS-PAGE gel elektroforeze utvrđeno je da selen prisutan u uzorcima nije uticao na promenu molekulskih masa ispitivanih gljiva.

U ovoj disertaciji izolovani su metanolni ekstrakti gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor*, odgajenih na supstratu bez i sa dodatkom različitih koncentracija selena u vidu Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita. Sadržaj selena u ekstraktima pripremljenim iz gljive *P. ostreatus*, obogaćene ovim elementom, je bio od 35–125 puta veći u poređenju sa kontrolnim ekstraktom, dok je kod gljive *C. versicolor* određen od 180–250 puta veći sadržaj selena.

Utvrđeno je da su svi ekstrakti, dobijeni iz gljiva obogaćenih selenom, imali povećan sadržaj ukupnih proteina (od 17 do čak 127%) i ukupnih flavonoida u odnosu na kontrolni ekstrakt. Sadržaj ukupnih fenola, polisaharida i β -glukana je najčešće bio viši nego u kontrolnim ekstraktima. Slabe apsorpcione trake karakteristične za proteine su detektovane, primenom FT-IR spektroskopije, samo kod metanolnih ekstrakata dobijenih iz uzoraka gljiva obogaćenih selenom.

Za određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata u *in vitro* uslovima, korišćene su četiri različite metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Uzorci su poređeni na osnovu sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, inhibicije lipidne peroksidacije, sposobnosti heliranja jona gvožđa i redukcione sposobnosti. Utvrđeno je da se skoro kod svih ekstrakata antioksidativni potencijal povećavao sa povećanjem koncentracije ekstrakta. Svi ispitivani ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus*, odgajene na supstratu sa dodatkom selena u koncentraciji od 50 i 75 mg kg⁻¹ u vidu Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita (Se_{IV}-CLI 50, Se_{VI}-CLI 50, Se_{IV}-CLI 75 i Se_{VI}-CLI 75), su ispoljili jače antioksidativno dejstvo u odnosu na gljivu odgajenu na supstratu bez dodatka selena. Regresiona analiza je pokazala da je antioksidativni potencijal, u zavisnosti od vrste ekstrakta i primenjene metode, u korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, kao i sa sadržajem ukupnih polisaharida i β -glukana. Istom analizom je kod metode sposobnosti heliranja jona gvožđa ustanovljena i visoka korelacija sa sadržajem ukupnog selena.

Ispitivanjem antimikrobnih svojstava utvrđeno je da su metanolni ekstrakti izolovani iz gljiva, sa i bez dodatog selena, pokazali jače antibakterijsko delovanje, sa nižim inhibitornim koncentracijama, na Gram pozitivne u odnosu na Gram negativne bakterije. Svi ekstrakti su delovali mikrobicidno na *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Rhodococcus equi* ATCC 6939, a neki od ekstrakata su imali mikrobicidni efekat i na bakterije *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 i *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729.

Najširi spektar antibakterijskog dejstva je pokazao metanolni ekstrakt izolovan iz gljive *C. versicolor*, odgajene na supstratu sa dodatkom selena u koncentraciji od $62,5 \text{ mg kg}^{-1}$ u vidu Se(VI)-modifikovanog zeolita (Se_{VI}-CLI 62,5), za koji je utvrđeno baktericidno dejstvo na 15 od 19 testiranih bakterija. Za ispitivanje mehanizma dejstva i potvrđivanje antimikrobne aktivnosti odabranih ekstrakata korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisiono elektronska mikroskopija (TEM).

Ključne reči: *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*, Se(IV)- i Se(VI)-modifikovan zeolit, akumulacija, superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, antioksidativna svojstva, antimikrobna svojstva.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK: 561.284:546.23(043.3)

The influence of Se(IV)- and Se(VI) -modified zeolite on antioxidant and antimicrobial activity of fungi *Pleurotus ostreatus* and *Coriolus versicolor*

ABSTRACT

In recent decades, more attention is paid to the nutritional and medicinal properties of fungi. Fungi can transform lignocellulosic residues of plants with low nutritional value into high-value delicious food. It has been shown that fungi can absorb selenium from the growing substrate and that this ability depends on the type of fungus and concentration of the added selenium. Selenium is an essential micronutrient, necessary for the proper functioning of the organism. Research on the distribution of this element indicates that land in Serbia, and foodstuffs are among the poorest in the world. On the other hand, Serbia has significant quantities of zeolite and it is estimated that the largest reserves of this mineral in Europe are located near Vranjska Banja. The zeolitic tuff can be modified and then used as an adsorbent for selenite- and selenate-ions.

The influence of Se(IV)- and Se(VI)- modified zeolite (Se_{VI}-CLI and Se_{IV}-CLI) on the enzyme activity of the antioxidant protection system was monitored in fresh fruiting bodies of the fungi *P. ostreatus* and *C. versicolor*. Increased activity of the superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes was measured in all samples of *P. ostreatus* grown on the substrate with the addition of selenium compared to the control samples. Most samples of *C. versicolor* enriched with selenium showed increased activity of superoxide dismutase and catalase enzymes and weaker activity of glutathione peroxidase compared to the control. By applying SDS-PAGE gel electrophoresis it was found that selenium present in the samples did not affect the molecular weight change of the tested fungi.

In this dissertation methanol extracts of fungi *P. ostreatus* and *C. versicolor* grown on a substrate with and without addition of various concentrations of selenium in the form of Se(IV)- and Se(VI)-modified zeolite were isolated.

The concentration of selenium in extracts prepared from *P. ostreatus*, enriched with this element, was 35 to 125 times higher compared to the control extract, while *C. versicolor* samples showed 180 to 250 times higher selenium concentration. All of the extracts obtained from fungi rich in selenium had an increased total protein (from 17 up to 127%) and flavonoid content compared to the control extract. The content of total phenols, polysaccharides and β -glucan was usually higher than in the control extracts. Using FT-IR spectroscopy weak absorption bands characteristic of proteins were detected only in methanol extracts obtained from samples of fungi enriched with selenium.

In order to determine the antioxidant potential of methanol extracts *in vitro*, four different methods that correspond to different levels of antioxidant activity were used. Comparison was made in the ability of inhibition of lipid peroxidation, DPPH free radical scavenging activity, ferric-reducing antioxidant power assay and the chelating ability of ferrous ions. In nearly all extracts antioxidant potential increased with the increase in the extract concentration. All tested extracts isolated from *P. ostreatus*, grown on a substrate with added selenium at a concentration of 50 and 75 mg kg⁻¹ in the form of Se(IV) - and Se(VI)- modified zeolite (Se_{IV}-CLI 50, Se_{VI}-CLI 50, Se_{IV}-CLI 75 and Se_{VI}-CLI 75), exhibited increased antioxidant activity compared to the fungus cultivated on a substrate without the addition of selenium. Regression analysis showed that the antioxidant potential, depending on the type of the extract and the method applied, was in correlation with the content of total phenols and flavonoids, as well as the total content of the polysaccharides and β -glucan. The same analysis applied in the method of chelating ability of ferrous ions showed a high correlation with the content of total selenium.

Methanol extracts isolated from fungi, with or without added selenium, showed increased antibacterial activity, with lower inhibitory concentrations to Gram-positive as compared to Gram-negative bacteria.

All tested extracts showed microbicidal activity against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Rhodococcus equi* ATCC 6939, while some of the extracts had a microbicidal effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 and *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729. The widest spectrum of antibacterial activity was exhibited by the methanol extract derived from *C. versicolor*, grown on a substrate with added selenium at a concentration of 62,5 mg kg⁻¹ in the form of Se(VI)-modified zeolite (Se_{VI}-CLI 62,5), which showed bactericidal activity in 15 of the 19 tested bacteria. To establish the mechanisms of action and confirm the antimicrobial activity of selected extracts scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) were used.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, *Coriolus versicolor*, Se(IV)- and Se(VI)-modified zeolite, accumulation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, antioxidant ability, antimicrobial properties.

Academic Expertise: Biotechnical sciences

Field of Academic Expertise: Food and Industrial Microbiology

UDK: 561.284:546.23(043.3)

SKRAĆENICE:

AAS	Atomska apsorpciona spektroskopija
AMP	Antimikrobni peptidi
ANOVA	Jednofaktorska analiza varijanse
AOS	Sistem antioksidativne zaštite
ATCC	Američka tipska kolekcija kultura
ATP	Adenozin trifosfat
BHA	Butilovani hidroksianizol
BHT	Butilovani hidroksitoluen
BSA	Albumin govedjeg seruma
CAT	Katalaza
cGMP	Ciklični guanozin monofosfat
CLI	Klinoptilit
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FT-IR	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy
GAE	Ekvivalenti galne kiseline
GC	Gasna hromatografija
GOPOD	Glukoooksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin
GSH-Px	Glutation-peroksidaza
GR	Glutation-reduktaza
GSH	Glutation
HIV	Virus humane imunodeficijencije
HPLC	Tečna hromatografija visokog stepena razdvajanja
ICP-MS	Masena spektrometrija sa induktivno kuplovanom plazmom
KKI	Kapacitet katjonske izmene
LDL	Lipoproteini male gustine
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija
MBC	Minimalna baktericidna koncentracija

MRSA	Meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
NK	Urođenoubilačke ćelije
OD	Optička gustina
PBU	Osnovna gradivna jedinica
PSK	Polisaharid krestin gljive <i>Coriolus versicolor</i>
PSP	Polisaharid-peptid gljive <i>Coriolus versicolor</i>
RBS	Reaktivne vrste broma
RCS	Reaktivne vrste hlora
RFI	Preporučeni dnevni unos
ROS	Reaktivne vrste kiseonika
RNS	Reaktivne vrste azota
RS	Reaktivne vrste
RSS	Reaktivne vrste sumpora
SBU	Sekundarna gradivna jedinica
SDS-PAGE	Natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza
Se	Selen
Se_{IV}-CLI	Se(IV)-modifikovani zeolit
Se_{VI}-CLI	Se(VI)-modifikovani zeolit
SeCys	Selenocistein
SEM	Skenirajuća elektronska mikroskopija
SeMeSeCys	Selenometilselenocistein
SeMet	Selenometionin
SOD	Superoksid-dismutaza
TEM	Transmisiono elektronska mikroskopija
WHO	Svetska zdravstvena organizacija

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. VIŠE GLJIVE – CARSTVO FUNGI	4
2.1.1. Gljive kao funkcionalna hrana	5
2.1.2. Odabrane vrste gljiva.....	8
2.1.2.1. <i>Coriolus versicolor</i>	8
2.1.2.2. <i>Pleurotus ostreatus</i>	12
2.2. ANTIMIKROBNA DEJSTVA	16
2.2.1. Antimikrobna svojstva gljiva	17
2.2.2. Mehanizmi antimikrobnog delovanja.....	20
2.3. OKSIDATIVNI STRES I REAKTIVNE HEMIJSKE VRSTE.....	22
2.3.1. Enzimaska antioksidativna zaštita.....	26
2.4. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA GLJIVA	30
2.5. SELEN	32
2.5.1. Selen u gljivama	33
2.5.2. Biološka uloga selena	36
2.6. PRIRODNI ZEOLITI	37
2.6.1. Svojstva zeolita.....	39
2.6.2. Primena zeolita	41
3. CILJEVI RADA	42
4. MATERIJAL I METODE.....	43
4.1. MODIFIKACIJA ZEOLITSKOG TUFA I ADSORPCIJA SELENIT- I SELENAT-JONA	43
4.2. ODREĐIVANJE BRZINE RASTA MICELIJE NA LABORATORIJSKIM HRANLJIVIM PODLOGAMA	44
4.2.1. Određivanje brzine rasta micelije na čvrstom agaru	44
4.2.2. Određivanje brzine rasta micelije na pšeničnoj slami	44
4.3. INDUSTRIJSKI POSTUPAK GAJENJA GLJIVA	45
4.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMSKIH ANTIOKSIDANATA U SVEŽIM PLODONOSNIM TELIMA GLJIVA	46
4.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)	46
4.4.2. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze (GSH-Px).....	46
4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	47
4.4.4. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)	48
4.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNOG SELENA U PLODONOSNIM TELIMA GLJIVA I METANOLNIM EKSTRAKTIMA	48
4.6. PRIPREMA METANOLNIH EKSTRAKATA.....	49
4.7. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA METANOLNIH EKSTRAKATA.....	49
4.7.1. Određivanje ukupnih ugljenih hidrata	49

4.7.2. Određivanje ukupnih proteina	49
4.7.3. Određivanje ukupnih lipida	50
4.7.4. Određivanje ukupnih fenola	50
4.7.5. Određivanje ukupnih flavonoida	51
4.7.6. Određivanje sadržaja ukupnih, α - i β -glukana.....	51
4.7.7. FT–IR spektroskopija	51
4.8. BIOLOŠKA SVOJSTVA METANOLNIH EKSTRAKATA.....	52
4.8.1. Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva	52
4.8.1.1. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida	52
4.8.1.2. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala	53
4.8.1.3. Redukciona svojstva	53
4.8.1.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa	54
4.8.2. Antimikrobna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva	54
4.8.2.1. Sojevi mikroorganizama i priprema inokuluma	55
4.8.2.2. Mikrodiluciona metoda.....	55
4.8.2.3. Određivanje kinetike rasta mikroorganizama merenjem optičke gustine (OD).....	56
4.8.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	57
4.8.2.5. Transmisiono elektronska mikroskopija (TEM)	57
4.9. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA.....	58
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	59
5.1. Se(IV)- i Se(VI)-OBOGAĆENI ZEOLIT	59
5.2. ODREĐIVANJE BRZINE RASTA MICELIJE GLJIVA <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> I <i>CORIOLOUS VERSICOLOR</i> NA LABORATORIJSKIM HRANLJIVIM PODLOGAMA	60
5.2.1. Određivanje brzine rasta micelije na čvrstom agaru	60
5.2.2. Određivanje brzine rasta micelije na pšeničnoj slami	62
5.3. USVAJANJE SELENA U PLODONOSNA TELA GLJIVA <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> I <i>CORIOLOUS VERSICOLOR</i>	63
5.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMSKIH ANTIOKSIDANATA U SVEŽIM PLODONOSNIM TELIMA GLJIVA <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> I <i>CORIOLOUS VERSICOLOR</i>	65
5.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD).....	65
5.4.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px).....	69
5.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT).....	72
5.4.4. Skeniranje proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza).....	75
5.5. PRINOS EKSTRAKATA GLJIVA	77
5.6. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA METANOLNIH EKSTRAKATA GLJIVA <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> I <i>CORIOLOUS VERSICOLOR</i>	79
5.6.1. Ukupan sadržaj selena u metanolnim ekstraktima	79
5.6.2. Polisaharidne komponente	80
5.6.3. Ukupan sadržaj lipida i proteina.....	82
5.6.4. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida.....	83

5.6.5. FT–IR spektroskopija	85
5.7. BIOLOŠKA SVOJSTVA METANOLNIH EKSTRAKATA.....	89
5.7.1. Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva <i>Pleurotus ostreatus</i> i <i>Coriolus versicolor</i>	89
5.7.1.1. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida	89
5.7.1.2. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala	92
5.7.1.3. Redukciona svojstva.....	96
5.7.1.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa	99
5.7.1.5. Vrednosti EC ₅₀ za metanolne ekstrakte u antioksidativnim metodama	103
5.7.2. Antimikrobna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva <i>Pleurotus ostreatus</i> i <i>Coriolus versicolor</i>	108
5.7.2.1. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije.....	108
5.7.2.2. Određivanje kinetike rasta bakterija merenjem optičke gustine (OD) .	115
5.7.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM).....	124
5.7.2.4. Transmisiono elektronska mikroskopija (TEM)	127
6. ZAKLJUČAK	132
7. LITERATURA	141

1. UVOD

Gljive su vekovima prikupljane i korišćene kao ukusna i visoko kvalitetna hrana, pre svega u zemljama Orijenta, odakle prvenstveno i potiče znanje i praksa upotrebe gljiva. Frakcije lekovitih gljiva rastvorne u toploj vodi (ekstrakti) korišćene su i kao lek u Kini, Japanu i Koreji (Wasser, 2002). Danas je poznato da gljive pored neosporne nutritivne i gastronomske vrednosti, usled prisustva svih esencijalnih aminokiselina, minerala, vitamina, dijetetskih vlakana i niskog sadržaja masti, pokazuju i čitav niz medicinskih svojstava. Brojna istraživanja skrenula su pažnju na značajne biološke aktivnosti gljiva uključujući: antiinflamatorne i imunomodulatorne (Wasser, 2002; Lindequist et al., 2005), antitumorne (Yang et al., 1992; Xu, 1999; Wang et al., 2000; Sarangi et al., 2006; Yan i Chang, 2012), antimikrobne, antiviralne i antiparazitske (Collins i Ng, 1997; Wasser i Weis, 1999; Suay et al., 2000, Alves et al., 2012; Patel et al., 2012), hepatoprotektivne i antidijabetske (Perera i Li, 2011; Soares et al., 2013), antialergijske (Sano et al., 2002) i antioksidativne (Mau et al., 2002; Wong i Chye, 2009; Turlo et al., 2010). Glavna jedinjenja gljiva, kojima se pripisuje biološka aktivnost, su polisaharidi (prevashodno β -glukani), peptidi, fenoli i flavonoidi, terpeni. Standardni pristup istraživanjima je bio da se komponente ekstrakata gljiva izoluju, okarakterišu i potom primene kao čiste supstance (poput lekova), međutim ustanovljeno je da različita jedinjenja u ekstraktima mogu imati sinergističko dejstvo. Istraživanja pokazuju da ekstrakti gljiva mogu delovati u različitim fazama oboljenja, ili u istoj fazi ali drugačijim mehanizmima zahvaljujući prisustvu smeše komponenata (Borchers et al., 2004). Na osnovu ovih saznanja razvijeni su i različiti preparati iz ekstrakata karpofora i micelijuma medicinski važnih gljiva, koji se koriste u vidu kapsula, ampula i čajeva.

Gljive su najpre sakupljane u svom prirodnom staništu, a u proteklih 50 godina se intenziviralo i njihovo gajenje u veštačkim uslovima, što je uticalo na porast potrošnje. Poznata je i njihova sposobnost da akumuliraju materije iz supstrata na kojem se gaje, te su našle primenu u bioremedijaciji i usvajanju mikronutrijenata (deficitarnih u namirnicama biljnog porekla) neophodnih u humanoj ishrani (Kalač i Svoboda, 2000).

Selen je esencijalni oligoelement neophodan za normalan metabolizam ćelija. Ulazi u sastav selenoproteina koji grade veliki broj enzima sa antioksidativnom funkcijom (najpoznatiji selenoenzim je glutation peroksidaza, GSH-Px) i ulogom u stvaranju hormona štitaste žlezde. Preporučeni dnevni unos selena iznosi 55 µg za žene i 70 µg za muškarce ili 0,87 µg kg⁻¹ telesne mase, dok je gornja granica sigurnog unosa 400 µg/dnevno (IOM, 2000). Ustanovljeno je da je u pojedinim delovima sveta, poput Kine i Novog Zelanda i u nekim zemljama Evrope (Grčka, Hrvatska) prosečan dnevni unos ovog elementa ispod 40 µg (Rayman, 2000). U jednom od prvih istraživanja o zastupljenosti selena u Srbiji utvrđeno je da naše zemljište, kao i životne namirnice spadaju među selenom najsiromašnije u svetu. Prosečan dnevni unos selena u Srbiji je procenjen na 27 µg (Backović, 2005). Nedostatak selena u ishrani se povezuje sa pojavom mnogih bolesti kao što su arteroskleroza, endemska srčana miopatija (Kešanska bolest), endemska osteoartropatija (Kašin-Bek), slabljenje imunološke odbrane organizma, Alchajmerova i Parkinsonova bolest. Veća smrtnost od oportunističkih infekcija, kao i pojava nekih vrsta kancera se takođe dovode u vezu sa nedovoljnim unosom ovog elementa (Baum et al., 1997; Navarro-Alarcon i López-Martinez, 2000; Tapiero et al., 2003). Zadovoljenje dnevnih potreba za selenom postiže se unošenjem mesa, cerealija, ribe, kao i voća i povrća.

Ranija istraživanja pokazuju da pojedine gljive uspešno apsorbuju i akumuliraju (pretežno u karpoforima) selen. Detaljnijim analizama je ustanovljeno da se selen u njima nalazi pretežno u vidu niskomolekularnih jedinjenja kao što su seleniti i aminokiseline selenometionin i selenocistein (Falandysz, 2008). Sav uneti selenometionin i selenocistein se vrlo dobro resorbuju u organizmu, dok se jedinjenja Se(IV) resorbuju nešto slabije (Backović, 2005). U dosadašnjim istraživanjima, koja su se bavila apsorbovanjem ovog elementa od strane gljiva, kao izvor selena najčešće je korišćena neorganska so, Na-selenit. Pored selenita, primenjivani su i Na-selenat, selenski kvasac, Selol (dobijen procesom esterifikacije suncokretovog ulja selenastom kiselinom), kao i selenosemikarbazonski kompleksi (Malinowska et al., 2009; Savić, 2014). Mogućnost akumulacije selena iz modifikovanog zeolitskog tufa na kojem su adsorbivani selenit- i selenat-joni nije ispitivana.

Dokazano je da zeolit dodat u supstrat za gajenje gljiva ubrzava rast micelijuma, skraćuje vreme plodonošenja, daje veće prinose i poboljšava hemijski sastav plodonosnih tela (Klaus et al., 2005). Osim toga, pokazano je da nema štetno dejstvo na zdravlje ljudi i životinja (Pavelić et al., 2001).

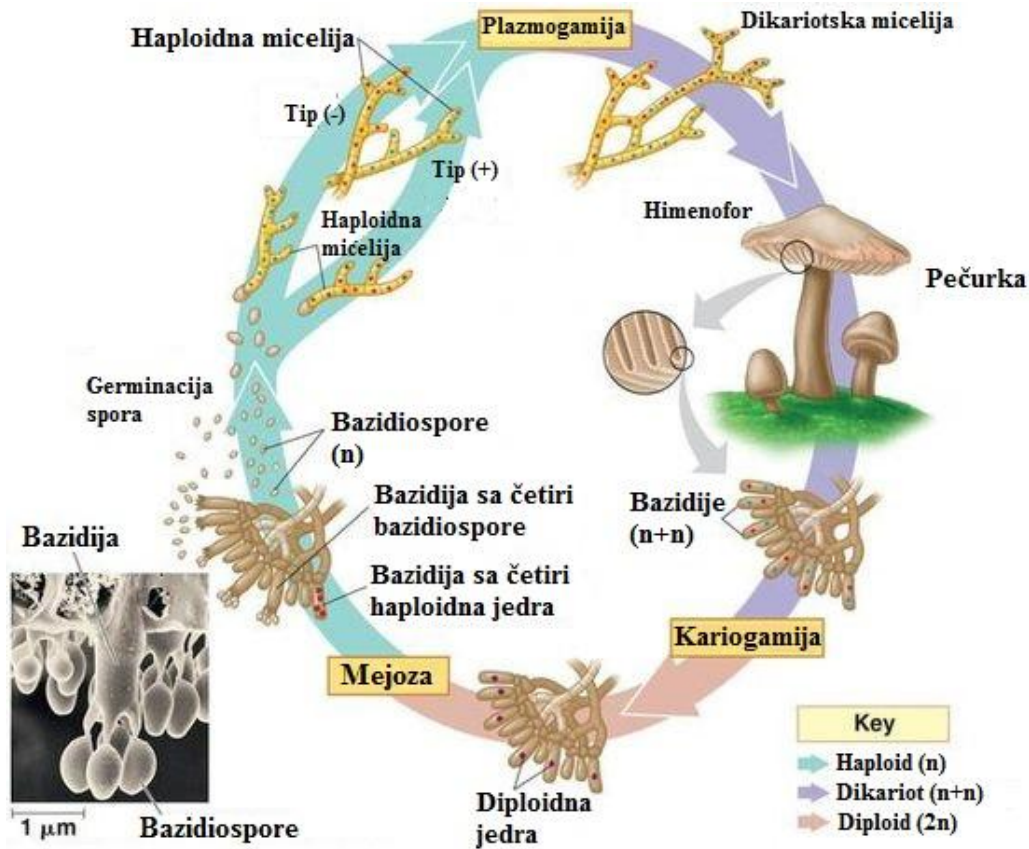
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Više gljive – carstvo Fungi

Gljive (Fungi) su posebno carstvo živih bića, eukariotske građe, u koje spadaju kako vrste sa filamentoznom strukturom tako i jednoćelijski kvasci. Heterotrofni su organizmi koji se hrane apsorpcijom. Osnovno somatsko telo viših gljiva čini micelija, koja se sastoji iz spleta hifa. Micelija vrlo brzo prorasta supstrat na kome raste, apsorbujući nutrijente celom svojom površinom i može se prostirati na više hektara. Ćelijski zid se najvećim delom sastoji iz polisaharida – hitina linearnog polimera n-acetilglukozamina povezanog β -1,4 vezama, dok su u znatno manjem procentu zastupljeni lipidi i proteini. Hife viših gljiva su septirane i kroz njih slobodno struje jedra. Osim micelijuma, podzemnog dela, telo gljive se sastoji i iz nadzemnog plodonosnog dela – šešira i drške. Gljive se uglavnom razmnožavaju sporama koje, u zavisnosti od razdela, nastaju na bazidijama ili u askusima. U razdeo Basidiomycota spadaju: red Agaricales (lističavke), čiji himenofor je u obliku listića radijalno raspoređenih sa donje strane šešira i red Polyporales (rupičavke) kod kojih je himenofor u obliku cevčica (slika 2.1). Varijacije u izgledu plodonosnog tela i spora se koriste kao kriterijumi u identifikaciji gljiva. Većina gljiva su saprofiti (razlažu mrtav ligno-celulozni materijal), neke su paraziti biljaka i životinja, a ima i vrsta koje formiraju simbiotsku vezu sa pojedinim biljnim vrstama - mikoriza (Stojanović i Nikšić, 2003).

Procenjuje se da na Zemlji ima oko 140 000 različitih vrsta gljiva, od toga približno 10% je poznato, opisano i sa utvrđenom binarnom nomenklaturom. Za 7 000 vrsta se smatra da su jestive, a za nešto više od 700 do danas istraženih vrsta je dokazano da poseduju značajna farmakološka svojstva. Gljive predstavljaju prirodan izvor biološki aktivnih komponenti koji je u velikoj meri neiskorišćen i još uvek nedovoljno istražen (Wasser, 2002).

Osim sakupljanja u prirodi, gljive se relativno jednostavno mogu gajiti i na različitim supstratima bilo kao jestive delikatesne namirnice ili u medicinske svrhe. Približno 20-30 komercijalnih sojeva se gaji širom sveta, a u najveće svetske proizvođače spadaju Kina, Amerika, Holandija, Poljska i Španija. *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Volvariella volvacea* i *Lentinula edodes* čine oko 90% ukupne svetske proizvodnje.



Slika 2.1. Životni ciklus viših gljiva

(<http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/lab/diversity/fungi/key1151.html>)

2.1.1. Gljive kao funkcionalna hrana

Gljive su vekovima cenjene kao ukusna i visoko kvalitetna hrana, pre svega u zemljama Dalekog istoka. U nekim delovima Evrope postoji tradicija sakupljanja gljiva, koje se koriste kao važan dodatak ishrani, u vidu supa i čajeva.

Gljive sadrže izrazito visok procenat vode, u proseku oko 90% odnosno suva materija iznosi oko 100 g kg^{-1} , a imaju i visoku aktivnost vode (a_w) što sve doprinosi njihovom kratkom roku trajanja (od nekoliko sati do desetak dana). Sadržaj ugljenih hidrata, računato na suhu težinu, iznosi 39–88% (u proseku oko 56,8%) i vlakana 4–20%. Glukoza, manitol i trehaloza su najzastupljeniji monosaharidi i njihov sadržaj se neznatno menja procesima sušenja i zamrzavanja.

Za razliku od skroba, koji je glavna rezervna materija kod biljaka, rezervni polisaharid kod gljiva je glikogen i njegov sadržaj varira između 5 i 10% (Kalač, 2009). Hitin, druge hemiceluloze, manani i β -glukani koji ulaze u sastav ćelijskog zida gljiva predstavljaju potencijalni izvor dijetetskih vlakana. Dijetetska vlakna (rastvorljive frakcije) ubrzavaju transport crevnog sadržaja, stimuliraju rast crevne mikroflore, utiču na apsorpciju organskih i neorganskih jedinjenja, štite organizam od karcinoma debelog creva i snižavaju nivo holesterola u krvi (Cummings i Stephen, 1980; Rop et al., 2009). Zbog relativno visokog udela ovih, teško svarljivih, komponenti (10–50%) i niskog sadržaja masti (2–6%) kalorijska vrednost gljiva je niska i iznosi oko 20–40 kcal odnosno 120–150 kJ (Kalač, 2009).

Većina biološki aktivnih polisaharida gljiva, koji se međusobno razlikuju po hemijskom sastavu i konfiguraciji, pripada β -glukanima. Kod medicinski važnih gljiva β -D-glukani predstavljaju komponente koje utiču na njihova antitumorna i imunomodulatorska svojstva. Osnovni lanac β -glukana je izgrađen iz jedinica glukoze koje su međusobno linearno povezane β (1→3) glikozidnim vezama, a do grananja dolazi formiranjem β (1→6) glikozidnih veza. Upravo način grananja, odnosno položaj β (1→6) veza u odnosu na β (1→3) niz, molekulska masa i rastvorljivost u vodi određuju nivo antitumorske aktivnosti gljiva. Međutim, ustanovljeno je da antitumorska svojstva ispoljavaju i polisaharidi sa drugačijom strukturom, kao što su hetero- β -glukani, heteroglikani (u čiji sastav osim glukoze ulaze i drugi monosaharidi poput ksiloze, manoze, galaktoze), glikoproteini (kompleksi proteina sa α - ili β -glukanima), α -mano- β -glukani i heteroglikan-protein kompleksi (Wasser, 2002). Do danas, najveći broj *in vivo* studija o antitumornim efektima gljiva se bavio komercijalno dostupnim β -D-glukanima, kao što su lentinan - izolovan iz gljive *Lentinula edodes*, šizofilan - izolovan iz *Schizophyllum commune*, pleuran - izolovan iz *Pleurotus ostreatus* i krestin (PSK) - izolovan iz *Coriolus versicolor* (Wasser, 2002; Rop et al., 2009). Aktivnost polisaharida gljiva se ogleda u prevenciji onkogeneze i širenju karcinoma (formiranju metastaza). Smatra se da β -glukani ne deluju direktno na tumor već da utiču na povećanje aktivnosti imunog sistema domaćina (Wasser, 2002).

Gljive predstavljaju i dobar izvor svarljivih proteina, sadrže 16–51% (u proseku oko 32,6%) proteina, izraženo na suhu težinu, što je više nego kod većine vrsta voća i povrća. Posebno je značajno da sadrže sve esencijalne aminokiseline, međutim kod nekih vrsta gljiva (poput *L. edodes* i *P. ostreatus*) sadržaj aminokiselina sa sumporom, metionina i cistina, je nešto niži (Breene, 1990; Kalač, 2009). Literaturni podaci za sadržaj slobodnih aminokiselina u gljivama dosta variraju i kreću se od oko 1% (Kalač, 2009) do 25–35% (Breene, 1990). Osim nutritivne vrednosti, slobodne aminokiseline su značajne i za formiranje arome gljive. Glutaminska kiselina, glutamin i alanin su najdominantnije slobodne aminokiseline.

Sadržaj ukupnih lipida u gljivama je dosta nizak i kreće se u proseku od 2–6% računato na suhu težinu. Gljive sadrže sve klase lipidnih komponenata uključujući slobodne masne kiseline, mono-, di- i tri-gliceride, sterole, sterol estre i fosfolipide. Polinezasićena linoleinska kiselina, mononezasićena oleinska kiselina i zasićena palmitinska kiselina su najzastupljenije masne kiseline kod gljiva. Odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina u šeširu iznosi 3,4:1 dok je u dršci taj odnos 4,5:1, te je preporuka da se u ishrani koristi i drška jer ona sadrži više linoleinske kiseline. Prisustvo *trans* masnih kiselina nije detektovano u gljivama. Fosfatidilholin (lecitin) i fosfatidiletanolamin su glavne fosfolipidne komponente prisutne u gljivama. Približno 70% ukupnih sterola u gljivama se nalazi u formi ergosterola (provitamina D₂-ergokalciferola), koji se pod dejstvom UV zračenja konvertuje u aktivni vitamin D₂ (Breene, 1990; Kalač, 2009).

Gljive predstavljaju i odličan izvor vitamina i minerala. Od vitamina prisutni su tiamin - B₁, riboflavin - B₂, nijacin - B₃, biotin - vitamin H i askorbinska kiselina - vitamin C (Breene, 1990). Sadržaj minerala (pepela) u gljivama je oko 5–12% računato na suhu težinu. Dokazano je da gljive mogu da akumuliraju kalijum (K) i fosfor (P) i njihova koncentracija u plodonosnom telu je približno 20–40, odnosno 10–50 puta veća u odnosu na supstrat na kom rastu. Bioakumulacija kalcijuma (Ca) i natrijuma (Na) nije zabeležena, dok je sadržaj magnezijuma (Mg) u plodonosnom telu nešto niži u odnosu na njegov sadržaj u supstratu (Kalač, 2009.) Ustanovljeno je da sadržaj minerala u gljivama opada prema sledećem redosledu: Mg > Fe > Zn > Mn > Cu > Ni > Cr > Co > Cd > Pb (Ouzouni et al., 2009).

Gljive akumuliraju i različite sekundarne metabolite poput fenolnih jedinjenja (kod većine vrsta najdominantnija grupa su flavonoidi), terpena, steroida, poliketida i drugih, koji se relativno lako mogu ekstrahovati. Njihov sadržaj varira u zavisnosti od ekoloških faktora, kao što su lokacija i izloženost određenim uslovima pri razvoju, kao i samog stadijuma razvoja. Brojna istraživanja pokazuju da antioksidativna svojstva gljiva zavise od vrste i koncentracije fenolnih jedinjenja (Das i Pereira, 1990; Mau et al., 2002; Wang i Zhang, 2003; Karaman et al., 2010).

Zahvaljujući svom sastavu, gljive se danas smatraju funkcionalnom hranom i izvorom biološki aktivnih komponenti (Wasser i Weis, 1999). Dokazano je da poseduju nefro- i hepatoprotektivna svojstva, smanjuju rizik nastanka kancera, stimulišu rad i aktivnost imunog sistema, redukuju inflamatorne procese, suzbijaju alergije, pomažu balansiranju nivoa šećera i holesterola u krvi, vrše detoksifikaciju organizma i inhibiraju rast različitih mikroorganizama (Chu et al., 2002; Wasser, 2010).

2.1.2. Odabrane vrste gljiva

Na osnovu brojnih istraživanja koja pokazuju da ekstrakti izolovani iz gljiva iz razdela Basidiomycota ispoljavaju značajna biološka svojstva, u ovoj disertaciji su ispitivana antimikrobna i antioksidativna svojstva gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*. Pomenute gljive široko su rasprostranjene u šumama našeg podneblja. Bukovača osim medicinskog, ima veliki industrijski, ekonomski i značaj u bioremedijaciji.

2.1.2.1. *Coriolus versicolor*

Coriolus versicolor [*Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd, 1920] je gljiva čvrste i drvenaste strukture, zbog čega se ne primenjuje u ishrani, ali sadrži izuzetno važne biološki aktivne komponente. Poznata je i pod imenima *Trametes versicolor*, *Polyporus versicolor*, kao i „turkey tail” ili „ćuranov rep”, zbog činjenice da svojim oblikom i velikom raznolikošću boja podseća na rep divljih ćurki. U Kini se naziva još i Yun Zhi („Oblak” gljiva), a u Japanu *kawaratake* sa značenjem „gljiva pored obale reka” (Chu et al., 2002).

Prema savremenoj taksonomiji gljiva, ova vrsta se svrstava u sledeće taksonomske kategorije:

Kraljevstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Polyporales

Porodica: Polyporaceae

Rod: *Coriolus*

Vrsta: *Coriolus versicolor*

Površina šešira je prekrivena koncentričnim krugovima koji mogu biti raznih boja, od svetlih tonova žute i braon, preko tamnih nijansi crvene, braon, i plave, pa sve do crnih zona (slika 2.2). Šešir je lepezastog oblika čija debljina u proseku iznosi 0,1–0,3 cm, dok prečnik može znatno da varira od nekih 2 pa do 10 cm. Tokom rasta formirana plodonosna tela se postepeno međusobno preklapaju. Ova vrsta je široko rasprostranjena u prirodi i najčešće se sreće na panjevima ili oborenim stablima listopadnog drveća poput bukve i hrasta, a ponekad i na četinarima, kao saprofit. Može se naći i na živim stablima, kao parazit. Mahom se nalazi na severnoj hemisferi u Americi, Evropi i Aziji, gde raste tokom cele godine (Cui i Chisti, 2003). Gljiva *C. versicolor* svojim razvojem izaziva pojavu bele truleži drveta, egzoenzimima poput lakaza i različitih peroksidaza, razlaže lignin i celulozu do neorganskih komponenti. Pored toga, važna uloga ove gljive je i u bioremedijaciji.



Slika 2.2. Karpofori različitih boja gljive *Coriolus versicolor*

(http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor i
<http://www.rogersmushrooms.com/gallery>)

Potencijalna primena gljive *C. versicolor* u medicini dovela je do intenzivnog izučavanja njenih bioloških svojstava tokom prethodnih pet decenija, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* studijama. Ustanovljeno je da ekstrakti ove gljive deluju stimulatorno na opšti imunitet organizma i da utiču na aktiviranje T i B limfocita, monocita/makrofaga, ćelija koštane srži i ćelija prirodnih ubica (engl. natural killer cells, NK), kao i na proliferaciju i/ili stvaranje antitela i različitih citokina, kao što su interleukini IL-2 i IL-6, interferoni i faktori nekroze tumora (Chu et al., 2002).

Veliki broj istraživanja se bavio i antitumorskim svojstvima ove gljive. Dokazano je da ekstrakti gljive *C. versicolor* ispoljavaju selektivnu citotoksičnost ka određenim ćelijama tumora. Rast tumorskih ćelijskih linija, poput raka želuca, leukemije, raka pluća i limfoma je bio inhibiran pri koncentraciji ekstrakta od 1 mg ml^{-1} tokom 72 sata (Xu et al., 1999).

Značajno citotoksično dejstvo ekstrakta ove gljive pokazano je i na HL-60 leukemijskim ćelijskim linijama, kao i na ćelijskim linijama raka jetre i raka želuca (Yang et al., 1992). U *in vivo* eksperimentima na miševima je utvrđeno smanjenje veličine tumora, kao što su adenokarcinom pluća, rak jetre, fibrosarkom, melanom, rak debelog creva, rak dojke i leukemija nakon duže administracije ekstrakta gljive *C. versicolor* (Chu et al., 2002; Harhaji et al., 2008). Snažno antikancerogeno dejstvo ove gljive se ispoljava kroz suzbijanje ćelijske proliferacije, modulaciju gena, zaustavljenje ćelijskog ciklusa i indukciju apoptoze u različitim malignim ćelijskim linijama.

Istraživanja pokazuju da različite vrste ekstrakta ove gljive inhibiraju rast nekih mikroorganizama. Vodeni ekstrakt gljive *C. versicolor* deluje antimikrobno na *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* i *Aspergillus fumigatus* (Sakagami i Takeda, 1993; Chu et al., 2002). Ustanovljeno je i da *C. versicolor* pojačava dejstvo i produžava antibakterijski efekat antibiotika, kao i da povećava antibiotsku osetljivost nekih bakterija rezistentnih na konvencionalne antibiotike. Poznato je i anti-HIV (engl. human immunodeficiency virus, HIV) dejstvo ekstrakata *in vitro* (Collins i Ng, 1997).

Prema nekim istraživanjima, antitumorna, imunomodulatorska i imunoterapeutska aktivnost je pretežno uslovljena prisustvom polisaharida krestina (PSK), polisaharopeptida (PSP), kao i različitih terpena i polifenola (Chu et al., 2002; Harhaji et al., 2008; Wasser, 2010). Za PSP je utvrđeno da se sastoji iz $\beta(1\rightarrow3)$ -glukana koji se granaju na pozicijama 4' i 6', dok su peptidni delovi bogati asparaginskom i glutaminskom kiselinom (Chu et al., 2002). HPLC i GC analizama je dokazano da pored glukoze polisaharopeptid (PSP) sadrži i manozu, ksilozu, galaktozu, ramnozu i arabinozu. PSK se sastoji iz polisaharida, 34–35% (od toga 91–93% β -glukana) i proteina, 28–35%. Osim glukoze, u sastav ovog polisaharida, kao glavne monosaharidne komponente ulaze i fukoza, galaktoza, manozna i ksiloza (Cui i Chisti, 2003). PSP i PSK imaju molekulsku masu od približno 100 kDa.

U Japanu, PSK se prepisuje kao redovna terapija pacijentima obolelim od karcinoma, koja se primenjuje i tokom i nakon zračenja i hemoterapije, i predstavlja suplement koji je odobren od strane japanskog ministarstva zdravlja (Chu et al., 2002). Već dugi niz godina u zemljama Dalekog istoka, a u skorije vreme i u zemljama zapadnog sveta, na tržištu su dostupni razni komercijalni preparati na bazi ove gljive koji se primenjuju za tretiranje različitih zdravstvenih problema.

2.1.2.2. *Pleurotus ostreatus*

Rod *Pleurotus* obuhvata preko 50 jestivih i medicinski značajnih vrsta gljiva rasprostranjenih u raznim klimatskim područjima širom sveta. Njihovo plodonosno telo je bogato ugljenim hidratima (28–50% suve mase gljive), dijetetskim vlaknima (3–50% suve mase), proteinima (15–35% suve mase), vitaminima (A, B, C, D), mineralima (K, P, Mg, Na, Fe, Zn) i lipidima (3–5% suve mase) (Gunde-Cimerman i Cimerman, 1995; Stamets, 2000). Vrste kao što su *P. ostreatus*, *P. eryngii* i *P. cornucopiae* imaju veliki industrijski i ekonomski značaj. U okviru ovog roda nalaze se i vrste sa karpoforima izrazito jarkih boja, poput *P. cornucopiae* (žuta), *P. salmoneostramineus* (ružičast) i *P. florida* (bela).

Pleurotus ostreatus (Jacq. ex. Fr.) Kumm. (1871), bukovača, spada u jestive kosmopolitske gljive, raste širom sveta i sreće se u skoro svim klimatskim zonama. Poznata je i pod imenom „oyster mushroom” ili „šumska ostriga”, zbog činjenice da njen šešir izgledom podseća na školjku istog imena. S obzirom da se ime bukovača primenjuje i za druge vrste iz roda *Pleurotus*, za *P. ostreatus* se u literaturi sreću i nazivi poput drvena bukovača, gljiva slame ili Hiratake („ravna gljiva” na japanskom) (Stamets, 2000).

Prema savremenoj taksonomiji gljiva, ova vrsta se svrstava u sledeće taksonomske kategorije:

Kraljevstvo: Fungi

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Agaricales

Porodica: Pleurotaceae

Rod: *Pleurotus*

Vrsta: *Pleurotus ostreatus*

Boja šešira ove vrste varira u zavisnosti od soja, svetlosti i temperature, i može biti bele, tamno do svetlo sive ili braon do krem nijanse (Kim et al., 2009), slika 2.3a,b. Prečnik šešira je u proseku 5–25 cm, lepezast i ulegnut do drške. U prirodi najčešće raste u grupama odnosno grozdovima na panjevima, oborenim stablima ili granama listopadnog drveća, kao što su bukva, divlji kesten, brest, vrba, a ponekad se može naći i na četinarima, kao saprofit. *P. ostreatus* ne napada zdravo drvo, već raste na bolesnim ili oštećenim stablima, kao poluparazit (slika 2.3c). Javlja se u jesen, od kraja septembra do jačih mrazeva, a može se naći i u proleće posle blagih zima. Svojim razvojem i produkcijom egzoenzima izaziva pojavu bele truleži drveta (razlaže lignin i celulozu). Osim u prirodi, uspešno se gaji na slami i drugim celuloznim ostacima (tzv. „biljnom otpadu”) pri čemu učestvuje u recikliranju otpadnog materijala poljoprivredne proizvodnje i smanjenju zagađenja životne sredine (Guillamón et al., 2010; Patel et al., 2012), slika 2.3d. Za ovu vrstu je ustanovljeno da je jedna od retkih gljiva karnivora. Naime, hife u prisustvu nematoda luče nematotoksin nazvan „ostreatin” koji u roku od par minuta imobilizuje domaćina, kog potom kolonizuju i lagano vare. Smatra se da na ovaj način gljiva zadovoljava potrebe za azotom (Barron i Thorn, 1987).



Slika 2.3. Gljiva *Pleurotus ostreatus*

a i b – karpofori različitih boja, c – rast na drvetu i d – rast na supstratu

(http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_ostreatus.html,
http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html i
http://www.rysch.com/pilze/Pleurotus_ostreatus.htm)

Osim velikog komercijalnog i ekonomskog značaja, *P. ostreatus* ispoljava i brojna medicinska svojstva, kao što su antioksidativna aktivnost, imunomodulatorski efekat, antitumorna i antimikrobna aktivnost, antiinflamatorni potencijal, kao i mogućnost smanjenja holesterola u krvi (Gunde-Cimerman i Cimerman, 1995; Wang et al., 2000; Hearst et al., 2009; Alves et al., 2012; Patel et al., 2012).

Na osnovu ranijih istraživanja, utvrđeno je da *P. ostreatus* proizvodi lovastatin, agens za snižavanje holesterola iz statinske klase lekova koji je 1987. godine odobren od strane američke agencije za hranu i lekove (FDA).

Lovastatin je kompetitivni inhibitor 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A reduktaze (HMG-CoA reduktaza) sa 20 000 puta većim afinitetom za vezivanje za supstrat (HMG). Kao posledica vezivanja lovastatina onemogućava se sinteza holesterola u jetri i smanjuje se nivo LDL-a (engl. low density lipoprotein, LDL) (Gunde-Cimerman i Cimerman, 1995). Nivo lovastatina je viši u šeširu u odnosu na dršku.

Ustanovljeno je i da različite vrste ekstrakta ove gljive inhibiraju rast pojedinih mikroorganizama. Vodeni ekstrakt *P. ostreatus* inhibirao je rast *B. cereus*, *B. subtilis* i *Pseudomonas* sp. (Hearst et al., 2009), dok je etanolni ekstrakt delovao antibakterijski na *Sarcina lutea* (Alves et al., 2012). Metanolni ekstrakti su delovali inhibitorno na vrste iz roda *Bacillus* (Akyuz et al., 2010; Karaman et al., 2010; Patel et al., 2012), *S. aureus* (Akyuz et al., 2010; Patel et al., 2012), *Clostridium perfringens* (Venturini et al., 2008), *E. coli*, *K. pneumoniae* i *C. albicans* (Patel et al., 2012). Poznato je i anti-HIV dejstvo ribonukleaza izolovanih iz gljive *P. ostreatus* koje vrše razgradnju genetskog materijala virusne čestice (Patel et al., 2012).

U *in vivo* eksperimentima na miševima je utvrđeno da proteinske frakcije izolovane iz gljive *P. ostreatus* značajno smanjuju veličinu tumora, kao što su limfom, melanom i sarkom S-180 pri koncentraciji od 10 mg ml⁻¹. Citotoksično dejstvo ekstrakata ove gljive, koje se pripisuje prisustvu većih koncentracija flavonoida, je ustanovljeno *in vitro* na HL-60 leukemijskim ćelijskim linijama (Patel et al., 2012). Značajna redukcija veličine tumora primećena je kod miševa, sa sarkomom S-180 i malignim tumorom jetre – hepatomom H-22, tretiranih glikoptroteinom – lektinom izolovanim iz gljive *P. ostreatus* (Wang et al., 2000).

Biološka aktivnost gljive *P. ostreatus* je pretežno uslovljena prisustvom polisaharida, poput pleurana (β -1,3-D-glukan), lipopolisaharida, proteina i peptida, glikoproteina - lektina i triterpena (Patel et al., 2012).

2.2. Antimikrobna dejstva

Jedno od najznačajnijih otkrića prošlog veka je svakako otkriće antibiotika – penicilina 1928. godine, koje se pripisuje škotskom bakteriologu Aleksandru Flemingu. Do njegove primene većina vojnika koja je umirala tokom rata nije bivala direktno ubijena metkom ili eksplozivom, već je umirala od bakterijskih infekcija na ranama prouzrokovanim tim oružjem. Prvi penicilini su u široku kliničku upotrebu ušli tek krajem Drugog svetskog rata spasivši milione života. O njegovom ogromnom značaju možda najbolje svedoči krilatica nastala u tom periodu „Zahvaljujući penicilinu... vratićemo se kući!” (Hancock, 2007).

Međutim, poslednjih godina javlja se problem sve veće rezistencije mikroorganizama na postojeće antibiotike. Pojam antimikrobna rezistencija podrazumeva otpornost mikroorganizama na antimikrobni lek koji je u početku bio uspešan u tretmanu infekcija koje taj mikroorganizam izaziva, ali je sa vremenom postao neefikasan. Uveden je i termin „superbakterija” koji opisuje organizam otporan na većinu ili na sve raspoložive antibiotike (Wright, 2000; Hancock, 2007). U izveštaju Svetske zdravstvene organizacije (SZO) iz 2014. godine se navode nove zabeležene i sve učestalije već postojeće rezistencije – neuspešnost tretmana treće generacije cefalosporina na *Neisseria gonorrhoeae* je potvrđena u nekoliko zemalja, rezistentnost na ovaj antibiotik uočena je i kod *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*, kod vrsta iz roda *Shigella* i *Salmonella* (ne tifoidna) je zabeležena rezistencija na fluorohinolone, a beleži se i sve veći broj infekcija (preko 100 000 godišnje) izazvanih meticilin rezistentnim *Staphylococcus aureus* (MRSA) (WHO, 2014). S druge strane, u poslednjih dvadesetak godina primetan je zastoj u razvoju novih klasa antibiotika. Sa izuzetkom daptomicina i linezolida (antibiotika uskog spektra dejstva na MRSA) još od 1963. godine, kada je odobren hinolon – nalidiksinska kiselina, nije razvijena i uvedena u humanu medicinu nova klasa antibiotika (Hancock, 2007).

Zbog svega navedenog stalno se ispituju nove antimikrobne supstance koje mogu da se izoluju, ne samo iz mikroorganizama, već i iz različitih prirodnih izvora, kao što su lekovite biljke, gljive, morske alge. Usled obnovljenog interesa za tradicionalnu medicinu, sve veći broj istraživanja je usmeren ka pronalaženju antimikrobnih lekova iz gljiva.

2.2.1. Antimikrobna svojstva gljiva

Istraživanja pokazuju da gljive predstavljaju vrlo potentan izvor prirodnih antimikrobnih supstanci. Neki od najznačajnijih antibiotika poput penicilina, cefalosporina, fusafungina (za lečenje infekcija gornjih disajnih puteva) i nigrosporina (anti-mikobakterijski agens) su izolovani iz gljiva (Hamann, 1994; Wang et al., 2013).

Gljive iz razdela Bazidiomikota se u tradicionalnoj medicini Kine koriste već hiljadama godina, međutim sa istraživanjima o njihovim biološkim svojstvima počelo se tek sredinom prošlog veka, prvenstveno u Japanu, Kini, Koreji i Americi (Wasser i Weis, 1999). Prvo ispitivanje o mogućnosti korišćenja bazidiomiceta kao izvora antibiotika sprovedli su Anhel, Harvej i Vilkins 1941. godine, testirajući ekstrakte iz plodonosnih tela i micelijuma preko 2000 vrsta gljiva (Yamaç i Bilgili, 2006). Tom prilikom uspešno su izolovali i identifikovali diterpen - pleuromutilin, koji je kasnije poslužio za razvoj prvog komercijalnog antibiotika poreklom iz bazidiomiceta. Retapamulin je prvi pleuromutilin koji je 2007. godine dobio dozvolu za primenu kod ljudi, pre toga su tiamulin (1979. god.) i valnemulin (1999. god.) odobreni za upotrebu u veterini (Novak i Shlaes, 2010). U velikom istraživanju, koje je obuhvatilo 317 različitih sojeva svrstanih u 204 vrste i 17 redova bazidiomiceta sakupljenih sa lokaliteta u Španiji, je pokazano da 45% od ukupno testiranih izolata inhibira rast velikog broja mikroorganizama. Ustanovljeno je i bolje antibakterijsko nego antifungalno dejstvo metanolnih ekstrakata gljiva (Suay et al., 2000). Na osnovu slične studije sprovedene u Brazilu, značajno antimikrobno dejstvo etil-acetatnih ekstrakata, na jedan ili više mikroorganizama, ustanovljeno je za 15 od 103 testirana soja gljiva - 84 vrste (Rosa et al., 2003). Od toga 2 soja su delovala i na bakterije i na kvasce, 8 je bilo aktivno samo prema bakterijama, a 3 su ispoljila samo antifungalno delovanje.

Vrste iz roda *Marasmius* su poznate po svojim sekundarnim metabolitima koji ispoljavaju brojna biološka svojstva. Metabolit skorodonin izolovan iz gljive *M. scorodonius* inhibira rast bakterija, kvasaca i filamentoznih gljiva (Anke et al., 1980). Marasminska kiselina izolovana iz gljive *M. conigenus*, za koju je pretpostavljeno da je α,β -nezasićeni keton, pokazala je značajno antibakterijsko i antifungalno delovanje pri niskim koncentracijama (Kavanagh et al., 1949).

Iz gljive *M. alliaceus* izolovana su dva metabolita nazvana aliakol A i B, po strukturi α,β -nezasićeni seskviterpen laktoni sa antimikrobnim i citotoksičnim svojstvima (Anke et al., 1981).

Iz gljive *Pseudoplectania nigrella* je po prvi put izolovan katjonski antimikrobni peptid (defensin) – plektazin, koji je u *in vitro* uslovima inhibirao rast *Streptococcus pneumoniae* (uključujući i sojeve rezistentne na konvencionalne antibiotike) pri vrlo niskim koncentracijama. Defensini su peptidi male molekulske mase bogati cisteinom koji ispoljavaju antibakterijsko, antifungalno i antiviralno dejstvo. U *in vivo* studiji, je pokazano da je plektazin, primenjen na miševima inficiranim *S. pneumoniae*, efikasan i netoksičan antibakterijski agens koji ispoljava jednaku aktivnost kao i penicilin i vankomicin (Mygind et al., 2005).

Izraženo antibakterijsko delovanje na Gram pozitivne bakterije ustanovljeno je za koriolin, seskviterpen izolovan iz gljive *Trametes* spp. (Chu et al., 2002), koprinol dobijen iz *Coprinus* spp. (Johansson et al., 2001), kao i za antibiotik psaliotin ekstrahovan iz gljive *Agaricus xanthodermus* (Rosa et al., 2003).

Dve vrste iz roda *Oudemansiella* (*O. mucida* i *O. radicata*) proizvode metabolite označene kao strobilurin i udemansin, za koje je utvrđeno da ispoljavaju antifungalno dejstvo pri izrazito niskim koncentracijama, dok na bakterije ne deluju (Rosa et al., 2003). Iz gljive *Pycnoporus sanguineus* je izolovan antibiotik poliporin, još davne 1946. godine, koji inhibira rast kako Gram pozitivnih tako i Gram negativnih bakterija, i koji ne ispoljava toksično dejstvo u eksperimentalnim životinjama (Böse, 1946). Iz iste gljive je dobijen i antibiotik cinabarin na čije dejstvo su bili osetljivi *B. cereus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. aureus* i *Streptococcus* spp. (Rosa et al., 2003). Gljiva *Ganoderma pfeifferi* proizvodi hidrohinone nazvane ganomicin A i B koji imaju sposobnost da inhibiraju rast meticilin rezistentne bakterije *S. aureus* (Mothana et al., 2000). Lekovi nebularin (izolovan iz gljive *Clitocybe nebularis*), laktaroviolin (*Lactarius deliciosus*) i klitocibin (*Leucopaxillus* spp.) inhibiraju rast uzročnika tuberkuloze, *Mycobacterium tuberculosis* (Waksman, 1950).

Novija ispitivanja ekstrakata gljiva dobijenih različitim postupcima i rastvaračima pokazuju njihovu značajnu antimikrobnu aktivnost (Akyuz et al., 2010; Karaman et al., 2010; Alves et al., 2012). Više od 75% ispitanih bazidiomiceta pokazuje antimikrobnu aktivnost, inhibirajući pretežno rast Gram pozitivnih bakterija. Metanolni ekstrakt gljive *Agaricus bisporus* je inhibirao rast Gram pozitivne bakterije *B. subtilis* pri koncentraciji od $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ što predstavlja dva i po puta nižu koncentraciju u odnosu na antibiotik ampicilin ($\text{MIC} = 12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Ustanovljene MIC vrednosti za metanolni ekstrakt *A. silicola* prema *B. cereus* i *S. aureus* su iznosile $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ i bile su niže u odnosu na ampicilin ($\text{MIC} = 6,25 \mu\text{g ml}^{-1}$). Značajna antimikrobna aktivnost je utvrđena i za metanolne ekstrakte gljiva *Boletus edulis*, *Leucopaxillus giganteus*, *Lepista nuda*, *Cantharellus cibarius* i *Lactarius* sp. prema *S. aureus*. Vodeni ekstrakt gljive *Ganoderma lucidum*, jedne od najznačajnijih medicinskih gljiva, je inhibirao rast 15 različitih Gram pozitivnih bakterija, a najniža minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) je ustanovljena prema *Micrococcus luteus*. Meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA) je bio inhibiran dejstvom ekstrakata gljiva *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus* i *Pleurotus ostreatus* (Alves et al., 2012).

Na osnovu literaturnih podataka, utvrđeno je da različiti ekstrakti gljiva ispoljavaju slabije antimikrobno dejstvo ka Gram negativnim bakterijama. Vodeni ekstrakt gljive *L. edodes* je inhibirao rast *Pseudomonas* sp., a ustanovljena zona inhibicije je bila značajno veća u odnosu na antibiotik ciprofloksacin. *Cordyceps sinensis* je ispoljio antimikrobno dejstvo prema *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* i *Salmonella* ser. Typhi. Generalno, kao najosetljivije bakterije na dejstvo ekstrakata gljiva *A. bisporus*, *G. lucidum*, *L. nuda* i *L. edodes* su se pokazale *E. coli* i *K. pneumoniae* (Alves et al., 2012).

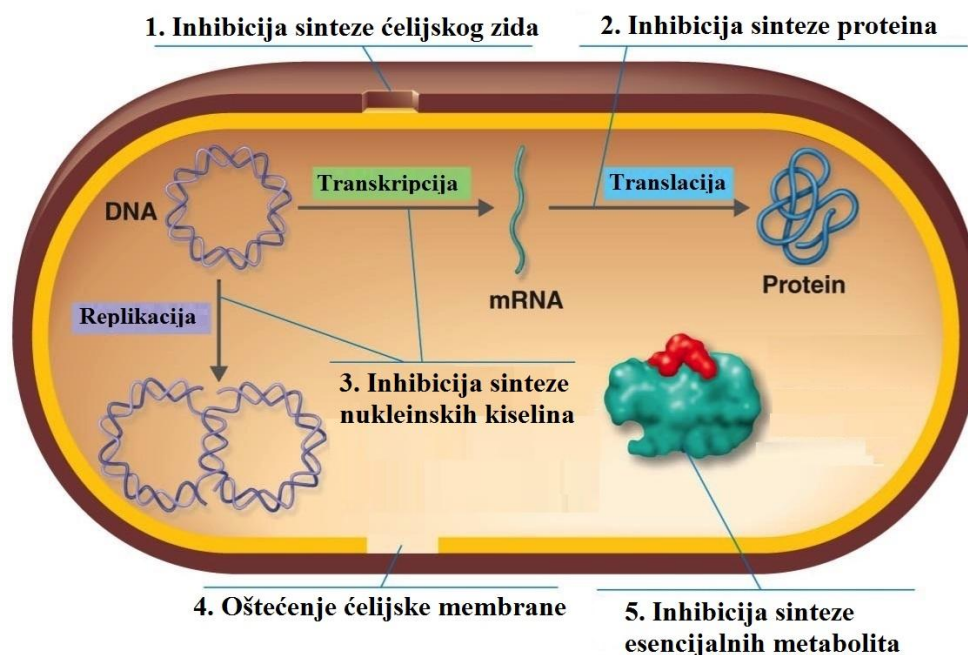
Identifikovane nisko molekularne komponente ekstrakata za koje je dokazano antimikrobno dejstvo su pretežno sekundarni metaboliti, poput seskviterpena i drugih terpena, steroida, antrakvinona, derivata benzoeve kiseline i kvinolina, ali i primarni metaboliti kao što je oksalna kiselina. Od visoko molekularnih jedinjenja sa sposobnošću inhibicije mikroorganizama izdvajaju se peptidi i proteini (Alves et al., 2012).

Antimikrobna svojstva ekstrakata gljiva su dokazana i u različitim prehrambenim proizvodima. Rast bakterije *S. aureus*, koja je prethodno inokulisana (10^6 cfu ml⁻¹) u pileću supu, je bio inhibiran delovanjem metanolnog ekstrakta gljive *Tirmania pinoyi*. Procenat inhibicije od preko 96% kako na temperaturi frižidera (4 °C) tako i na sobnoj temperaturi (25 °C) postignut je pri koncentraciji ekstrakta od 5 mg ml⁻¹ (Stojković et al., 2013). Etanolni ekstrakti gljiva *A. bisporus* i *Agaricus brasiliensis* ispoljili su antibakterijsko dejstvo na *Listeria monocytogenes* inokulisanu u jogurt (Stojković et al., 2014), dok je metanolni ekstrakt *Agaricus bohusii* inhibirao rast *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* u krem siru (Reis et al., 2012b). Rast *Aspergillus flavus*, koji je prethodno inokulisan u paradajz sos, u potpunosti je bio inhibiran dejstvom metanolnog ekstrakta gljive *Laetiporus sulphureus* (Petrović et al., 2013). Ekstrakti gljiva upotrebljeni kao konzervansi u prehrambenim proizvodima bi osim dokazanog antimikrobnog dejstva mogli da doprinesu i senzornim karakteristikama namirnica zahvaljujući svom specifičnom ukusu. Takođe, manja je verovatnoća da će mikroorganizmi razviti rezistenciju na dejstvo ekstrakata gljiva s obzirom da oni predstavljaju smešu različitih komponenti.

Gljive sintetišu antimikrobna jedinjenja kako bi mogle da se zaštite i prežive u svojoj prirodnoj sredini. Nastali metaboliti se određenim postupcima mogu izolovati iz različitih gljiva i koristiti za potrebe ljudi. Ako se pravilno primenjuju u ishrani, gljive nemaju štetni efekat po ljudski organizam, pa mogu da budu dragoceni izvori antibiotika.

2.2.2. Mehanizmi antimikrobnog delovanja

Antimikrobni agensi deluju na različita ciljna mesta u ćelijama mikroorganizama i njihovi potencijalni mehanizmi su: inhibicija sinteze ćelijskog zida bakterija, oštećenje ćelijske membrane, inhibicija sinteze proteina i sinteze nukleinskih kiselina, slika 2.4 (Alves et al., 2012). Transport, osmoregulacija, procesi respiracije, biosinteza i povezivanje peptidoglikana su funkcije regulisane citoplazmatičnom membranom. U slučaju narušavanja funkcionalnog integriteta ćelijske membrane dolazi do izlivanja sadržaja iz bakterija, izlaska makromolekula i jona što dovodi do smrti ćelije (Hartmann et al., 2010).



Slika 2.4. Mehanizam dejstva antimikrobnih agenasa

(<http://www.cram.com/flashcards/microbiology-antimicrobial-drugs-chapter-20>)

Komponente ekstrakata gljiva za koje je dokazano antimikrobno dejstvo su fenolna jedinjenja, seskviterpeni i drugi terpeni, steroidi, antrakvinoni, derivati benzoeve kiseline, i kvinolini, zatim peptidi i proteini (Alves et al., 2012).

Za fenole i fenolne kiseline je poznato da položaj i broj hidroksilnih grupa određuje njihov toksičan efekat na patogene mikroorganizme (Cowan, 1999; Alves et al., 2013), dok se mehanizam dejstva ogleda u povećanoj propustljivosti jona kroz membranu, kao i u inhibiciji sinteze proteina. Kvinoni se ireverzibilno vezuju za aminokiseline čije grupe imaju nukleofilni karakter (poput tiolne grupe cisteina) i pretpostavlja se da reaguju sa polipeptidima ćelijskog zida, adhezinama na površini bakterijske ćelije (proteinski adhezini su najčešće prisutni u obliku fimbrija) ili sa enzimima vezanim za ćelijsku membranu (Cowan, 1999). Antimikrobna aktivnost flavonoida se pripisuje njihovoj sposobnosti vezivanja za proteine i ćelijski zid bakterija, dok lipofilniji flavonoidi mogu oštetiti i citoplazmatičnu membranu (Tsuchiya et al., 1996). Nakayama et al. (2013) su primenom TEM analiza utvrdili da se katehin (flavonoid) vezuje za spoljašnju membranu Gram-negativne bakterije *E.coli*.

Kao mogući mehanizam, autori navode interakciju katehina sa aminokiselinama lokalizovanim na unutrašnjem zidu pore čime inhibiraju funkciju porina (zaduženih za transport malih hidrofilnih molekula) i sprečavaju apsorpciju hranljivih sastojaka poput glukoze. Za lipofilne komponente terpena i njihovih derivata (alkohola) je poznato da mogu da destruktuiraju ćelijski zid bakterija (Cowan, 1999). Antimikrobni peptidi (AMP) ispoljavaju toksični efekat na bakterije na više načina: formiranjem jonskih kanala u ćelijskoj membrani, selektivnim oštećenjem ćelijske membrane, aktiviranjem molekula koji učestvuju u procesima autolize, kao i inhibiranjem sinteze proteina i nukleinskih kiselina (Reddy et al., 2004).

2.3. Oksidativni stres i reaktivne hemijske vrste

Oksidativni stres predstavlja stanje u kome postoji neravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i njihovog neutralisanja mehanizmima antioksidativne zaštite organizma. Posledice povećanog oksidativnog stresa se dovode u vezu sa nastankom velikog broja akutnih i hroničnih oboljenja kao što su ateroskleroza, karcinom, starenje, dijabetes melitus, neurodegenerativna i kardiovaskularna oboljenja (Jovanović, 2011). Jedna od najprihvaćenijih teorija starenja koju je postavio Harman (1955) jeste teorija „slobodnih radikala” koja podrazumeva akumulaciju oksidativno oštećenih biomolekula sa starenjem, što postepeno narušava ravnotežu između prooksidanasa i antioksidanasa u korist prvih i dovodi do oksidativnog stresa.

Slobodni radikali (RS) su atomi, molekuli ili joni koji sadrže makar jedan nesparen elektron i ispoljavaju veliki stepen reaktivnosti zbog tendencije da postignu elektronsku stabilnost. Štetno delovanje slobodnih radikala potiče iz potrebe za sparivanjem elektrona i zato reaguju sa prvim susednim molekulom (lipidi, proteini, DNK) kome oduzimaju elektron i tako započinju lančanu reakciju koja rezultira strukturnim, biohemijskim i funkcionalnim promenama biomolekula (Rimbach et al., 1999).

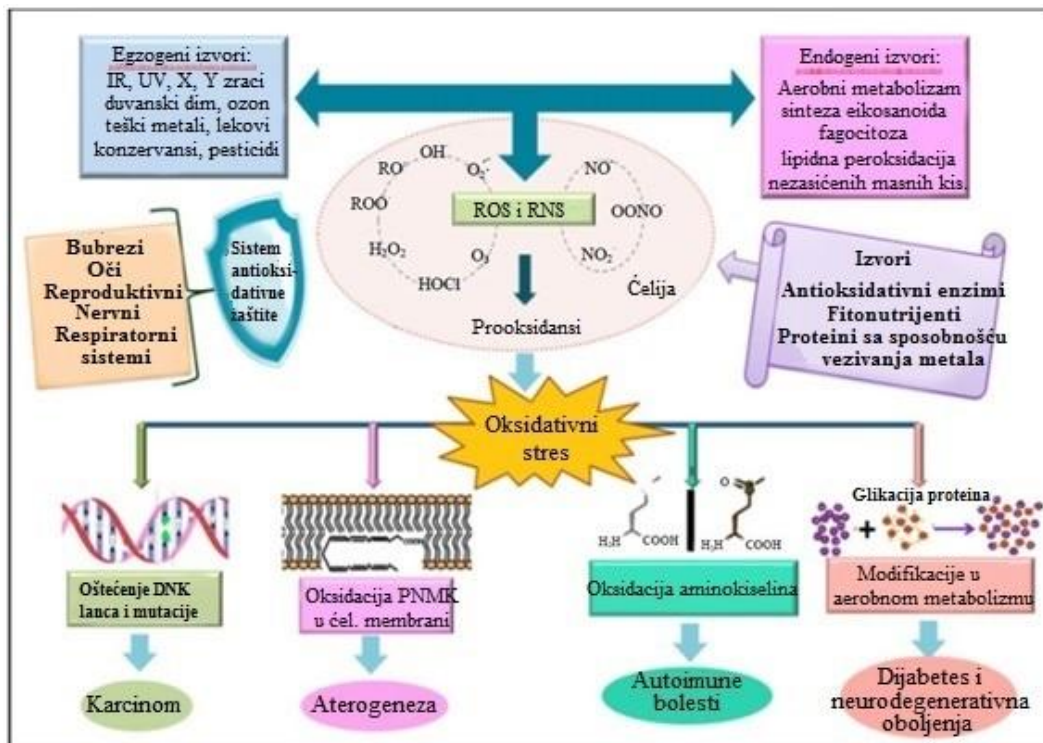
Tokom evolucije, uporedo sa prilagođavanjem na aerobne uslove života i sa stvaranjem slobodnih radikala u organizmu se razvijaju i kompleksni zaštitni antioksidativni sistemi odbrane (engl. antioxidative system, AOS). Ovim mehanizmima, koji se mogu podeliti na enzimsku (superoksid-dismutaza, glutation-peroksidaza, katalaza itd.) i neenzimsku (vitamin C i E, polifenoli, α -tokoferol, L-askorbinska kiselina, peptidi sa SH grupama - glutation, jedinjenja sa selenom i druga jedinjenja) antioksidativnu zaštitu, organizam se štiti od nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala i održava ih u niskim koncentracijama (Battin i Brumaghim, 2009). Ova jedinjenja deluju zaštitno ili reparativno i svoju aktivnost ispoljavaju putem hvatanja slobodnih radikala, doniranjem protona, heliranjem jona prelaznih metala i drugo.

Oksidacija supstrata u ciklusu trikarbonskih kiselina i transport elektrona respiratornim lancem uz oksidativnu fosforilaciju se odvija u mitohondrijama i predstavlja zajednički metabolički put kojim se iz biomolekula (ugljenih hidrata, proteina i masti) dobija energija u vidu ATP-a. Najveća mogućnost nastajanja slobodnih radikala je upravo u mitohondrijama, s obzirom da se proces ćelijskog disanja odvija u njima. Naime, glavni akceptor elektrona je molekularni kiseonik, koji se u približno 95–99% redukuje do vode uz vezivanje 4 elektrona, dok 1–5% elektrona „iscuri” sa respiratornog lanca i delimičnom redukcijom se transformiše u reaktivne vrste kiseonika. Jednoelektronskom redukcijom nastaje toksični superoksid anjon radikal - $O_2^{\cdot-}$, dvoelektronskom vodonik-peroksid - H_2O_2 , a troelektronskom hidroksil radikal - OH^{\cdot} (Scandalios, 2005).

Nastali $O_2^{\cdot-}$ se pod dejstvom superoksid-dismutaze prevodi u H_2O_2 , koji se dalje razlaže na O_2 i H_2O aktivnošću enzima glutation-peroksidaze ili katalaze (Nohl et al., 2003). Prisustvo slobodnih prelaznih metala, poput gvožđa i bakra, u znatnoj meri može da doprinese povećanju oksidativnog stresa bez obzira na prisustvo antioksidativnih enzima.

Osim u procesima oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, slobodni radikali se kontinuirano stvaraju u malim količinama i u procesima lipidne peroksidacije (LPO) nezasićenih masnih kiselina, sinteze eikosanoida, fagocitoze, a nastaju i kao proizvodi enzimskih reakcija koje katalizuju oksidaze i u oksido-redukcionim procesima u prisustvu metala promenljive valence, slika 2.5 (Valko et al., 2007).

Osim endogenih, izvori slobodnih radikala mogu da budu i egzogeni poput ultraljubičastog zračenja, ozona (O_3), alkohola i duvanskog dima, teških metala (posebno živa, aluminijum i olovo), trans- i hidrogenizovanih masti, zatim konzervansi u hrani, pesticidi, lekovi za hemoterapiju i drugi, slika 2.5 (Battin i Brumaghim, 2009; Lobo et al., 2010).



Slika 2.5. Šematski prikaz obrazovanja slobodnih radikala, oksidativnog stresa i patogeneze hroničnih oboljenja (Kalam et al., 2015)

Sa druge strane, slobodni radikali se u organizmu stalno stvaraju i dokazano je da pri niskim koncentracijama imaju važnu fiziološku funkciju. SR su uključeni u regulaciju ćelijske signalizacije (stimulišu aktiviranje gvanilat ciklaze i stvaranje cikličnog guanozin monofosfata – cGMP), imaju bitnu ulogu u kontroli respiratorne ventilacije, odbrani organizma od mikroorganizama, utiču na eritropoezu (stvaranje crvenih krvnih zrnaca – eritrocita), kao i na aktivaciju T-ćelija (Mittal i Murad, 1977; Roth i Dröge, 1987). U fiziološkim koncentracijama reaktivni oblici kiseonika učestvuju u regulaciji sinaptičke plastičnosti i memorije (Jovanović, 2011), dok azot(II)-oksid (NO) ima važnu ulogu u kontroli opuštanja glatkih mišića i sprečavanju adhezije (slepljivanja) trombocita (Radomski et al., 1987).

Reaktivne vrste. Nespareni elektroni u spoljašnjem elektronskom omotaču se mogu nalaziti na atomima različitih elemenata, te se shodno tome slobodni radikali mogu podeliti na: reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species, ROS), reaktivne vrste azota (engl. reactive nitrogen species, RNS), reaktivne vrste hlora (engl. reactive chlorine species, RCS), reaktivne vrste broma (engl. reactive bromine species, RBS) i reaktivne vrste sumpora (engl. reactive sulfur species, RSS) (Halliwell, 2006).

Po hemijskoj strukturi reaktivne vrste mogu biti molekuli, poput vodonik peroksida, zatim joni (npr. nitroksil anjon) kao i slobodni radikali, tabela 2.1.

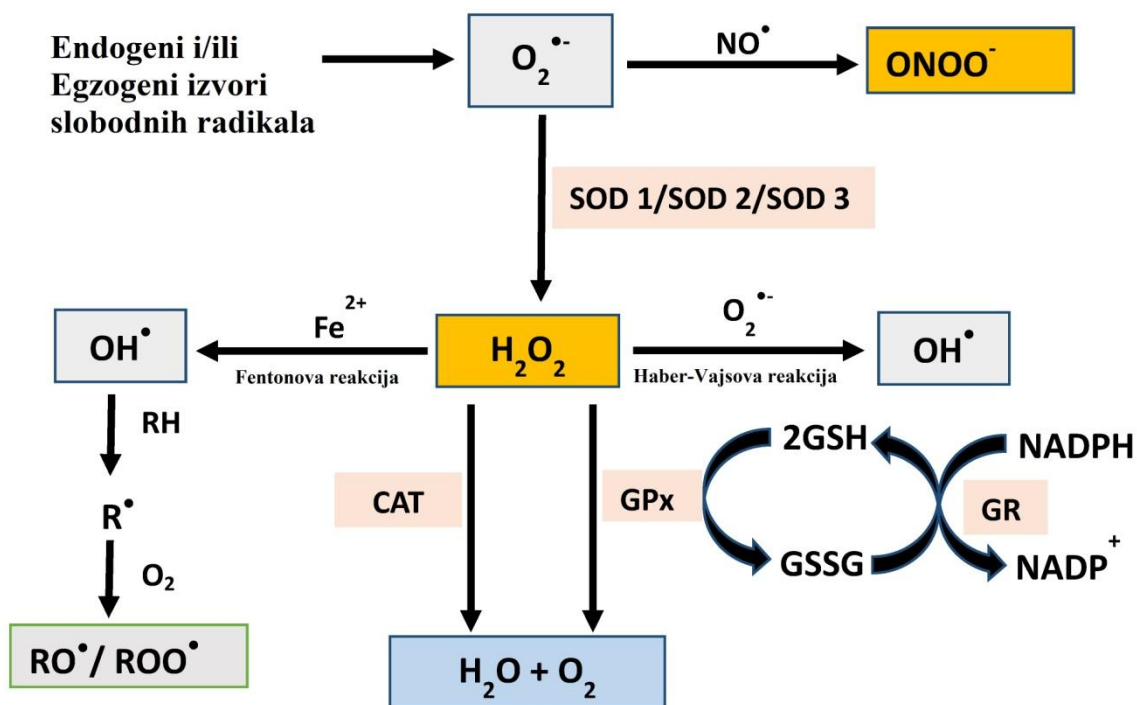
Tabela 2.1. Podela reaktivnih vrsta (slobodnih radikala)

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Reaktivne vrste kiseonika (ROS)	
$O_2^{\cdot -}$ superoksid anjon radikal	H_2O_2 vodonik peroksid
OH^{\cdot} hidroksil radikal	HOCl hipohlorna kiselina
ROO^{\cdot} peroksil radikal	HOBr hipobromna kiselina
RO^{\cdot} alkoksil radikal	O_3 ozon
HOO^{\cdot} hidroperoksil radikal	1O_2 singletni kiseonik
Reaktivne vrste azota (RNS)	
NO^{\cdot} azot monoksid radikal	HNO_2 azotasta kiselina
NO_2^{\cdot} azot dioksid radikal	N_2O_4 azot(IV)-oksid
NO_3^{\cdot} nitratni radikal	N_2O_3 azot(III)-oksid
	NO^+ nitrozil katjon
	NO_2^+ nitronijum (nitril) katjon
	NO^- nitroksil anjon
	$ONOO^-$ peroksinitritni anjon
	ROONO alkil peroksinitrit
	RO ₂ ONO alkil peroksinitrat
	NO_2Cl nitril hlorid
Reaktivne vrste sumpora (RSS)	
RS^{\cdot} tiil radikal	
GS^{\cdot} glutatiil radikal	
$GSSG^{\cdot -}$ diglutatiil anjon radikal	

Slobodni radikali (ROS i RNS) su sposobni da naruše međumolekulske veze i da brzo i lako reaguju sa gotovo svim biomolekulima iz okruženja, lipidima, proteinima i DNK, što rezultira oštećenjem sveukupne ćelijske funkcije. Smatra se da reaktivne vrste kiseonika i azota imaju značajnu ulogu u nastanku preko 200 humanih bolesti (Štajn et al., 2007).

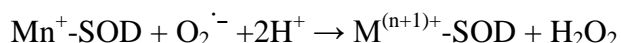
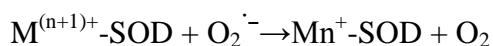
2.3.1. Enzimska antioksidativna zaštita

U enzimске komponente primarne antioksidativne zaštite (slika 2.6) spadaju superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px) i glutation-reduktaza (GR), dok se enzim glutation-S-transferaza, koji je ranije bio svrstan u ovu grupu, ubraja u enzime II faze biotransformacije (Van der Oost et al., 2003).



Slika 2.6. Obrazovanje reaktivnih vrsta i enzimске komponente sistema zaštite od oksidativnih oštećenja (Ajuwon et al., 2015). SOD, superoksid dismutaza; CAT, katalaza; GPx, glutation peroksidaza; GR, glutation reduktaza

Superoksid-dismutaza. Superoksid-dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) predstavlja prvu liniju odbrane od reaktivnih vrsta kiseonika i prisutna je u svim aerobnim i nekim anaerobnim organizmima. SOD katalizuje dismutaciju toksičnog superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) u vodonik-peroksid (H_2O_2) i molekularni kiseonik (O_2) prema jednačini (Bánfalvi, 2011):



gde je M oznaka za metal i to Cu (n=1); Mn (n=2); Fe (n=2); Ni (n=2).

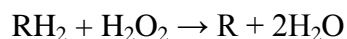
SOD je metaloprotein i tokom evolucije je nastalo više klasa enzima, što se povezuje sa dostupnošću različitih metala kroz različite geološke ere (Alscher et al., 2002). Na osnovu metala koji se nalazi u aktivnom centru enzima, opisane su sledeće izoforme SOD:

- 1) Superoksid-dismutaza koja sadrži bakar i cink, CuZnSOD – nalazi se u citosolu, hloroplastima, peroksizomima i glioksizomima (Cheng et al., 2012). U okviru svake subjedinice nalazi se po jedan atom redoks aktivnog metala Cu^{2+}/Cu^+ i jedan atom Zn^{2+} koji ima strukturnu ulogu. CuZnSOD je homodimer sa molekulskom masom od 32 kDa i prva je identifikovana izoforma čija je struktura opisana primenom kristalografskih analiza (Richardson et al., 1975). Izuzetno je stabilan enzim otporan na toplotu, delovanje proteinaza i denaturaciju različitim agensima (Halliwell i Gutteridge, 2015).
- 2) Superoksid-dismutaza koja sadrži mangan, MnSOD ili gvožđe, FeSOD – prisutne su kod prokariota, ali i u mitohondrijama i hloroplastima eukariota kao najčešće homodimerne ili ređe homotetramerne izoforme sa po jednim atomom Mn^{3+}/Mn^{2+} odnosno Fe^{3+}/Fe^{2+} po subjedinici (Alscher et al., 2002; Cheng et al., 2012). Ove dve izoforme strukturno su vrlo slične.
- 3) Superoksid-dismutaza koja sadrži nikel, NiSOD – prisutna je pretežno kod prokariota kao homoheksamer sa po jednim atomom redoks aktivnog metala Ni^{3+}/Ni^{2+} po subjedinici (Shearer, 2014).

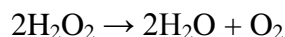
- 4) Ekstracelularna superoksid-dismutaza, ECSOD – je poslednja otkrivena izoforma ovog enzima i nalazi se samo kod sisara. U katalitičkom centru sadrži bakar i cink (Štajn et al., 2007).

Katalaza. Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) je homotetramer, molekulske mase od 240 kDa, koji u svakoj subjedinici sadrži hem grupu u aktivnom centru (Fe^{3+} vezan za porfirin) enzima (Scandalios, 2005). Osnovna uloga katalaze je redukcija H_2O_2 do vode i molekularnog kiseonika, a u zavisnosti od koncentracije supstrata odvijace se katalazni ili peroksidazni tip reakcije.

Pri niskim koncentracijama ($< 1 \mu\text{M}$) odvija se peroksidazni tip reakcije, odnosno H_2O_2 se redukuje uz pomoć različitih donora vodonika (alkohol, askorbinska kiselina):

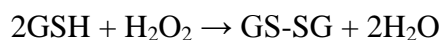


Pri visokim koncentracijama supstrata ($> 1 \mu\text{M}$) odvija se katalazni tip reakcije, odnosno, H_2O_2 je istovremeno i donor i akceptor vodonika:



Katalaza je prisutna kod većine aerobnih organizama, u eukariotskim ćelijama se pretežno nalazi u peroksisomima, a prisutna je i u citosolu i mitohondrijama, kao slobodna ili vezana za membranu (Scandalios, 2005). Zbog velike brzine reakcije zasićenje CAT supstratom je gotovo nemoguće i enzimaska aktivnost raste linearno sa porastom koncentracije H_2O_2 . Umereni pad aktivnosti enzima može biti prouzrokovan reverzibilnim vezivanjem azot monoksida za hem grupu, dok pod dejstvom UV zračenja CAT mnogih vrsta mogu proizvoditi reaktivne vrste kiseonika, ROS (Heck et al., 2003).

Glutation-peroksidaza. Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) katalizuje glutacion-zavisnu redukciju H_2O_2 do H_2O , kao i organskih hidroperoksida (ROOH) do odgovarajućih alkohola (ROH) pri čemu nastaje oksidovani glutacion (Barycki, 2008):



GSH-Px je pretežno prisutna kod eukariotskih organizama, dok se kod prokariota sreće samo u pojedinim vrstama (Halušková et al., 2009; Arenas et al., 2010). Nalazi se u citosolu, mitohondrijama, peroksizomima i intermembranskim prostorima. Glutation-peroksidaza ima veoma važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H₂O₂ jer ispoljava veći afinitet ka ovom supstratu u odnosu na katalazu, dok je u uslovima izrazitog oksidativnog stresa CAT značajniji enzim (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Opisane su tri izoforme ovog enzima (Brigelius-Flohé, 1999; Margis et al., 2008):

- 1) Selen zavisna glutacion-peroksidaza, Se GSH-Px – je homotetramer, molekulske mase od 21,5 kDa i sadrži po jedan atom Se u formi selenocisteina u svakoj subjedinici. Se GSH-Px katalizuje redukciju i H₂O₂ i organskih hidroperoksida.
- 2) Selen nezavisna glutacion-peroksidaza, non-Se GSH-Px – je monomer, molekulske mase od 22 kDa. Non-Se GSH-Px ispoljava manji afinitet ka H₂O₂, a efikasna je u redukciji organskih hidroperoksida i zahteva visoku koncentraciju glutaciona.
- 3) Fosfolipid hidroperoksid glutacion-peroksidaza, PH GSH-Px – je monomer sa selenocisteinom u aktivnom centru. PH GSH-Px je sposobna da redukuje H₂O₂, kao i fosfolipidne hidroperokside i perokside holesterola. Jedini je enzim koji redukuje membranske fosfolipidne hidroperokside i tako prekida proces lipidne peroksidacije, ističući svoju ključnu ulogu u ćelijskom sistemu zaštite od reaktivnih vrsta kiseonika, ROS (Andreyev et al., 2005). Takođe, učestvuje i u metabolizmu eikosanoida i redukuje hidroperokside holesterola i njegovih estara u lipoproteine male gustine (engl. low density lipoprotein, LDL).

Glutation-reduktaza. Glutation-reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) je homodimerni flavoprotein sa redoks aktivnim disulfidom u aktivnom centru. Svaka subjedinica GR sadrži po jednu prostetičku grupu flavin adenin dinukleotida (FAD). Glutation reduktaza katalizuje redukciju oksidovanog (GSSG) u redukovani glutacion (GSH) pri čemu kao redukujući kofaktor, odnosno donor protona služi nikotin adenin dinukleotid fosfat (NADPH):



Reakcija se odvija u dve faze, i to prvo NADPH redukuje FAD koji potom prenosi elektrone na disulfidne mostove i formiraju se SH grupe, a potom dolazi do redukcije GSSG u aktivnom centru do GSH, a unutar enzima se obnavljaju disulfidi (Tandogan i Ulusu, 2006). Enzim je prisutan kod prokariota, kao i u citosolu i mitohondrijama eukariotskih ćelija. Redukovani glutation (GSH) učestvuje u velikom broju enzimskih i neenzimskih reakcija, te je osnovna funkcija GR odžavanje redoks homeostaze u ćeliji.

2.4. Antioksidativna svojstva gljiva

Pod pojmom antioksidans se podrazumeva svaki molekul koji sprečava oksidaciju drugih molekula. Aktivnost antioksidanasa se ogleda u njihovoj sposobnosti da neutrališu slobodne radikale, predajući im elektron pri čemu se sami oksiduju. Na ovaj način se prekida slobodno-radikalna lančana reakcija i štite tkiva i ćelije od oksidativnih oštećenja. Antioksidans predajom elektrona, po definiciji, i sam postaje slobodni radikal, međutim zahvaljujući sposobnosti da se prilagodi promeni broja elektrona ne postaje reaktivan i kao takav ne predstavlja opasnost za ćelije (Carocho i Ferreira, 2013). Svi organizmi su razvili sisteme za odbranu od slobodnih radikala, koji mogu biti enzimske i/ili neenzimske prirode, ali koji neminovno slabe sa starenjem. Zbog toga je neophodno da se antioksidansi redovno unose i sa hranom. Brojna istraživanja i *in vivo* studije pokazuju da ishrana bogata voćem i povrćem, žitaricama, čajevima, prirodnim sokovima i vinima, obezbeđuje zaštitu od različitih bolesti. Istraživanje, na ovu temu, koje je privuklo najviše pažnje je poznato pod pojmom „francuski paradoks”, i odnosi se na činjenicu da Francuzi znatno ređe oboljevaju od kardiovaskularnih bolesti, a istovremeno konzumiraju značajne količine masnih sireva (koji su veoma bogati zasićenim mastima) i alkohola, posebno vina. Jedno od objašnjenja je uživanje u crvenim vinima koja su bogata antioksidansima poput polifenola (Renaud i de Lorgeril, 1992). Osim polifenolima, antioksidativna svojstva se pripisuju i polisaharidima (Ma et al., 2012), flavonoidima (Pietta, 2000), karotenoidima i mineralima – selenu i cinku (Carocho i Ferreira, 2013).

Novija istraživanja pokazuju da i gljive predstavljaju vrlo značajne izvore antioksidativnih komponenti. Mnoge jestive gljive, kao što su *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Hericium erinaceus* i *Volvariella volvacea* u *in vitro* uslovima pokazuju značajnu inhibiciju lipidne peroksidacije, kao i sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (Fu et al., 2002). Antioksidativna svojstva, poput inhibicije lipidne peroksidacije, sposobnosti heliranja jona gvožđa, redukcionne sposobnosti i sposobnosti hvatanja slobodnih hidroksilnih i DPPH radikala dokazana su i za medicinski važne gljive kao što su *Agaricus blazei*, *Grifola frondosa*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma tsugae* i *Coriolus versicolor* (Mau et al., 2002; Tsai et al., 2007; Kozarski et al., 2012; Ma et al., 2012; Klaus et al., 2015). Poznato je da gljive akumuliraju različite sekundarne metabolite, u koje spadaju fenoli, poliketidi, terpeni i steroidi (Cheung et al., 2003). Shodno tome, hemijski sastav ekstrakata gljiva (vrsta i koncentracija bioaktivnih komponenti), a samim tim i njihova biološka, odnosno antioksidativna svojstva zavise od izbora rastvarača i primenjenih postupaka ekstrakcije. Dokazano je da alkoholni (metanolni i etanolni) ekstrakti gljiva sadrže različite nisko molekularne komponente i da su bogata fenolnim jedinjenjima (Cheung i Cheung, 2005), dok vodeni ekstrakti sadrže različite polisaharide, fenolna jedinjenja i proteine. Brojna istraživanja dovode u vezu antioksidativna svojstva gljiva sa sadržajem ukupnih fenola u njihovim ekstraktima (Mau et al., 2002; Cheung et al., 2003; Cheung i Cheung, 2005; Wong i Chye, 2009). Dokazano je i da obogaćivanje gljiva mikronutrientima poput selena i cinka, doprinosi većem sadržaju fenola i flavonoida u ekstraktima i samim tim poboljšava njihova antioksidativna svojstva (Turlo et al., 2010; Bhatia et al., 2014; Gąsecka et al., 2016).

Sva dosadašnja istraživanja pokazuju da antioksidansi prisutni u gljivama predstavljaju veoma dobre protektivne agense, koji pri tom ne ispoljavaju neželjene sporedne efekte i samim tim mogu biti dobra zamena sintetičkim antioksidansima (butilovani hidrosianizol, BHA i butilovani hidroksitoluen, BHT) koji se primenjuju u prehrambenoj industriji iako je poznato da pod određenim uslovima mogu ispoljiti kancerogeno dejstvo.

2.5. Selen

Selen, metaloid VIa grupe i IV periode, je 1817 godine otkrio švedski naučnik Berzelijus i dao mu ime po boginji meseca - Seleni. Predstavlja esencijalni oligoelement neophodan za normalan metabolizam ćelija. Ulazi u sastav selenoproteina koji grade veliki broj enzima sa antioksidativnom funkcijom i ulogom u stvaranju hormona štitaste žlezde. Preporučeni dnevni unos selena iznosi 55 μg za žene i 70 μg za muškarce ili 0,87 $\mu\text{g kg}^{-1}$ telesne mase, dok je gornja granica sigurnog unosa 400 $\mu\text{g/dnevno}$ (IOM, 2000). U zemljinoj kori se nalazi u relativno malim količinama, najčešće u stenama, vulkanskom materijalu, morskom talogu i kao pratilac nekih ruda sumpora, a ređe u vidu neorganskih jedinjenja selenata i selenita. Selen se u organizam može uneti kroz lanac ishrane zemljište-biljke-životinje-čovjek što ukazuje da je od presudnog značaja upravo njegov oblik i sadržaj u zemljištu. U jednom od prvih istraživanja o zastupljenosti selena u Srbiji utvrđeno je da naše zemljište, kao i životne namirnice spadaju među selenom najsiromašnije u svetu. Prosečan dnevni unos selena u Srbiji je procenjen na 27 μg i to najvećim delom putem konzumiranja mesa i ribe, zatim mlečnih proizvoda i žitarica (Backović, 2005). U Kini je zabeležen najniži dnevni unos od 3–22 μg u oblasti Kešan, ali i najviši od 6,69 mg na dan. Poluživot selena u organizmu iznosi od 65 do 112 dana, pri čemu se prvo eliminiše iz tkiva jetre, a najduže se zadržava u mozgu. Gotovo svi oblici selena uneti u organizam se dobro resorbuju. Sav unet selenometionin se resorbuje u dvanaestopalačnom crevu, selenocistein i selenati se resorbuju aktivnim transportom, dok se seleniti resorbuju nešto slabije i to mehanizmom proste difuzije. Usvojivost selenida i elementarnog selena je veoma niska. Sa druge strane eliminacija iz organizma se ostvaruje najvećim delom kroz urin, ostatak fecesom, a u slučaju prekomernog unosa i znojenjem (isparljive forme – dimetilselenid).

Usvojivost selena od strane biljaka, kao važnih karika u lancu ishrane ovim elementom, zavisi od brojnih faktora poput kiselosti zemljišta (usvojivost je svega 10% od dostupnog Se pri $\text{pH} < 7,6$), redoks potencijala, prisustva organskih materija (ferohidroksidi i minerali glina mogu vezati selen i tako smanjiti količine Se dostupne biljkama), mikrobiološke aktivnosti, sastava zemljišta i drugih faktora (Johnson et al., 2000; Rayman, 2008).

Na osnovu sposobnosti akumulacije selena, biljke se dele na one bez sposobnosti usvajanja Se, zatim Se-indikatore i biljke sa izrazito visokom sposobnošću akumulacije selena. U prvu grupu spadaju žitarice poput pšenice, raži, ječma i ovsu (sa sadržajem Se od 0,1 do 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$), u drugoj grupi se nalaze brokoli, kupus, crni i beli luk, dok su repa, brazilski i manje poznat rajski orah predstavnici treće grupe sa sadržajem Se od 22,3 do 53,0 mg kg^{-1} (Rayman, 2008; Fordyce, 2013). Međutim, brazilski orah, osim Se akumulira i visoke koncentracije radijuma i barijuma, te se njegovim konzumiranjem, radi zadovoljenja dnevnih potreba za selenom, unose i pomenuti elementi, koji mogu biti toksični i izazvati gastroenteritis, paralizu mišića i usporen rad srca.

Važni izvori selena su, osim žitarica, voća i povrća, i proizvodi animalnog porekla. Najveće koncentracije Se su ustanovljene u unutrašnjim organima, tačnije jetri i bubrezima životinja. Sadržaj selena u govedini varira od 22,3–226 $\mu\text{g kg}^{-1}$, u svinjetini od 19,3–450 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i piletini od 60–280 $\mu\text{g kg}^{-1}$, i zavisi od zemlje iz koje meso vodi poreklo. Značajne količine selena se mogu naći i u jajima (56–420 $\mu\text{g kg}^{-1}$), dok mleko i mlečni proizvodi sadrže u proseku između 1–80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Reilly, 2006).

Prethodna istraživanja navode da je selenometionin (Se-Met) dominantno prisutan u žitaricama i brazilskom orahu, Se-metilselenocistein i γ -glutamil-Se-metilselenocistein su detektovani u crnom i belom luku i brokolima, selenocistein (Se-Cys) u namirnicama životinjskog porekla, dok je selenonein glavno organsko jedinjenje selena prisutno u ribama - skuša i tuna (Fordyce, 2013). Od vrste jedinjenja zavisi i biodostupnost selena za organizam, te se oko 90% Se prisutnog u brazilskom orahu transformiše u metabolički aktivne oblike, dok se svega oko 20–60% Se usvoji konzumiranjem tune. Generalno, znatno veća usvojivost selena je ustanovljena sa konzumiranjem biljnih (85–100%) u odnosu na proizvode animalnog porekla (20–50%) (Levander, 1986).

2.5.1. Selen u gljivama

Od davnina je poznato da gljive imaju sposobnost akumulacije metala i drugih elemenata iz supstrata na kom rastu i to u visokim koncentracijama, što je pretežno iskorišćeno za utvrđivanje stepena zagađenosti zemljišta kontaminiranog teškim metalima ili u procesima bioremedijacije (Kalač i Svoboda, 2000).

Smatra se da gljive pomoću polisaharidnih komponenti ćelijskog zida odnosno njihovih funkcionalnih grupa (amino, karboksilne, fosfatne) vezuju metale koji se potom transportuju kroz ćelijsku membranu i cirkulišu kroz ceo micelijum (Campos et al., 2009b). Prethodna istraživanja pokazuju da se usvojeni metali prvenstveno akumuliraju u himenoforu (ne i u sporama), dok je najniža koncentracija detektovana u dršci (Kalač i Svoboda, 2000). Poznato je i da je kod industrijski gajenih gljiva koncentracija metala najveća u prvom talasu, i da sa svakim narednim talasom opada. Sposobnost akumulacije pojedinih metala varira od vrste do vrste, pa tako npr. *Cantharellus cibarius* pokazuje izrazitu sposobnost usvajanja olova, *Agaricus bisporus* ispoljava umeren afinitet ka ovom elementu, dok ga *P. ostreatus* akumulira u minimalnim koncentracijama (Kalač i Svoboda, 2000; Campos et al., 2009b). Generalno, usvajanje metala prvenstveno zavisi od bioloških i ekoloških faktora.

Sedamdesetih godina prošlog veka pojavljuju se prvi radovi u kojima se navodi da gljive poseduju sposobnost akumulacije selena (Stijve i Besson, 1976). Najveći procenat gljiva iz prirode sadrži nizak nivo selena u plodonosnim telima, u proseku od 1–5 $\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase. Veće koncentracije od 10–20 $\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase su ustanovljene kod vrsta iz roda *Boletus* (*B. edulis*, *B. aestivalis*, *B. pinicola*) i *Xerocomus badius*. Izrazito visok sadržaj selena od 367 $\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase je detektovan u gljivi *Albatrellus pes-caprae*, koja se retko konzumira, ali bi se pri eventualno redovnijoj primeni u ishrani već sa jednim gramom dostigle vrednosti koje odgovaraju gornjoj granici sigurnog unosa (Kalač i Svoboda, 2000).

Gotovo dve decenije kasnije, objavljena su i prva istraživanja o mogućnosti akumulacije selena u industrijski gajenim višim gljivama (Van Elteren et al., 1998). Od tada, brojni autori ispituju sposobnost različitih jestivih i medicinskih gljiva da akumuliraju Se, a istraživanja idu i u pravcu utvrđivanja hemijskih formi selena kao i biodostupnosti u organizmu. Ustanovljeno je da gljiva *G. lucidum* odgajena na supstratu sa dodatkom Na-selenita ima sposobnost da akumulira selen i da ga iz neorganskih jedinjenja transformiše u organske oblike, ugrađujući ga prevashodno u proteine (56–62%) i polisaharide, približno 11–18% (Zhao et al., 2004b). Isti autori navode da se selen u najvećem procentu vezuje za niskomolekularne proteine (< 16 kDa), pri čemu je Se-Met činio svega 8,2–18,3% od ukupno detektovanog Se u proteinima.

Ustanovljeno je i da niže koncentracije Se dodate u supstrat ($< 100 \text{ mg kg}^{-1}$) pospešuju sintezu aminokiselina i proteina, dok je pri višim koncentracijama uočen suprotan efekat. Znatno veće koncentracije Se-Met detektovane su u gljivi *Hericium erinaceus* (približno 50% od ukupno prisutnog selena) odgajenoj na supstratu sa dodatkom Na-selenita (Egressy-Molnár et al., 2016). U pomenutoj selenom obogaćenoj gljivi po prvi put su identifikovana i tri Se-adenozil jedinjenja (Se-metil-5-selenoadenozin, Se-metil-5-selenoadenozin-Se-oksidi i Se-dimetil-5-selenonium-adenozin) koja su se, to tada, povezivala samo sa metabolizmom selena kod kvasaca. Visok sadržaj selenometionina (oko 49 %) detektovan je i u gljivi *Pleurotus floride* odgajenoj na slami sa visokim sadržajem selena, a ustanovljene koncentracije Se su bile oko 800 puta veće u odnosu na kontrolnu gljivu (Bhatia et al., 2013). Simuliranom gastrointestinalnom digestijom, isti autori utvrđuju da se visokomolekularna jedinjenja sa selenom (poput proteina) hidrolizuju do peptida i drugih niskomolekularnih jedinjenja sa selenom. Daljom analizom hidrolizata je u najvećem procentu detektovan Se-Met (oko 73%) koji se vrlo dobro resorbuje u organizmu, što ukazuje da se gljive obogaćene selenom mogu koristiti kao suplementi na bazi ovog elementa. Ranijim istraživanjima je utvrđeno da se kod vrsta iz roda *Pleurotus* (*P. ostreatus* P80 i *P. salmoneostramineus*) visok procenat ukupno detektovanog selena u proteinima nalazi u vidu L-SeMet, između 37 i 70% (Savić, 2014). Selenocistein (Se-Cys), selenometionin (Se-Met), Se-metilselenocistein (Se-MSA), kao i prisustvo neorganskih jedinjenja sa selenom detektovano je i u gljivama *Agaricus bisporus* i *Lentinula edodes* obogaćenim selenom (Gergely et al., 2006). Prisustvo istih pomenutih jedinjenja detektovano je u preko 190 vrsta gljiva, koje su svrstane u 56 različitih rodova i 21 porodicu (Falandysz, 2008). Takođe, u gljivama su identifikovani i selenoaminošćeri što je u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima se navodi da se osim u proteine Se ugrađuje i u polisaharide (Zhao et al., 2004b).

Gljive obogaćene selenom privlače sve veću pažnju brojnih istraživača, ne samo zbog činjenice da mogu da akumuliraju selen u visokim koncentracijama već i zbog brojnih povoljnih nutritivnih (povećan sadržaj polifenola) i bioloških svojstava (antioksidativna, antitumorna) koje ispoljavaju (Zhao et al., 2004a; Zhao et al., 2008; Turlo et al., 2010; Yan i Chang, 2012; Bhatia et al., 2014; Gašćek et al., 2015).

2.5.2. Biološka uloga selena

Kod čoveka je do danas utvrđeno oko 35 selenoproteina, koji sadrže aminokiselinu selenocistein (definisanu kao 21. po redu), od kojih desetak sa poznatom fiziološkom funkcijom. Za većinu selenoproteina je ustanovljeno da imaju antioksidativnu funkciju. Najpoznatiji selenoenzim je glutation-peroksidaza (GSH-Px) koja učestvuje u zaštiti ćelijske membrane od oksidativnih oštećenja (Tapiero et al., 2003). Osim toga, ovaj enzim predstavlja i ćelijsku rezervu selena za sintezu drugih selenoproteina. Selenoenzimi, 5'- i 5-tiroksin dejodinaza učestvuju u aktivaciji ili deaktivaciji tiroidnih hormona. Ovi enzimi katalizuju konverziju hormona štitaste žlezde tiroksina, T₄ u aktivni hormon trijodtironin, T₃ ili neaktivni produkt reverzni trijodtironin, rT₃. U uslovima nedostatka selena aktivnost dejodinaza se smanjuje za 20% (Allan et al., 1999). Enzim tioredoksin-reduktaza sa selenocisteinom, kao redoks centrom, je uključen u brojne oksido-redukционе procese, a učestvuje i u regulaciji sinteze DNK, transkripciji gena i mehanizmima proliferacije ćelija (Backović, 2005). Selenofosfat-sintetaze (SPS1 i SPS2) imaju ulogu u formiranju prekursora selenocisteina i učestvuju u njegovoj ugradnji u druge selenoproteine. Selenoprotein P ima ulogu nosača selena kroz organizam, a pretpostavlja se da ima i antioksidativnu ulogu. Sinteza svih selenoproteina zavisi od dnevnog unosa selena u organizam.

Ujedno sa otkrivanjem esencijalne uloge selena u proteklih 30 godina otvara se i pitanje o sigurnim dozama dnevnog unosa. Jedan je od elemenata sa najužim granicama između nedovoljnog (< 40 µg), prekomernog (> 400 µg) i preporučenog dnevnog unosa (engl. recommended daily intake, RDI). Poznat je i njegov bivalentni efekat, odnosno u poželjnim dozama ispoljava zaštitnu ulogu dok se u prekomernim javlja rizik od razvoja malignih oboljenja.

U *in vivo* eksperimentima na sisarima je pokazano da visoka doza Se dovodi do ciroze jetre i nastanka hepatocelularnog karcinoma. Toksični efekti se ogledaju i u poremećaju rada štitaste žlezde, metabolizma hormona rasta i funkcije ćelija ubica (engl. natural killer cells, NK). Simptomi hroničnog trovanja selenom - selenoze su opadanje kose i slabljenje noktiju, miris znoja na beli luk, bronhopneumonija i edem pluća, povraćanje i dijareja, kao i mentalne konfuzije i neurotoksičnosti (Whanger et al., 1996).

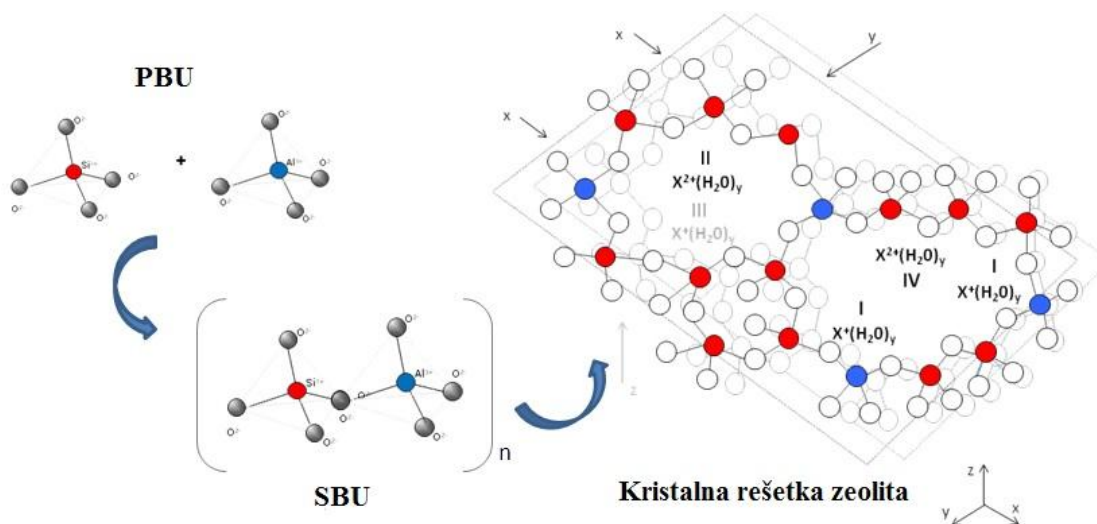
S druge strane, povezanost nedovoljnog unosa selena sa oboljenjima ljudi je prvi put ustanovljena krajem sedamdesetih godina prošlog veka kada je opisana Kešanska bolest – endemska srčana miopatija. Bolest se javlja u oblastima sa niskim sadržajem selena u zemljištu i namirnicama (pojedini delovi Kine) i pogađa uglavnom decu i žene. Endemska osteoartropatija Kašin-Bek se karakteriše slabošću i ukočenošću zglobova bolom, deformitetima kostiju i nekrozom zglobova, a takođe je zastupljena u regionima sa niskim sadržajem selena poput Kine, Severne Koreje i Sibira (Tapiero et al., 2003).

Selen je neophodan za normalno funkcionisanje imunološkog sistema odnosno neutrofila, makrofaga i NK ćelija. Poznato je i da dovodi do inhibicije razvoja HIV virusa *in vitro*, a niske koncentracije Se se dovode u vezu sa većom smrtnošću od oportunističkih infekcija (Baum et al., 1997). Se pozitivno utiče i na mentalne funkcije, naime ljudi sa niskim nivoom selena ispoljavaju depresivnije ponašanje, a uočeno je i da oboleli od Alchajmerove bolesti u proseku sadrže 40% manje selena u serumu. Centralni nervni sistem sadrži membranski vezanu GSH-Px koja štiti nezasićene masne kiseline u sinapsama. Značaj selena se ogleda i u prevenciji brojnih oboljenja poput karcinoma, kardiovaskularnih oboljenja, ciroze jetre, dijabetesa, zatim učestvuje u zaštiti ćelija od delovanja slobodnih radikala, redoks regulaciji, regulaciji hormona štitaste žlezde, a utiče i na smanjenje steriliteta kod muškaraca (Navarro-Alarcon i López-Martinez, 2000).

2.6. Prirodni zeoliti

Zeoliti, hidratizani alumosilikati, su otkriveni 1756. godine u stenama vulkanskog porekla. Ime su dobili po osobini da pri zagrevanju gube vodu pri čemu izgleda kao da ključaju (od grčke *zeo* – vriti, ključati i *litos* – kamen, nastao je naziv „kamen koji ključa”) (Polat et al., 2004). Zeoliti se javljaju u vidu sedimentnih tufova, koji sadrže oko 50–95% ovog minerala, dok ostatak čine primese poput kvarca, feldspata i različitih glina.

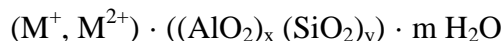
Osnovnu gradivnu jedinicu (engl. primary building units, PBU) zeolita čine SiO_4 i AlO_4 tetraedri koji se međusobno povezuju preko zajedničkih atoma kiseonika. Tetraedarske gradivne jedinice se preko zajedničkih atoma kiseonika mogu povezati na različite načine, pri tom gradeći kompleksnije jedinice koje su nazvane sekundarne gradivne jedinice (engl. secundar building units, SBU). Ukupno su prepoznate 23 različite SBU-jedinice čijim umrežavanjem nastaje jedinična ćelija – osnovna gradivna jedinica zeolita, a njenim pravilnim ponavljanjem u tri dimenzije obrazuje se kristalna rešetka zeolita, slika 2.7 (Margeta et al., 2013).



Slika 2.7. Šematski prikaz obrazovanja kristalne rešetke zeolita – klinoptilolita (preuzeto iz Margeta et al., 2013)

Negativno naelektrisanje alumosilikatne mreže koje je posledica zamene četvorovalentnog Si sa trovalentnim Al, se kompenzuje katjonima alkalnih i/ili zemnoalkalnih metala koji se smestaju u kanale i šupljine rešetke. Katjoni su za alumosilikatnu rešetku vezani slabim elektrostatičkim interakcijama što ih čini pokretnim, a zeolitima daje svojstvo jono-izmenjivača. Osim aluminijuma, silicijum u rešetki može biti zamenjen i gvožđem, borom, hromom, germanijumom i titanijumom. U sastav zeolita ulaze i molekuli vode koji se mogu reverzibilno ukloniti, a da pri tom ne dođe do promena u strukturi (Margeta et al., 2013; Jevtić, 2015).

Hemijski sastav zeolita se može predstaviti sledećom formulom (Breck, 1974):



gde su: M^+ i M^{2+} jednovalentni i dvovalentni katjoni, najčešće Na^+ ili K^+ i Ca^{2+} ili Mg^{2+} .

Molski odnos Si/Al u rešetki može da varira, ali je uvek ≥ 1 . Što je Si/Al odnos manji, odnosno što je više aluminijuma prisutno u rešetki, to je veća hidrofilnost i sposobnost zeolita da izmenjuje katjone. Na osnovu vrednosti molskog Si/Al odnosa zeoliti su svrstani u tri grupe (Flanigen, 1980):

- 1) zeoliti sa malim sadržajem Si, odnosno velikim sadržajem Al ($1 \leq Si/Al < 2$)
- 2) zeoliti sa umereno velikim sadržajem Si ($2 < Si/Al \leq 5$)
- 3) zeoliti bogati Si ($Si/Al > 5$).

Prirodni zeoliti, poput klinoptilolita, erionita i mordenita, se nalaze u grupi zeolita sa umereno velikim sadržajem silicijuma. Zeoliti prve grupe se odlikuju izrazitom hidrofilnošću i velikim kapacitetom katjonske izmene (KKI), suprotno karakteristikama treće grupe (hidrofobnost i nizak KKI).

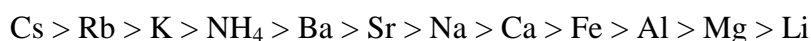
Najveća svetska ležišta zeolita se nalaze u Kini, Južnoj Koreji, Japanu, Jordanu, Turskoj, Slovačkoj i Americi. Republika Srbija, takođe, raspolaže značajnim količinama klinoptilolita koja se nalaze u severnom delu Bačke, u okolini Beograda (Višnjica), u blizini Vranjske Banje (Zlatokop i Mečkovac), kod Vladičinog Hana, u blizini Brusa i Beočina. Prema nekim podacima, najveće zalihe klinoptilolita u Evropi (oko 2 miliona tona) se nalaze upravo u Vranjskoj Banji.

2.6.1. Svojstva zeolita

Jono-izmenjivačko svojstvo. Količina katjona koju zeolit može da zameni sa katjonima iz rastvora naziva se jono-izmenjivački kapacitet ili kapacitet katjonske izmene (KKI). Uopšteno posmatrano, KKI je uslovljen molskim odnosom Si/Al u rešetki, i što je manji Si/Al odnos potrebno je više alkalnih i/ili zemnoalkalnih katjona da se kompenzuje negativno naelektrisanje alumosilikatne rešetke.

Pored toga, KKI zavisi od više faktora, kao što su dužina kontakta sa rastvorom, vrsta i koncentracija katjona u zeolitu i rastvoru, njihovo naelektrisanje, pH-vrednost rastvora, kristalografski položaji katjona u rešetki zeolita, kao i od temperature (Inglezakis, 2005).

Vrednosti za KKI, prirodnog zeolita - klinoptilolita, mogu varirati usled razlika u hemijskom sastavu što je uslovljeno lokacijom sa koje potiču. Klinoptilolit čiji je molski odnos Si/Al u opsegu 4,0 – 5,3 pokazuje selektivnost prema katjonima koja opada u sledećem nizu (Ulmanu, 2012):



Ukoliko se klinoptilolit modifikuje tako da sadrži samo jednu vrstu izmenjivih katjona njegov jono-izmenjivački kapacitet se znatno povećava (Inglezakis, 2005). Takođe, zeolit zasićen jonima teških metala ili amonijum-jonom može se regenerisati i koristiti u toku većeg broja cikličnih procesa (Farkaš et al., 2005; Sprynskyy et al., 2005).

Adsorpcija. Adsorpciona svojstva zeolita zavise od hemijskog sastava zeolita, strukturnih svojstava, kao i od koncentracije i vrste izmenjivih katjona. Primenom različitih postupaka modifikacije zeolita moguće je uticati na adsorpcioni kapacitet ovog minerala. Tretiranjem zeolita kiselinama ili bazama može se povećati njegova poroznost i specifična površina. U prisustvu neorganskih soli poput Fe(III) na površini zeolita dolazi do formiranja amorfnog oksida koji gradi stabilne veze sa anjonima poput arsenita i arsenata (Šiljeg et al., 2009). Afinitet goetita i hematita, prirodnih oksida gvožđa, prema selenit- i selenat-jonima dokazan je u ranijim istraživanjima (Rovira et al., 2008). Površinski aktivne komponente čine zeolit pogodnim adsorbensom anjona kao i hidrofobnih organskih molekula.

Zagrevanjem, na temperaturama od 300-400 °C, uklanjaju se molekuli vode, koji ulaze u sastav rešetke i na taj način se povećava adsorpciona sposobnost zeolita.

Poroznost. Ukupna zapremina pora u strukturi zeolita iznosi približno 35%, što ukazuje na izrazitu otvorenost rešetke. Na veliki udeo pora u strukturi zeolita ukazuje i njegova gustina koja iznosi 2,1–2,2 g cm⁻³ što je znatno manje u poređenju sa kvarcom.

Promenom dimenzija pora, moguće je uticati na selektivnost adsorpcije što omogućava da samo molekuli čiji su prečnici manji od dimenzija pora mogu da uđu u šupljine i kanale rešetke.

2.6.2. Primena zeolita

Zeoliti, zahvaljujući svojim svojstvima (jono-izmenjivačkim, adsorpcionim i katalitičkim) i činjenici da su veoma jeftine sirovine, imaju široku primenu u poljoprivredi, industriji i zaštiti životne sredine. Od prirodnih zeolita, samo pojedini poput klinoptilolita, šabazita i mordenita, zadovoljavaju uslove praktične primene.

Zeoliti se koriste za razdvajanje gasova, ali i njihovo skladištenje (White et al., 2010). Primenuju se kao katalizatori u procesima krekovanja u naftnoj industriji, isto svojstvo je iskorišćeno i u procesima prevođenja metanola u alkene male molekulske mase ili u visokooktanski benzin. Jono-izmenjivačka svojstva zeolita su našla primenu u industriji deterdženata, gde predstavljaju zamenu za fosfate. Naime, izmenom natrijuma iz rešetke zeolita sa magnezijumom i kalcijumom iz vode smanjuje se njena tvrdoća (Yilmaz i Müller, 2009). Zeoliti se takođe, primenuju kao filteri u procesima prečišćavanja komunalnih i industrijskih voda (Kalló, 2001). Metali poput olova, gvožđa, bakra, zinka, kao i amonijum-joni se mogu uspešno ukloniti iz vode pomoću zeolita (Perić et al., 2004). Ispitivanja, takođe, pokazuju da se mogu primeniti za uklanjanje radioaktivnog otpada iz kontaminiranih zemljišta i voda, vezujući cezijum i uranijum (El-Kamash, 2008; Weihua et al., 2009). Prirodni zeoliti se ispituju za primenu u farmaciji i poljoprivredi kao potencijalni nosači aktivnih komponenti (lekova, pesticida) sa sposobnošću njihovog kontrolisanog otpuštanja (Farias et al., 2011).

Ispitivanja su pokazala da dodatak zeolita u supstrat za gajenje gljiva ubrzava rast micelijuma, skraćuje vreme potrebno za formiranje plodonosnih tela i poboljšava njihov hemijski sastav (Klaus et al., 2005). Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata i fenola gljive *Grifola frondosa*, odgajene na supstratu sa dodatkom zeolita je bio veći u poređenju sa kontrolnom gljivom. Takođe, dodatak zeolita utiče i na veći sadržaj β -glukana viših gljiva kroz procese epimerizacije stimulisane prisustvom ovog minerala (Vunduk et al., 2016).

3. CILJEVI RADA

Iz pregleda literature se vidi da gljive predstavljaju važan izvor biološki aktivnih komponenti koje pozitivno utiču na ljudski organizam. Imajući u vidu da se danas sve više pažnje posvećuje upotrebi funkcionalne hrane u prevenciji mnogih oboljenja, cilj ove doktorske disertacije je bio da pruži nešto detaljniji uvid u mogućnost primene gljiva obogaćenih selenom u terapeutske svrhe. Na osnovu iznetog postavljeni su sledeći ciljevi rada:

1. Praćenje rasta micelijuma gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor* na laboratorijskim hranljivim podlogama i industrijskom proizvodnom supstratu obogaćenom različitim jedinjenjima sa selenom u odnosu na kontrolni uzorak bez dodatka.
2. Ispitivanje uticaja selena na aktivnost enzima primarne antioksidativne zaštite – superoksid-dismutaze (SOD), glutation-peroksidaze (GSH-Px) i katalaze (CAT) i analiza proteinskog sastava primenom SDS-PAGE gel elektroforeze u svežim plodonosnim telima.
3. Izolovanje bioaktivnih komponenata, gljiva obogaćenih selenom kao i kontrolnih uzoraka, primenom metanola kao rastvarača. Određivanje sadržaja ukupnog selena (ICP-MS) i hemijska karakterizacija izolovanih ekstrakata primenom UV-Vis i FT-IR spektroskopije.
4. *In vitro* ispitivanje antioksidativnih svojstava metanolnih ekstrakata, gljiva obogaćenih selenom i kontrolnih uzoraka, metodama: sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije, sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, redukciona sposobnost i sposobnost heliranja jona gvožđa.
5. *In vitro* ispitivanje antibakterijskog i antifungalnog dejstva ekstrakata gljiva obogaćenih selenom i kontrolnih uzoraka korišćenjem metode mikrodilucije na mikrotitracionim pločama.
6. Praćenje kinetike rasta odabranih bakterija u prisustvu ekstrakata sa najjačim antimikrobnim dejstvom merenjem optičke gustine i potom praćenje morfoloških promena bakterija nakon delovanja pomenutih ekstrakata primenom mikroskopskih tehnika (SEM i TEM).

4. MATERIJAL I METODE

Gljiva *Coriolus versicolor* korišćena u radu je deponovana u kolekciji kultura Katedre za Tehnološku mikrobiologiju (Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet), a izolovana je sa lokaliteta Košutnjak, Beograd. Micelijum gljive *Pleurotus ostreatus* P80 je komercijalni soj italijanske firme Italspawn.

4.1. Modifikacija zeolitskog tufa i adsorpcija selenit- i selenat-jona

Modifikacija zeolitskog tufa i adsorpcija selenit- i selenat-jona je urađena po metodi Jevtić i saradnika (2014). U radu je korišćen zeolitski tuf (CLI) iz ležišta Zlatokop, u blizini Vranjske Banje u Srbiji (prečnik čestica u opsegu od 63-125 μm).

Zeolitski tuf je tretiran rastvorom natrijum-hlorida koncentracije 2 mol dm^{-3} u odnosu 1:50. Suspenzija je mešana na magnetnoj mešalici (RCT basic IKAMAG) brzinom 700 obr min^{-1} u toku 48 h na temperaturi 60–70 °C. Dobijeni Na-modifikovani zeolit (Na-CLI) je potom centrifugiran, ispiran dejonizovanom vodom do negativne reakcije na hlorid-jone i sušen na 80 °C do konstantne mase. Potom je 5,0 g Na-CLI tretirano rastvorom $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, koncentracije 0,05 mol dm^{-3} u acetatnom puferu (pH 3,6), čija je pH vrednost prethodno podešena na 7,0. Suspenzija je mešana na magnetnoj mešalici tokom 24 h na 70 °C. Dobijeni proizvod (Fe-CLI) izdvojen je centrifugiranjem i ispran dejonizovanom vodom do negativne reakcije na sulfat-jone, i potom sušen do konstantne mase na 60 °C.

Za adsorpciju selenit-jona, 1,0 g Fe-CLI je tretiran sa 100 cm^3 rastvora Na_2SeO_3 koncentracije $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} . Dobijenoj suspenziji podešena je pH-vrednost na 8,0 nakon čega je ostavljena na magnetnoj mešalici u toku 24 h. Suspenzija je odvojena centrifugiranjem, a dobijeni talog ($\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$) je sušen na 60 °C do konstantne mase.

Za adsorpciju selenat-jona, Fe-CLI je tretiran rastvorom Na_2SeO_4 koncentracije $3 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} . Suspenziji je podešena pH-vrednost na 3,0 nakon čega je ostavljena na magnetnoj mešalici u toku 24 h. Dobijeni talog ($\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$) je centrifugiran i osušen na isti način kao prethodni.

Koncentracija selena na zeolitu (qt) izračunata je iz razlike koncentracije selena u rastvoru na početku i na kraju eksperimenta:

$$qt = (c_0 - c_t)V/m$$

gde je c_0 – početna koncentracija, c_t - koncentracija nakon vremena t , V - zapremina uzorka i m - masa uzorka zeolita.

Koncentracija Se u rastvoru određena je pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra (AAS), Spectra 55B, Varian, korišćenjem hidridne tehnike. Tačnost merenja iznosila je $\pm 2\%$. Sve dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

4.2. Određivanje brzine rasta micelije na laboratorijskim hranljivim podlogama

4.2.1. Određivanje brzine rasta micelije na čvrstom agaru

Ispitivan je uticaj natrijum-selenita (Na_2SeO_3), natrijum-selenata (Na_2SeO_4) i Se-obogaćenog zeolita ($\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$) na rast micelije gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor*. Koncentracije selena u ispitivanim jedinjenjima su se kretale u opsegu od $10 - 75 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Sladni agar (HiMedia, India) sa i bez dodatka ispitivanih jedinjenja, prethodno sterilisan u autoklavu na 121°C tokom 15 min., zasejan je micelijumom gljiva prečnika 9 mm i inkubiran 9 dana na 25°C u mraku. Rast micelijuma meren je trećeg, petog, sedmog i devetog dana od zasejavanja i prosečna stopa rasta izražena je u mm/dan. Konačna prosečna stopa rasta dobijena je kao srednja vrednost porasta micelije tokom svih dana kultivacije i izražena je u procentima u odnosu na kontrolu (Tham et al., 1999).

4.2.2. Određivanje brzine rasta micelije na pšeničnoj slami

Rast micelijuma *P. ostreatus* i *C. versicolor* praćen je i u epruvetama sa pšeničnom slamom kao supstratom (prethodno navlaženom do 75%) uz dodatak natrijum-selenita (Na_2SeO_3), natrijum-selenata (Na_2SeO_4) i Se-obogaćenog zeolita ($\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$), kao i kontrolnog uzorka. Koncentracije selena u ispitivanim jedinjenjima su se kretale u opsegu od $10 - 75 \mu\text{g g}^{-1}$.

Epruvete sa ispitivanim jedinjenjima, prethodno sterilisane u autoklavu na 121°C tokom 2 h, inokulisane su gljivama i inkubirane 14 dana na 25 °C u mraku. Brzina rasta micelijuma merena je svakog drugog dana od dana zasejavanja i prosečna stopa rasta izražena je u mm/dan. Konačna prosečna stopa rasta dobijena je kao srednja vrednost porasta micelije tokom svih dana kultivacije i izražena je u procentima u odnosu na kontrolu.

4.3. Industrijski postupak gajenja gljiva

Starter kultura (seme) za industrijsko gajenje gljiva pripremljen je na zrnima pšenice. Navlažena zrna, kojima je podešen pH na vrednost 6–7 dodavanjem CaCO₃, su sterilisana na 121°C tokom 2 h. Nakon hlađenja pšenična zrna su zasejana micelijumom gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* prethodno proraslim na hranljivoj podlozi.

Industrijski supstrat za gajenje *C. versicolor* pripremljen je na bazi hrastove piljevine (50%), pšenične slame (30%) i pšeničnih mekinja (20%), dok je za gajenje *P. ostreatus* upotrebljena pšenična slama (100%). U vodu za vlaženje supstrata (65–75%) dodati su natrijum-selenit (Na₂SeO₃), natrijum-selenat (Na₂SeO₄) i Se-obogaćen zeolit (Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI), a pripremljen je i kontrolni uzorak bez dodatka jedinjenja. Koncentracija selena u ispitivanim jedinjenjima je iznosila 50 i 75 mg kg⁻¹ za *P. ostreatus* i 50 i 62,5 mg kg⁻¹ za *C. versicolor* izraženo na suhu masu supstrata.

Nakon sterilizacije u autoklavu na 121°C tokom 2 h, supstrat je zasejan prethodno pripremljenim inokulumom na zrnima pšenice (5–10% težine vlažnog supstrata). Micelijum je prorastao supstrat tokom 3–4 nedelje na 25 °C u mraku, nakon čega je usledila faza fruktifikacije u kontrolisanim parametrima okruženja. U periodu fruktifikacije temperatura prostorije je održavana na 18 ± 2 °C, relativna vlažnost vazduha se kretala između 85–95%, a osvetljenje je podešeno na 75–100 luksa u trajanju od 12 h po danu uz ventilaciju (Stamets, 2000; Mondal et al., 2010). Prva plodonosna tela su se pojavila nakon 10–12 dana za *P. ostreatus* i nakon 40–45 dana za *C. versicolor*. Dobijena plodonosna tela korišćena su za dalje analize.

4.4. Određivanje aktivnosti enzimskih antioksidanata u svežim plodonosnim telima gljiva

Sveža plodonosna tela selenom obogaćenih gljiva ($\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$) kao i kontrolnih uzoraka su odmerena (3,0 g), usitnjena i potom sprašena u avanu primenom tečnog azota. Sprašeni uzorci su homogenizovani u K-fosfatnom puferu koncentracije 50 mmol dm^{-3} (pH 7,8) sa $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ EDTA u odnosu 1:3, a potom i sonifikovani 3 puta po 20 sekundi sa pauzama od 20 sekundi na frekvenciji od 10 kHz (Cheng et al., 2012). Ovako tretirani uzorci su centrifugirani 20 minuta na 5000 rpm na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. U dobijenim supernatantima određena je koncentracija ukupnih proteina (Bradford, 1976), zatim aktivnost enzima antioksidacionog zaštitnog sistema (SOD, GSH-Px i CAT) kao i skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza).

4.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Ukupna aktivnost superoksid-dismutaze (E.C. 1.15.1.1) u uzorcima određena je prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Princip metode se zasniva na inhibiciji fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijuma (NBT) do formazana pod dejstvom $\text{O}_2^{\cdot-}$ u prisustvu SOD. Reakciona smeša se sastojala od 50 mmol dm^{-3} K-fosfatnog pufera (pH 7,8), $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ EDTA, 13 mmol dm^{-3} L-metionina, $75 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ NBT, $2 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ riboflavina i određene zapremine uzorka. Riboflavin je u reakcionu smešu dodat na kraju. Reakcija je izazvana izlaganjem reakcione smeše osvetljenju od 30 W pod fluorescentnom lampom u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je merena na 560 nm pomoću uređaja Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK). Jedna SOD jedinica (U) je definisana kao količina enzima neophodna da inhibira 50% NBT u poređenju sa smešom bez dodatog uzorka i izražava se u odnosu na koncentraciju ukupnih proteina (U mg^{-1} proteina).

4.4.2. Određivanje aktivnosti glutathion-peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost seleno-zavisne glutathion peroksidaze (E.C. 1.11.1.9) u uzorcima određena je spektrofotometrijski primenom Ransel kita (Randox Laboratories Ltd., UK), a po metodi Paglia i Valentine (1976).

GSH-Px katalizuje redukciju organskih peroksida (kumen-hidroperoksid) u odgovarajući alkohol, pri čemu se specifični donori vodonika redukovani glutation (GSH) oksiduje do glutation disulfida (GSSG). U spregnutoj reakciji, koju katališe glutation reduktaza (GR), GSSG se prevodi u GSH u prisustvu NADPH kao kofaktora koji sam biva oksidovan do NADP^+ . Smanjenje apsorbance na 340 nm usled oksidacije NADPH u NADP^+ se prati spektrofotometrijski i predstavlja meru aktivnosti glutation peroksidaze. Sva merenja su realizovana na spektrofotometru Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK). Jedinica enzimske aktivnosti GSH-Px definiše se kao broj nanomolova oksidovanog NADPH u minuti ($\text{nmol NADPH min}^{-1}$). Aktivnost enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po gramu proteina (U g^{-1} proteina). Molarni ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm iznosi $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i koristi se za izračunavanje aktivnosti GSH-Px.

$$\text{Aktivnost GSH-Px (U g}^{-1}\text{ proteina)} = [((\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times 1000 \times V_{rs}) / (6220 \times C_{pr} \times V_{uz})]$$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti; ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti; V_{rs} – zapremina reakcione smeše (ml); C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku (mg ml^{-1}); V_{uz} – zapremina uzorka (ml)

4.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Aktivnost katalaze (E.C. 1.11.1.6) u ispitivanim uzorcima je određena metodom koju je opisao Claiborne (1984). Vodonik-peroksid ima maksimum apsorpcije na 240 nm, i prema osnovnom principu metode prati se brzina razgradnje H_2O_2 do H_2O i O_2 katalitičkom aktivnošću CAT, odnosno pad apsorbance pri datoj talasnoj dužini.

Nekoliko kapi 30% H_2O_2 se rastvori u 50 mmol dm^{-3} fosfatnom puferu tako da vrednost apsorbance slepe probe merena na 240 nm bude između 0,525 i 0,550. Ovako pripremljenom rastvoru se dodaje određena zapremina uzorka, koja dovodi do srednje vrednosti promene apsorbance u opsegu od 0,03 do 0,06. Reakcija razgradnje H_2O_2 započinje dodatkom uzorka i meri se pad apsorbance na svakih 30 sekundi tokom 3 minuta na sobnoj temperaturi. Sva merenja su realizovana na spektrofotometru Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK).

Jedinica aktivnosti CAT definiše se kao broj μmol H_2O_2 redukovanih u minuti ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$). Aktivnost enzima u ispitivanim uzorcima izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U mg^{-1} proteina). Molarni ekstinkcioni koeficijent za H_2O_2 na 240 nm iznosi $43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i koristi se za izračunavanje aktivnosti CAT. Aktivnost katalaze računata je prema sledećoj formuli:

$$\text{Aktivnost CAT (U mg}^{-1} \text{ proteina)} = [((\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times 1000 \times V_{\text{rs}}) / (43,6 \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{uz}})]$$

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti; ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe u minuti; V_{rs} – zapremina reakcione smeše (ml); C_{pr} – koncentracija proteina u uzorku (mg ml^{-1}); V_{uz} – zapremina uzorka (ml).

4.4.4. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)

Raspored proteinskih bendova za uzorke gljiva sa i bez dodatog selena utvrđen je metodom po Laemmli-ju (1970) primenom SDS-PAGE gel elektroforeze. Pripremljeni uzorci su nakon dodatka pufera ($0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerol; 2% (w/v) SDS; 0,5% (w/v) bromfenol plavo; 5% β -merkaptoetanol) zagrevani u ključalom vodenom kupatilu u trajanju od 5 minuta. Jednaka količina proteina u svakom bunariću je postignuta dodavanjem odgovarajućih zapremina uzoraka. Elektroforeza je vršena na 4% koncentrišućem i 12% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu u puferu sledećeg sastava: $0,025 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris, 10% SDS i $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ glicin, pH 8,0 na 100 V (približno 25 mA) (Zhao et al., 2004b). Nakon završene elektroforeze gelovi su bojani i fiksirani u rastvoru koji se sastojao iz 3,9% trihlorsirćetne kiseline, 17% metanola, 6% glacijalne sirćetne kiseline i 0,23% (w/v) Comassie Brilliant Blue R-250 boje, tokom noći. Gelovi su potom obezbojavani rastvorom 17% metanola i 6% glacijalne sirćetne kiseline. Za elektroforezu je korišćena vertikalna mini gel elektroforeza (BioRad Laboratories).

4.5. Određivanje sadržaja ukupnog selena u plodonosnim telima gljiva i metanolnim ekstraktima

Približno 0,25 g (tačna masa izmerena je na 4 decimale) osušenih i fino usitnjenih uzoraka plodonosnih tela gljiva i metanolnih ekstrakata uzeto je za digestiju u 5 ml HNO_3 na $260 \text{ }^\circ\text{C}$ u zatvorenom sistemu mikrotalasne pećnice UltraClave (Milestone, Italy).

Ukupan sadržaj selena je potom određen tehnikom masene spektrometrije sa induktivno kuplovanom plazmom, ICP-MS model Agilent 8800 QQQ ICP-MS (Paślawski i Migaszewski, 2006). Dobijene vrednosti su izražene u $\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase uzorka.

4.6. Priprema metanolnih ekstrakata

Odmerena masa (10,0 g) osušenih i fino samlevenih uzoraka gljiva je tretirana 24 časa sa 150 ml metanola (HPLC čistoće) na sobnoj temperaturi, uz mešanje na magnetnoj mešalici (120 rpm) i potom filtrirana kroz filter papir Whatman br. 4. Isti postupak je ponovljen još dodatno dva puta i spojeni supernatanti su upareni do suva na rotacionom vakuum uparivaču model R-II (BUCHI, Švajcarska) na temperaturama manjim od 45 °C da bi se izbegla degradacija termolabilnih komponenti. Uzorci su potom dodatno sušeni u struji toplog vazduha (40 °C) do konstantne mase (Barros et al., 2007).

4.7. Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata

4.7.1. Određivanje ukupnih ugljenih hidrata

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata određen je spektrofotometrijski fenol-sumpornom metodom (DuBois et al., 1956). Koncentracije ugljenih hidrata u uzorcima se računaju u odnosu na standardnu krivu, koja se dobija pomoću D-glukoze ($15\text{--}125 \mu\text{g ml}^{-1}$). Svakom ekstraktu ($0,25 \text{ mg ml}^{-1}$, 400 μl) dodato je 400 μl 5% fenolnog rastvora i 2 ml 96% sumporne kiseline. Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi, mešanja na vorteksu i naknadnog zagrevanja na 30 °C tokom 30 minuta, apsorbance su očitane na talasnoj dužini od 490 nm na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti D-glukoze u mg po gramu suve mase ekstrakta.

4.7.2. Određivanje ukupnih proteina

Sadržaj ukupnih proteina određen je metodom po Bradford-u (1976). Koncentracije proteina u uzorcima se računaju u odnosu na standardnu krivu, koja se dobija pomoću albumina goveđeg seruma (engl. bovine serum albumin, BSA) u koncentraciji od $0,01\text{--}2,5 \text{ mg ml}^{-1}$.

Princip metode se zasniva na promeni boje Commassie Brilliant Blue G-250 usled vezivanja za bazne i aromatične aminokiselinske ostatke proteina (od crvene do stabilne plave) i pomeranja maksimuma apsorpcije sa 465 na 595 nm. U ekstrakte (20 mg ml⁻¹, 100 µl) je dodato 5 ml Bradfordovog reagensa i nakon 15 minuta na sobnoj temperaturi apsorbanca je merena na 595 nm na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti BSA u mg po gramu suve mase ekstrakta.

4.7.3. Određivanje ukupnih lipida

Sadržaj ukupnih lipida određen je uz pomoć sulfo-fosfo-vanilinskog reagensa i holesterola (Chol) kao standarda (Turlo et al., 2010). Svakom ekstraktu (20 mg ml⁻¹, 50 µl) je dodato 2 ml koncentrovane sumporne kiseline i smeša je potom zagrevana na 100 °C tokom 20 minuta. Nakon hlađenja ekstrakti su tretirani sa 4 ml fosfo-vanilin reagensa i ostavljeni na sobnoj temperaturi, 20 minuta. Apsorbanca je potom očitana na 525 nm na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan). Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu različitih koncentracija holesterola (0,75–6,0 mg ml⁻¹). Ukupan sadržaj lipida izražen je u mg ekvivalentima Chol po gramu suve mase ekstrakta.

4.7.4. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola određen je uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline kao standarda (Ismail et al., 2004). Svakom ekstraktu (1 mg ml⁻¹, 200 µl) je dodat 1,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa (razblaženog 10 puta) i smeša je dobro promešana na vorteksu. Nakon 5 minuta na sobnoj temperaturi, smeši je dodat 1,5 ml 6 mas.% rastvora natrijum-karbonata. Reakcija se odvijala u mraku 2 h, na sobnoj temperaturi i zatim je merena apsorbanca na 725 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra (Shimadzu UV-1800, Japan). Standardna kriva je konstruisana na osnovu različitih koncentracija galne kiseline (15–250 µg ml⁻¹) i sadržaj ukupnih fenola u uzorcima je izražen kao ekvivalenti galne kiseline (gallic acid equivalents-GAE) u mg g⁻¹ suve mase ekstrakta.

4.7.5. Određivanje ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida određen je prema metodi Jia i saradnika (1999). Kalibraciona kriva je konstruisana primenom različitih koncentracija (+)-katehina ($6,25\text{--}100\ \mu\text{g ml}^{-1}$), koji je korišćen kao standard. U ekstrakte ($1\ \text{mg ml}^{-1}$, $250\ \mu\text{l}$) je dodato $1,25\ \text{ml}$ MQ vode, $75\ \mu\text{l}$ 5% natrijum-nitrita, $150\ \mu\text{l}$ 10% aluminijum-hlorida, $500\ \mu\text{l}$ $1\ \text{mol dm}^{-3}$ natrijum-hidroksida i $250\ \mu\text{l}$ MQ vode. Apsorbanca smeše je odmah merena na $510\ \text{nm}$ na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan). Ukupan sadržaj flavonoida u uzorcima je izražen u ekvivalentima (+)-katehina u mg g^{-1} suve mase ekstrakta.

4.7.6. Određivanje sadržaja ukupnih, α - i β -glukana

Sadržaj ukupnih, α - i β -glukana u metanolnim ekstraktima određen je pomoću enzimskog kita Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure K-YBGL (Megazyme Int., Wicklow, Ireland). Za određivanje ukupnih glukana, ekstrakti ($50\ \text{mg}$) su hidrolizovani u koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini na $100\ ^\circ\text{C}$ u trajanju od $2\ \text{h}$. Nakon neutralizacije sa rastvorom KOH koncentracije $2\ \text{mol dm}^{-3}$ nastavljena je hidroliza do glukoze dodatkom mešavine enzima egzo- $1,3\text{-}\beta$ -glukanaze i β -glukozidaze u trajanju od $60\ \text{minuta}$ na $40\ ^\circ\text{C}$. Uzorci su potom tretirani GOPOD-ovim reagensom (glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) i nakon inkubacije na $40\ ^\circ\text{C}$ tokom $20\ \text{minuta}$, merena je apsorbanca rastvora spektrofotometrijski na $510\ \text{nm}$. Sadržaj α -glukana je određen enzimskom hidrolizom ekstrakata korišćenjem mešavine amiloglukozidaze i invertaze. Sadržaj β -glukana je dobijen kao razlika sadržaja ukupnih i α -glukana. Rezultati su izraženi u mg g^{-1} suve mase ekstrakta.

4.7.7. FT-IR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom je primenjena za identifikaciju organskih komponenti u metanolnim ekstraktima gljiva. Spektri su snimani na ATR-FTIR spektrometru IRAffinity-1 (Shimadzu, Japan) u oblasti talasnih dužina $4000\text{--}600\ \text{cm}^{-1}$. Interpretacija spektara vršena je pomoću softvera IRsolution (Shimadzu, Japan).

4.8. Biološka svojstva metanolnih ekstrakata

4.8.1. Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva

Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor* u *in-vitro* uslovima utvrđena su primenom različitih metoda. Ispitana je sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (konjugen dienska metoda), sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, sposobnost redukcije Fe(III)-jona gvožđa i sposobnost heliranja jona gvožđa.

4.8.1.1. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida

Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida je određena konjugen dienskom metodom (Lingnert et al., 1979), uz male modifikacije. Različite koncentracije metanolnih ekstrakata gljiva (0,1 – 10 mg ml⁻¹, 100 µl) u metanolu, tretirane su sa 2 ml 10 mmol dm⁻³ emulzije linoleinske kiseline u Na-fosfatnom puferu koncentracije 0,2 mol dm⁻³ (pH 6,5). Stabilnost emulzije obezbeđena je dodatkom 6,5 mmol dm⁻³ Tween 20. Rastvori su inkubirani na 37 °C tokom 15 h u mraku, uz neprestano mešanje, kako bi se ubrzala oksidacija. Nakon dodatka 6 ml apsolutnog metanola u 0,2 ml rastvora merena je apsorbanca supernatanta na 234 nm pomoću UV/Vis spektrofotometra (Shimadzu UV-1800, Japan). Kao kontrolni rastvor (slepa proba) korišćen je rastvor u kom su se nalazile sve komponente izuzev ekstrakta gljiva. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida računata je prema sledećoj formuli:

$$\text{Sposobnost inhibicije peroksidacije (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ – apsorbanca kontrolnog uzorka; A₁ – apsorbanca rastvora sa uzorkom

Kao standardi, odnosno pozitivne kontrole, korišćeni su askorbinska kiselina i α-tokoferol. Vrednost od 100% ukazuje na najjaču inhibitornu vrednost.

4.8.1.2. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala ispitana je prema modifikovanoj metodi Bilos-a (1958). U prvoj seriji, različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata gljiva (0,1–2,5 mg ml⁻¹, 2 ml) u metanolu dodat je po 1 ml sveže pripremljenog 0,2 mmol dm⁻³ rastvora DPPH u dimetil sulfoksidu (DMSO). Ovako pripremljeni rastvori su mešani na vorteksu i potom ostavljeni u mraku tokom 40 minuta na sobnoj temperaturi. U drugoj seriji, svakom uzorku je dodat po 1 ml rastvora DMSO. Apsorbance rastvora druge serije su odmah merene na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan) na 517 nm. Kao kontrolni rastvor (slepa proba) korišćen je rastvor u kom su se nalazile sve komponente izuzev ekstrakta gljiva. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala računata je prema sledećoj formuli:

$$\text{Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (\%)} = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100$$

A_i – apsorbanca 2 ml ekstrakta sa dodatkom 1 ml rastvora DPPH; A_j – apsorbanca 2 ml ekstrakta sa dodatkom 1 ml rastvora DMSO; A_c – apsorbanca kontrolnog rastvora.

Kao standardi korišćeni su askorbinska kiselina, BHT, katehin i α-tokoferol.

4.8.1.3. Redukciona svojstva

Redukciona sposobnost određena je po metodi koju je dao Oyaizu (1986), uz male modifikacije. Različite koncentracije metanolnih ekstrakata gljiva (0,1–20 mg ml⁻¹, 250 μl) u metanolu, tretirane su sa 250 μl Na-fosfatnog pufera (pH 6,6) i 250 μl 1% kalijum fericijanida. Ovako pripremljeni rastvori su mešani na vorteksu i potom inkubirani 2 minuta na 50 °C. Nakon dodatka 250 μl 10% trihlorsirćetne kiseline rastvori su centrifugirani na 5000 rpm, 10 minuta. Gornjem sloju (1 ml) je dodat 1 ml MQ vode i 200 μl 0,1% ferihlorida. Apsorbanca dobijenih rastvora je merena na 700 nm na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan). Kao kontrolni rastvor (slepa proba) korišćen je rastvor u kom su se nalazile sve komponente izuzev ekstrakta gljiva. Kao standard korišćena je askorbinska kiselina. Viša vrednost apsorbance ukazivala je na jaču sposobnost redukcije jona gvožđa.

4.8.1.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Sposobnost heliranja jona gvožđa je određena prema modifikovanoj metodi Dinis-a i saradnika (1994). Različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata gljiva u metanolu dodato je 1,85 ml metanola i 50 μl 2 mmol dm^{-3} FeCl_2 . Reakcija je inicirana dodatkom 100 μl 5 mmol dm^{-3} ferozina. Apsorbanca dobijenih rastvora je merena na UV/Vis spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Japan) na 562 nm, nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi. Kontrolni rastvor je pripremljen bez dodatka FeCl_2 i ferozina (molekula koji učestvuju u formiranju kompleksa). Niža vrednost apsorbance ukazivala je na jaču sposobnost heliranja. Sposobnost heliranja jona gvožđa računata je prema sledećoj formuli:

$$\text{Sposobnost heliranja jona gvožđa (\%)} = [(A_{bl} - A_{uz}) / A_{bl}] \times 100$$

A_{bl} – apsorbanca kontrolnog rastvora; A_{uz} – apsorbanca rastvora sa uzorkom

Kao standardi, odnosno pozitivne kontrole, korišćeni su limunska kiselina i EDTA.

4.8.2. Antimikrobna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva

Ispitivanje antimikrobnih svojstava metanolnih ekstrakata gljiva je urađeno na 21 mikroorganizmu (devet Gram pozitivnih bakterija, deset Gram negativnih bakterija i dva kvasca). Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke tipske kolekcije kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Test organizmi su čuvani na 4 °C na kosim agarima i presejavani na dve nedelje. Antimikrobna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* u *in-vitro* uslovima utvrđena su mikrodilucionom metodom i praćenjem kinetike rasta mikroorganizama merenjem optičke gustine. Za potvrđivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i ispitivanje nastalih mikromorfoloških i ultrastrukturnih promena korišćena je skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) i transmisiono elektronska mikroskopija (TEM).

4.8.2.1. Sojevi mikroorganizama i priprema inokuluma

Za ispitivanje antimikrobnih svojstava metanolnih ekstrakata gljiva korišćeno je devet Gram pozitivnih bakterija – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, deset Gram negativnih bakterija – *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Citrobacter freundii* ATCC 43864 i dva kvasca – *Candida albicans* ATCC 10231 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Kvasci su gajeni na sladnom bujonu/agaru (Torlak, Srbija), *E. coli* O157:H7 kao i vrste iz roda *Listeria* su gajene na tripton soja bujonu/agaru (Himedia, India), dok su sve ostale korišćene bakterije gajene na Mueller Hinton bujonu/agaru (HiMedia, India). Koncentracija mikroorganizama od oko $10^5 - 10^6$ CFU ml⁻¹ je korišćena za sva antimikrobna ispitivanja, a postignuta je serijskim razređivanjem prekonocne kulture.

Metanolni ekstrakti gljiva su rastvoreni u 5% DMSO tako da je dobijena koncentracija (štok) od 80 mg ml⁻¹ i sterilisani filtriranjem kroz membranski filter sa porama 0,22 µm (Sartorius, Germany).

4.8.2.2. Mikrodiluciona metoda

Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) metanolnih ekstrakata gljiva ispitane su primenom mikrodilucione metode u 96-ćelijskim mikrotitar pločama (Klančnik et al., 2010). U ćelije mikrotitar ploče dodato je 50 µl napravljenih serija duplih razblaženja metanolnih ekstrakata gljiva i 50 µl suspenzije ispitivanih mikroorganizama. Finalna gustina ćelija mikroorganizama je iznosila približno 10^5 CFU ml⁻¹, dok su koncentracije ispitivanih metanolnih ekstrakata gljiva bile u opsegu od 0,3125 do 40 mg ml⁻¹.

Mikrotitar ploče sa bakterijskim suspenzijama su inkubirane na 37 °C tokom 24 h, dok su za ispitivanje antifungalnog delovanja ploče inkubirane na 30 °C tokom 72 h. Nakon inkubacije u svaku ćeliju je dodato 10 µl boje TTC (2,3,5-trifeniltetrazolijum hlorid, Sigma Chemical Co.) ili 10 µl resazurina (Sigma Chemical Co.). Pripremljene su i dve kontrole, odgovarajući bujon sa metanolnim ekstraktom gljiva (negativna kontrola) i suspenzija ispitivanog mikroorganizma (pozitivna kontrola). MIC je definisana kao najniža koncentracija ispitivanih metanolnih ekstrakata gljiva pri kojoj nema vidljivog rasta mikroorganizama, odnosno pri kojoj nije došlo do promene boje nakon dodatka TTC-a. U slučaju dodatka resazurina, najniža koncentracija pri kojoj je došlo do promene boje indikatora je definisana kao MIC (Sarker et al., 2007). Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija, odgovarajuće hranjive podloge su zasejane (ezom od 10 µl) sadržajem ćelija u kojima nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama, i nakon inkubacije brojane su porasle kolonije. MBC je definisana kao koncentracija pri kojoj je ubijeno 99,9% od početnog broja ćelija mikroorganizama (French, 2006).

4.8.2.3. Određivanje kinetike rasta mikroorganizama merenjem optičke gustine (OD)

Kinetika rasta mikroorganizama u prisustvu metanolnih ekstrakata gljiva određena je primenom 96-ćelijskih mikrotitar ploča, a po metodi Barbolina et al. (2016). Koncentracije metanolnih ekstrakata u opsegu od 1,25 do 40 mg ml⁻¹ korišćene su za analizu. Ćelije mikrotitar ploče sa uzorcima ekstrakata, kao i negativna i pozitivna kontrola pripremljene su na isti način kao i za mikrodilucionu metodu. Čitač mikrotitar ploča (ELx808, BioTek Instruments, Inc., USA) kontrolisan Gen5TM softverom je korišćen za merenje optičke gustine (engl. optical density, OD) na svakih 60 minuta tokom 24 h na talasnoj dužini od 630 nm. Tokom analize ploče su inkubirane na 37 °C i automatski mešane 10 sekundi pre svakog merenja.

4.8.2.4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Morfološke promene bakterijskih ćelija nastale pod dejstvom metanolnih ekstrakata gljiva posmatrane su pomoću skenirajuće elektronskog mikroskopa (SEM). Ćelije *S. Enteritidis* i *S. aureus* su zasejane na MH bujon i inkubirane 14 h na 37 °C. Suspenzije su potom podeljene u dve porcije. U prvu je dodat metanolni ekstrakt gljiva u koncentraciji MIC vrednosti, dok je druga korišćena kao kontrola (bez ekstrakta). Tako pripremljene suspenzije su inkubirane dodatnih 8 h na 37 °C. Tretirane i netretirane bakterije su potom centrifugirane (6000 rpm, 10 minuta na 4 °C) i fiksirane 2,5% glutaraldehydnom rastvorom u 0,1 mol dm⁻³ Na-fosfatnom puferu (pH 7,2) preko noći na 4 °C. Prekonoćne kulture su ponovo centrifugirane i tri puta isprane u 0,1 mol dm⁻³ Na-fosfatnom puferu (pH 7,2), a potom i dehidratirane u rastućim koncentracijama etanola 25, 50, 75, 90 i 2 x 100%, po 15 minuta. Nakon toga uzorci su sušeni u termostatu na 40 °C tokom 2 h ili pomoću uređaja za sušenje na kritičnoj tački model K850 (Quorum Technologies, UK) i tanak film ćelija je odmah nanet na nosač. Morfologija bakterijskih ćelija je ispitivana na JEOL JSM-6390LV mikroskopu (JEOL USA, Inc.) uz prethodno naparavanje uzoraka zlatom pomoću uređaja Baltec scd 005.

4.8.2.5. Transmisiono elektronska mikroskopija (TEM)

Ultrastrukturne promene bakterijskih ćelija nastale pod dejstvom metanolnih ekstrakata gljiva posmatrane su transmisionim elektronskim mikroskopom (TEM). Nakon ispiranja uzoraka u 0,1 mol dm⁻³ Na-fosfatnom puferu (pH 7,2), razdvaja se postupak pripreme za TEM i SEM. Isprani uzorci su naknadno fiksirani u 1% osmijum-tetraoksidu (OsO₄) tokom jednog sata na 4 °C, ponovo isprani u Na-fosfatnom puferu i dehidratirani u rastućim koncentracijama etanola 25, 50, 75, 90 i 2 x 100%, po 15 minuta. Uzorci su zatim tretirani 2 x propilen-oksidiom po 15 minuta i infiltrirani u smešu propilen-oxid: Epon (smola) u odnosu 1:1 preko noći na 4 °C. Usledile su tri izmene svežom smolom u trajanju od 60 minuta i kalupljenje na 60 °C tokom 48 – 72 h. Ultra tanki preseki (70 nm) ćelija pripremljeni pomoću ultramikrotoma (PT-XL PowerTomes, RMC Boeckeler) su postavljeni na bakarne mrežice (Sigma Aldrich).

Kontrastiranje preseka je postignuto primenom 2% rastvora uranil-acetata i 0,5 % rastvora olovo-citrata. Ultrastrukturne promene su ispitivane JEM-1400 Plus transmissionim elektronskim mikroskopom (JEOL USA, Inc.).

4.9. Statistička analiza podataka

Sva merenja su rađena u triplikatima, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Eksperimentalni podaci su podvrgnuti jednofaktorijelnoj analizi varijansi (ANOVA) i Tukey-evom testu (Tukey HSD) da bi se utvrdila značajnost razlika na nivou $\alpha \leq 0,05$ između srednjih vrednosti. Određivanje EC_{50} vrednosti linearnom regresionom analizom utvrđeno je online pomoću sajta <http://easycalculation.com/statistics/regression.php>. Za statističku analizu korišćeni su programi Origin Pro 9.0 i MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional). Korelacioni koeficijent, r , između EC_{50} vrednosti (određene u antioksidativnim metodama) i pojedinih okarakterisanih komponenti ekstrakata određen je online pomoću sajta <http://socscistatistics.com/tests/pearson/Default2.aspx>.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Se(IV)- i Se(VI)-obogaćeni zeolit

Usled sličnosti između oksoanjona arsena i seleno, i dokazanog afiniteta goetita i hematita prema selenit- i selenat-jonima (Rovira et al., 2008) ispitana je adsorpcija SeO_3^{2-} i SeO_4^{2-} -jona za površinu Fe(III)-modifikovanog zeolita. Kao nosač Se(IV) i Se(VI)-jona u ovoj disertaciji korišćen je Fe(III)-modifikovani zeolitski tuf sa lokaliteta Zlatokop, nedaleko Vranjske Banje.

Detaljna rendgenska analiza uzorka zeolitskog tufa pokazala je da on sadrži 72,6 mas.% klinoptilolita, dok se kao primese pojavljuju feldspat (14,6 mas.%) i kvarc (12,8 mas.%) (Stefanović et al., 2007). Termička ispitivanja pokazala su da zagrevanjem na 800 °C dolazi do dehidratacije tufa pri čemu gubitak mase iznosi 11 mas.%.

Rezultati elementne EDS-analize Fe(III)-modifikovanog zeolita, koji je korišćen kao adsorbent selenit i selenat-jona, ukazali su da se nakon modifikacije maseni udeo gvožđa u tufu značajno povećao, sa 0,05 at.% na 5,66 at.%. Ispitivanjem poroznosti dobijenog adsorbenta zaključeno je da se nakon modifikacije Fe(III)-jonima značajno povećala specifična površina klinoptilolita (sa 42 na 117 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) usled formiranja sekundarnog poroznog sistema na površini zeolita. TEM-analizom je pokazano da je ovaj sloj prisutan na površini zeolita amorfan pri čemu su čestice nanometarskih dimenzija i odgovaraju oksidu gvožđa (Jevtić et al., 2014).

Rezultati ispitivanja adsorpcionog kapaciteta Fe(III)-modifikovanog zeolita u odnosu na selenit i selenat jone iz vodene sredine pokazali su da njegova efikasnost zavisi od oksidacionog stanja seleno: iz rastvora selenit-jona Fe-obogaćeni zeolit veže 21 mg Se g^{-1} , dok iz rastvora sa selenatom veže 17 mg Se g^{-1} . Mehanizam adsorpcije analiziran je EXAFS- i XANES-metodom pri čemu je pokazano da se Se za površinu Fe-zeolita vezao uspostavljanjem Fe(III)-O-Se i Se-O-Si veza, te da se tokom adsorpcije selenata oko 63% Se redukovalo do selenita (Jevtić et al., 2014).

5.2. Određivanje brzine rasta micelije gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor* na laboratorijskim hranljivim podlogama

5.2.1. Određivanje brzine rasta micelije na čvrstom agaru

Rezultati dobijeni ispitivanjem brzine rasta micelije na čvrstom agaru pokazali su uticaj izvora Se i koncentracije u kojoj je dodat.

Rast micelije gljive *P. ostreatus* prikazan je u tabeli 5.1. Dodatak Na_2SeO_3 i Na_2SeO_4 u podlogu je značajno inhibirao rast micelije pri svim ispitivanim koncentracijama. Inhibicija rasta micelije bukovače za 50% u odnosu na kontrolu je primećena pri koncentracijama selena od $55,9 \mu\text{g ml}^{-1}$ dodatog u obliku selenita, odnosno $45,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ dodatog u vidu selenata. Ranija istraživanja potvrđuju dobijene rezultate da selenit pri koncentracijama selena većim od $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ inhibira rast micelije za preko 50% (Savić, 2014). Se(IV)-obogaćen zeolit (Se_{IV}-CLI) se pokazao kao najbolji izvor selena inhibirajući rast micelije gljive *P. ostreatus* za oko 15%, odnosno 25% pri koncentracijama od 50, odnosno $75 \mu\text{g ml}^{-1}$. Se(VI)-obogaćeni zeolit dodat u podlogu tako da ona sadrži maksimalnih $75 \mu\text{g Se ml}^{-1}$ inhibirao je rast micelije za približno 50%.

Tabela 5.1. Rast micelije gljive *P. ostreatus* na sladnom agaru sa dodatkom selena

konc. Se ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Prosečan porast micelije gljive <i>P. ostreatus</i> (%) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na_2SeO_3	Se _{VI} -CLI	Na_2SeO_4
0			100	
10	$86,4 \pm 2,3$	$79,8 \pm 1,7$	$75,4 \pm 3,6$	$72,3 \pm 2,5$
20	$86,1 \pm 1,9$	$67,4 \pm 3,9$	$71,2 \pm 3,3$	$62,7 \pm 1,1$
50	$85,6 \pm 4,7$	$52,6 \pm 1,0$	$65,8 \pm 4,5$	$47,5 \pm 1,4$
62,5	$81,2 \pm 4,4$	$47,3 \pm 2,6$	$59,5 \pm 4,0$	$40 \pm 3,1$
75	$76 \pm 2,2$	$38 \pm 3,9$	$52 \pm 1,6$	$35,2 \pm 1,0$

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3)

Rast micelije gljive *C. versicolor* je zavisio od koncentracije i vrste jedinjenja sa selenom dodate u podlogu (tabela 5.2). Dodatak selenita u podlogu u koncentraciji od $75 \mu\text{g Se ml}^{-1}$ nije značajnije inhibirao rast micelije (približno 20%) u poređenju sa kontrolom. Ista koncentracija dodata u obliku selenata redukovala je rast micelije za više od 70%, dok je pri koncentraciji od $56,7 \mu\text{g Se ml}^{-1}$ ustanovljena inhibicija rasta od 50%.

Kao najbolji izvor selena izdvojio se Se_{IV}-CLI čijim je dodatkom u podlogu micelija neometano rasla pri nižim koncentracijama, dok je pri većim koncentracijama (62,5 i 75 µg ml⁻¹) rast inhibiran za oko 5, odnosno 15%. Dodatak selena u podlogu u obliku Se_{VI}-CLI inhibirao je rast micelije za 50% u odnosu na kontrolu tek pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji.

Tabela 5.2. Rast micelije gljive *C. versicolor* na sladnom agaru sa dodatkom selena

konc. Se (µg ml ⁻¹)	Prosečan porast micelije gljive <i>C. versicolor</i> (%) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na ₂ SeO ₃	Se _{VI} -CLI	Na ₂ SeO ₄
0			100	
10	98,9 ± 1,0	96,4 ± 1,5	95,6 ± 1,6	89,1 ± 2,2
20	99,2 ± 1,0	93,5 ± 2,1	84,9 ± 3,0	77,8 ± 2,6
50	100 ± 0,8	88,3 ± 1,1	70,8 ± 2,6	54,6 ± 1,9
62,5	94,8 ± 1,3	84,9 ± 3,7	62,1 ± 1,9	46,4 ± 3,3
75	84,7 ± 2,1	78,1 ± 2,4	50,9 ± 3,8	28,2 ± 3,8

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

Rezultati prikazani u tabelama 5.1 i 5.2 dobijeni su na osnovu devetodnevnog praćenja rasta micelije, odnosno do potpunog prerastanja petri ploče od strane kontrole. Drugi autori (Milovanović et al., 2014) su ustanovili da koncentracije selena do 100 µg ml⁻¹ dodatog u obliku selenita nemaju toksično dejstvo na rast, ali se kao posledica dodatka Se vreme potrebno miceliji da preraste petri ploču (Ø 90 mm) udvostručuje u odnosu na kontrolu. Isti autori definišu koncentraciju od 500 µg Se ml⁻¹ kao minimalnu inhibitornu, odnosno kao koncentraciju koja u potpunosti inhibira rast micelije gljive *P. ostreatus*.

Dobijeni rezultati ukazuju da je inhibicija rasta micelije usko povezana sa oksidacionim brojem selena u ispitivanim jedinjenjima. Takođe, prethodna istraživanja pokazuju da dodatak zeolita ubrzava prorastanje supstrata, skraćuje vreme plodonošenja, daje veće prinose (i do dva puta) i utiče na povećanje sadržaja ugljenih hidrata, fenola, kao i pojedinih minerala u plodonosnim telima (Klaus et al., 2005; Vunduk et al., 2014; Vunduk et al., 2016).

5.2.2. Određivanje brzine rasta micelije na pšeničnoj slami

Rasta micelije gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor* na pšeničnoj slami zavisio je od vrste jedinjenja sa selenom kao i koncentracije dodate u podlogu.

U tabeli 5.3 prikazan je rast micelije gljive *P. ostreatus*. Kao najbolji izvor Se izdvojio se Se(IV)-modifikovani zeolit čiji je dodatak pri nižim koncentracijama uslovio stimulaciju rasta micelije, dok je pri višim koncentracijama rast inhibiran za oko 5%. Dodatkom Na-selenata u koncentraciji od 75 mg kg⁻¹ uočen je najveći procenat inhibicije rasta micelije koji je iznosio približno 20%.

Tabela 5.3. Rast micelije gljive *P. ostreatus* na pšeničnoj slami sa dodatkom selena

konc. Se (mg kg ⁻¹)	Prosečan porast micelije gljive <i>P. ostreatus</i> (%) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na ₂ SeO ₃	Se _{VI} -CLI	Na ₂ SeO ₄
0			100	
10	103,4 ± 1,8	95,1 ± 2,2	99,5 ± 0,6	92,2 ± 1,3
20	103,8 ± 1,4	93,8 ± 1,7	95,1 ± 1,2	90,5 ± 1,7
50	95,9 ± 1,6	92,2 ± 1,7	93,5 ± 2,5	88,3 ± 2,4
62,5	94,3 ± 2,0	89,4 ± 0,9	93,1 ± 1,7	87,8 ± 1,9
75	93,6 ± 1,7	88,7 ± 1,4	90,9 ± 2,7	81,3 ± 2,7

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

Rast micelije gljive *C. versicolor* prikazan je u tabeli 5.4. Dodatak Na-selenita i Na-selenata u koncentraciji od 75 mg kg⁻¹ inhibirao je rast micelije za približno 10, odnosno 25%. Se(IV)- i Se(VI)-modifikovani zeoliti su se izdvojili kao bolji izvori Se i njihovim dodatkom micelija je neometano rasla pri nižim koncentracijama dok je pri višim procenat inhibicije iznosio 5 do 10%.

Tabela 5.4. Rast micelije gljive *C. versicolor* na pšeničnoj slami sa dodatkom selena

konc. Se (mg kg ⁻¹)	Prosečan porast micelije gljive <i>C. versicolor</i> (%) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na ₂ SeO ₃	Se _{VI} -CLI	Na ₂ SeO ₄
0			100	
10	104,5 ± 3,2	95,7 ± 2,4	101,5 ± 2,3	90,8 ± 1,9
20	100,9 ± 1,6	94,8 ± 1,1	97,6 ± 1,5	87,9 ± 1,2
50	97,2 ± 1,5	92,1 ± 0,7	96,9 ± 1,7	87,2 ± 0,8
62,5	97,7 ± 1,9	91,6 ± 1,5	92,2 ± 1,2	79,4 ± 1,4
75	95,1 ± 0,9	90,8 ± 2,2	90,1 ± 1,6	75,2 ± 2,0

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

Na osnovu dobijenih rezultata za dalje analize odabrane su koncentracije od 50 i 75 mg kg⁻¹ za gljivu *P. ostreatus* i koncentracije od 50 i 62,5 mg kg⁻¹ za *C. versicolor*.

5.3. Usvajanje selena u plodonosna tela gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

Usvajanje selena iz različitih jedinjenja u karpoforu gljive *P. ostreatus*, dobijenom u prvom fruktifikacionom talasu, prikazano je u tabeli 5.5. Koncentracija selena akumulirana u karpoforu gljive *P. ostreatus* je bila oko 450 – 550 puta veća u odnosu na kontrolni uzorak kada je Se dodat u supstrat u koncentraciji od 75 mg kg⁻¹ u obliku Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI. Ista koncentracija dodata u vidu Na-selenata i Na-selenita povećala je sadržaj selena za oko 250 – 350 puta u poređenju sa kontrolnom gljivom. Dodatkom selena u supstrat u koncentraciji od 50 mg kg⁻¹ nije uočena veća razlika između tretmana i ovako odgajena gljiva je imala oko 150 – 200 puta više selena u plodonosnom telu u odnosu na kontrolni uzorak. Generalno, sa povećanjem koncentracije selena dodate u supstrat povećala se i usvojena koncentracija od strane gljive *P. ostreatus*.

Tabela 5.5. Usvajanje selena iz različitih jedinjenja u karpoforu gljive *P. ostreatus*

konc. Se (mg kg ⁻¹ supstrata)	Koncentracija selena u karpoforu gljive <i>P. ostreatus</i> (µg g ⁻¹ suve mase) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na ₂ SeO ₃	Se _{VI} -CLI	Na ₂ SeO ₄
0	0,5 ± 0,1			
50	84,5 ± 4,7 ^{2a}	93,1 ± 7,7 ^a	79,8 ± 5,0 ^a	86,0 ± 3,4 ^a
75	211,2 ± 9,3 ^b	110,9 ± 8,4 ^d	254,7 ± 10,4 ^a	160,4 ± 8,1 ^c

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Usvajanje selena iz različitih jedinjenja u plodonosno telo gljive *C. versicolor* prikazano je u tabeli 5.6. Za razliku od bukovače, veća koncentracija selena dodata u supstrat, rezultirala je smanjenjem sposobnosti akumulacije ovog elementa od strane gljive *C. versicolor*. Dodatkom selena u koncentraciji od 50 mg kg⁻¹ u vidu Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI, njegov sadržaj u plodonosnom telu se povećao za oko 400 – 470 puta, dok je pri koncentraciji od 62,5 mg Se kg⁻¹ sadržaj povećan za približno 350 puta u poređenju sa kontrolom. U slučaju dodatka Na-selenata i Na-selenita taj odnos je bio još izraženiji, i konstantovano je povećanje sadržaja selena od 440 – 530 puta pri koncentraciji od 50 mg kg⁻¹, naspram povećanja od 160 – 260 puta pri koncentraciji od 62,5 mg kg⁻¹ u odnosu na kontrolni uzorak.

Tabela 5.6. Usvajanje selena iz različitih jedinjenja u plodonosno telo gljive *C. versicolor*

konc. Se (mg kg ⁻¹ supstrata)	Koncentracija selena u plodonosnom telu gljive <i>C. versicolor</i> (µg g ⁻¹ suve mase) ¹			
	Se _{IV} -CLI	Na ₂ SeO ₃	Se _{VI} -CLI	Na ₂ SeO ₄
0			0,3 ± 0,1	
50	121,0 ± 6,9 ^{2c}	133,4 ± 10,2 ^{bc}	140,7 ± 3,8 ^b	160,0 ± 4,4 ^a
62,5	110,8 ± 4,1 ^a	49,5 ± 2,2 ^c	105,6 ± 3,0 ^a	78,3 ± 4,6 ^b

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD

Ustanovljeno je da usvojivost selena kod obe gljive, pri nižim koncentracijama (50 mg Se kg⁻¹), nije zavisila od oblika jedinjenja dodatog u supstrat, dok je pri višim koncentracijama (62,5 i 75 mg Se kg⁻¹) znatno bolja usvojivost, i do dva puta, uočena dodatkom Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI u poređenju sa Na₂SeO₃ i Na₂SeO₄. Pri ispitivanim koncentracijama selena i tretmanima kod gljive *P. ostreatus* nije primećena razlika u morfološkom izgledu plodonosnog tela u odnosu na kontrolnu gljivu. Obe ispitivane koncentracije selena (50 i 62,5 mg kg⁻¹) dodate u supstrat u obliku Na₂SeO₄ uslovile su kašnjenje u fruktifikaciji gljive *C. versicolor*, u proseku dve nedelje, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Dodatak Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI nije uslovio kašnjenje u formiranju plodonosnih tela gljive *C. versicolor*. Dobijeni rezultati potvrdili su ranija istraživanja koja su pokazala da usvajanje i prisustvo metala u plodonosnom telu gljiva zavisi od ekoloških faktora, genetskih karakteristika vrste, starosti gljive, kao i od oblika i koncentracije elemenata u supstratu odnosno zemljištu (Kalač i Svoboda, 2000).

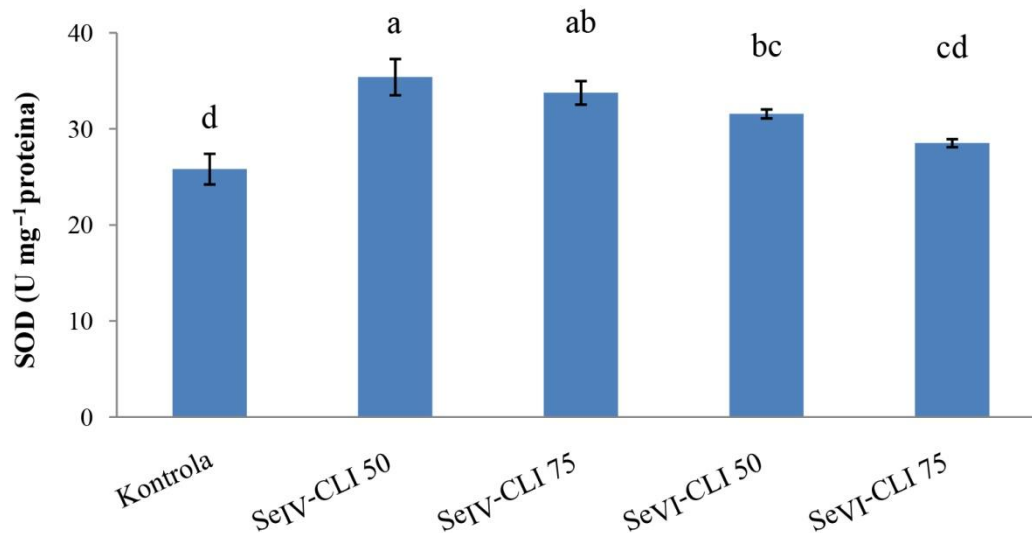
Selen je prisutan gotovo u svim zemljištima, ali se neretko u njima nalazi u nerastvornom obliku, vezan za različita organska jedinjenja (npr. ferohidrokside, minerale glina) što smanjuje i organičava njegovu dostupnost (Johnson et al., 2000). Akumulacija Se u biljke i gljive uslovljena je i pH vrednošću zemljišta. Ispitivanjem oblasti Kine pogođene Kešanskom bolešću, ustanovljeno je da kiseliya zemljišta sa pH ispod 7,6 smanjuju apsorpciju selena i za preko 90% u odnosu na ukupno prisutan selen (Johnson et al., 2000). Sa druge strane, poznato je da zeoliti imaju ulogu pH regulatora i da zahvaljujući negativno naelektrisanjoj alumosilikatnoj mreži mogu vezati vodonikov jon, što može biti jedno od objašnjenja bolje usvojivosti selena iz Se-obogaćenog zeolita (Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI) u odnosu na njegovu akumulaciju iz neorganskih soli.

Rezultati ranijih istraživanja potvrđuju sposobnost gljiva da akumuliraju selen u visokim koncentracijama koje dostižu vrednosti i do 800 puta veće u odnosu na kontrolu (Bhatia et al., 2013), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Ustanovljeno je i da je koncentracija selena u šeširu veća u odnosu na dršku, što ukazuje na nejednaku distribuciju ovog elementa u plodonosnom telu gljive tokom fruktifikacije (Falandysz, 2008; Savić, 2014). Takođe, poznato je i da je koncentracija selena u plodonosnom telu najveća u prvom fruktifikacionom talasu i da potom opada sa svakim narednim. Plodonosna tela gljive *P. ostreatus* dobijena u drugom talasu su imala oko 50% manje selena od onih u prvom talasu (da Silva et al., 2012). Rezultati navedenih istraživanja uslovlili su da se u ovoj disertaciji ispita sadržaj Se u karpoforu gljive *P. ostreatus* dobijenom u prvom fruktifikacionom talasu, kao i da se njegov sadržaj u narednim talasima i dršci ne analizira.

5.4. Određivanje aktivnosti enzimskih antioksidanata u svežim plodonosnim telima gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

5.4.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD)

Na grafiku 5.1 su predstavljene vrednosti za aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) u svežem karpoforu gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom selena u koncentracijama od 50 i 75 mg kg⁻¹ u vidu Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI, kao i kontrolnog uzorka. Dobijeni rezultati pokazuju da su srednje vrednosti aktivnosti SOD iznosile redom: 25,8 ± 1,6 U mg⁻¹ za kontrolni uzorak, 35,4 ± 1,9 U mg⁻¹ za uzorak Se_{IV}-CLI 50, 33,8 ± 1,2 U mg⁻¹ za Se_{IV}-CLI 75, 31,6 ± 0,5 U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 50 i 28,5 ± 0,4 U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 75. Jača aktivnost enzima (10 do 37%) gljive *P. ostreatus* je utvrđena u svim uzorcima odgajenim na supstratu sa dodatkom selena u odnosu na kontrolu. Ustanovljeno je i da je aktivnost SOD prvenstveno zavisila od oksidacionog broja i jača aktivnost je dokazana za uzorke Se_{IV}-CLI u odnosu na Se_{VI}-CLI. Zavisnost aktivnosti enzima od koncentracije selena dodate u podlogu (50 i 75 mg kg⁻¹) nije bila statistički značajna ($\alpha \leq 0,05$).

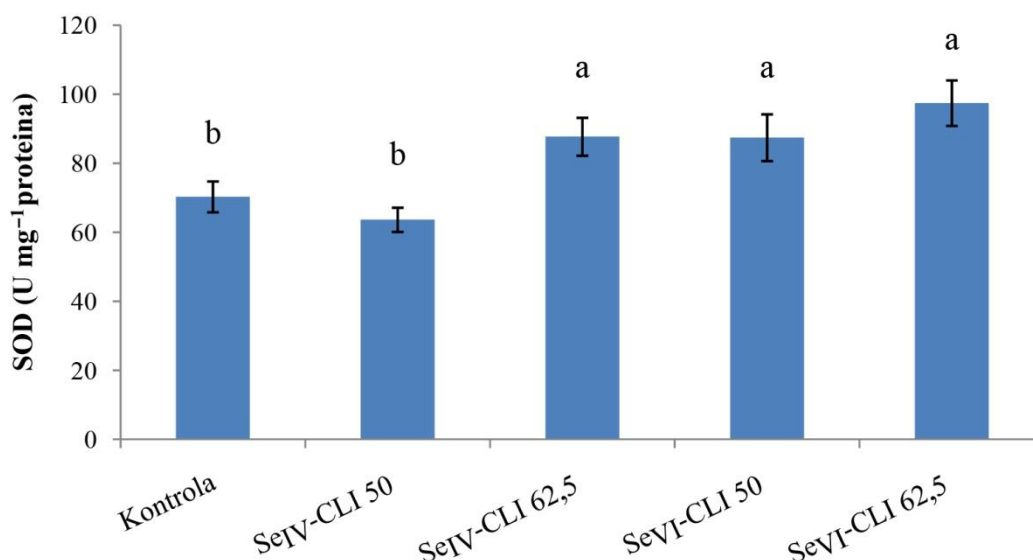


Grafik 5.1. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u karpoforu gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Rezultati pokazuju da su srednje vrednosti za aktivnost superoksid-dismutaze kod gljive *C. versicolor* iznosile $70,3 \pm 4,5$ U mg⁻¹ za kontrolni uzorak, $63,6 \pm 3,5$ U mg⁻¹ za uzorak Se_{IV}-CLI 50, $87,7 \pm 5,5$ U mg⁻¹ za Se_{IV}-CLI 62,5, $87,4 \pm 6,8$ U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 50 i $97,4 \pm 6,6$ U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 62,5 (grafik 5.2). Između Se_{IV}-CLI 50 i kontrolnog uzorka nije ustanovljena statistički značajna razlika ($\alpha \leq 0,05$) u aktivnosti superoksid dismutaze. Kod ostalih uzoraka sa selenom (Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 62,5) je dokazana jača aktivnost SOD u odnosu na kontrolu i to od 24 do 38%, i između njih nije utvrđena statistički značajna razlika na nivou $\alpha \leq 0,05$.

Takođe, vrednosti za aktivnost SOD dobijene za gljivu *C. versicolor* su bile oko 2,5 puta veće u odnosu na vrednosti za *P. ostreatus*.



Grafik 5.2. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u plodonosnom telu gljive *C. versicolor* odgajane na substratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Lignikolne gljive su prilikom razgradnje komponenata drveta, konstantno izložene velikim količinama reaktivnih vrsta, posebno reaktivnim vrstama kiseonika (ROS), a pojedine i same sintetišu (hidroksil - OH \cdot , hidroperoksil - HOO \cdot i peroksil - ROO \cdot radikale) kako bi degradirale lignin i celulozu (Hammel et al., 2002). Opstanak gljiva u sredini izuzetno bogatoj reaktivnim vrstama sugerise postojanje efikasnih unutarćelijskih sistema enzimske antioksidativne zaštite (Belinky et al., 2002). Ispitivanjem aktivnosti superoksid-dismutaze ustanovljeno je da gljive pokazuju više vrednosti u poređenju sa biljkama, algama i bakterijama (Cheng et al., 2012). Dobijene vrednosti su se kretale u opsegu od oko 50 U mg⁻¹ (*Flammulina velutipes*) pa do približno 400 U mg⁻¹ (*Coprinus comatus*) i jača aktivnost enzima je utvrđena u šeširu u odnosu na dršku. Kod većine ispitanih gljiva detektovane su MnSOD i/ili FeSOD izoforme, dok prisustvo CuZnSOD izoforme nije utvrđeno u analiziranim gljivama. Prisustvo jedino MnSOD izoforme ustanovljeno je i kod pet različitih vrsta gljiva koje izazivaju pojavu bele truleži drveća - *P. florida*, *T. versicolor*, *G. lucidum*, *L. edodes* i *Phanerochaete chrysosporium* (Belinky et al., 2002).

Pretpostavka je da je predominantna ekspresija MnSOD zajednička karakteristika gljiva koje izazivaju belu trulež. Kod pojedinih eukariota koji imaju i MnSOD i CuZnSOD utvrđeno je da se u prisustvu reaktivnih vrsta kiseonika prvo aktivira MnSOD izoforma. Kod submerzno gajene gljive *P. chrysosporium* nakon 96 h aktivnost superoksid-dismutaze je iznosila oko 20 U mg⁻¹ (Belinky et al., 2002) što su nešto niže vrednosti u odnosu na rezultate dobijene za plodonosna tela (Cheng et al., 2012). Aktivnost SOD je ispitivana i u različitim fazama razvoja gljive *P. ostreatus* i najniža vrednost od oko 5 U mg⁻¹ je utvrđena u fazi primordija, kod nedovoljno zrelih plodonosnih tela (srednje veličine) ova vrednost je bila približno 15 U mg⁻¹, dok je kod zrelih plodonosnih tela aktivnost iznosila 23 U mg⁻¹ (Cho et al., 2002), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji za kontrolu kod gljive *P. ostreatus*.

Prethodna istraživanja navode da gljiva *Cordyceps militaris* obogaćena selenom pokazuje značajno veću aktivnost superoksid-dismutaze od 57,23 U mg⁻¹ u poređenju sa kontrolom - 36,35 U mg⁻¹ (Dong et al., 2012). Enzim SOD katalizuje dismutaciju toksičnog superoksid anjon radikala (O₂^{·-}) u vodonik-peroksid i molekularni kiseonik, dok GSH-Px katalizuje glutacion-zavisnu redukciju H₂O₂ do H₂O. Dodatak selena može uticati na aktivnost GSH-Px s obzirom da ovaj enzim u svom aktivnom centru sadrži Se u formi selenocisteina, te se pretpostavlja da u stvari GSH-Px redukujući količinu vodonik-peroksida, produkta nastalog u reakciji koju katalizuje superoksid-dismutaza, utiče na povećanje aktivnosti SOD.

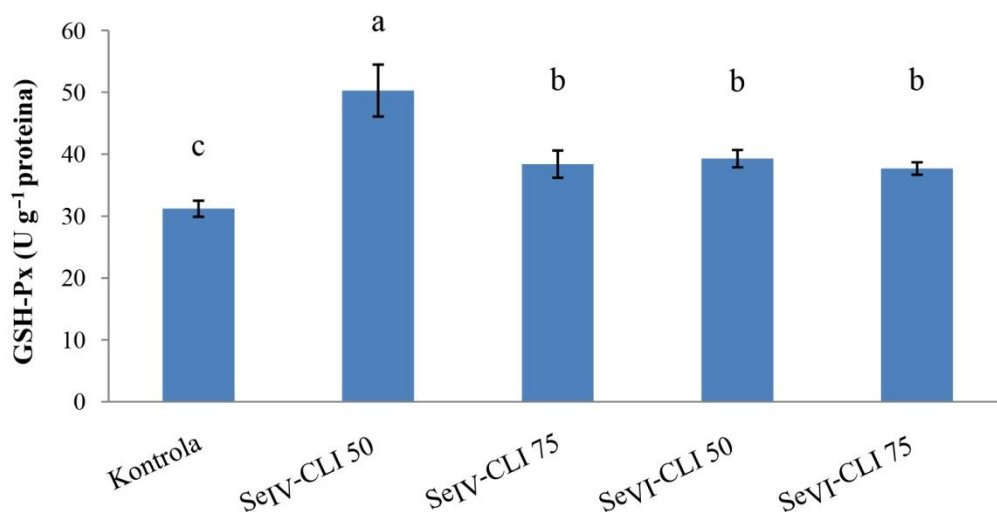
Brojne *in vivo* studije dokazuju da primena gljiva u ishrani utiče na povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT i GSH-Px) što za posledicu ima smanjenje oksidativnih oštećenja biomolekula, redukciju veličine tumora, usporavanje starenja i duži životni vek eksperimentalnih životinja (Jayakumar et al., 2007; Li et al., 2007; Yan i Chang, 2012). Za gljivu *P. ostreatus* obogaćenu selenom i cinkom je, u *in vivo* eksperimentima na miševima hranjenim prahom ove gljive, utvrđeno da statistički značajno utiče na povećanje aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite (superoksid-dismutaze i glutacion-peroksidaze), da utiče na smanjenje nastanka malondialdehida (produkta lipidne peroksidacije), kao i da ispoljava antitumorno dejstvo kroz inhibiciju rasta tumora pluća (Yan i Chang, 2012).

U *in vivo* studiji sprovedenoj 2007. godine dokazano je da konzumacija etanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* kod miševa starih 24 meseca značajno povećava sadržaj redukovano glutaciona (GSH), vitamina C i E, kao i aktivnost enzimskih antioksidanasa – SOD, CAT i GSH-Px (Jayakumar et al., 2007). Dobjene vrednosti za većinu ovih parametara (nakon tretmana ekstraktom) se nisu statistički značajno razlikovale od parametara određenih kod mladih miševa starosti 4 meseca. U drugoj studiji, sprovedenoj iste godine, se navodi da je polisaridni-peptidni kompleks izolovan iz gljive *P. abalonus* odgovoran za povećanje aktivnosti enzima antioksidativne zaštite *in vivo* (Li et al., 2007).

Poznato je da gljive nakon branja nastavljaju da se razvijaju, međutim u uslovima nedostatka vode i nutrijenata indukovani su brojni fiziološki, biohemijski i poremećaji na molekularnom nivou što sve utiče na sam kvalitet proizvoda. Većina ovih promena direktno ili indirektno vodi ka formiranju slobodnih radikala i reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), koje neutrališu antioksidativni enzimi, prvenstveno SOD (Henderson et al., 2005). Veće koncentracije superoksid-dismutaze ustanovljene kod većine gljiva obogaćenih selenom ukazuju da bi one duži vremenski period, nakon branja, mogle zadržati boju, teksturu i aromu, a samim tim i kvalitet, kao i da bi njihova primena *in vivo* uticala na povećanje enzimske antioksidativne zaštite.

5.4.2. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze (GSH-Px)

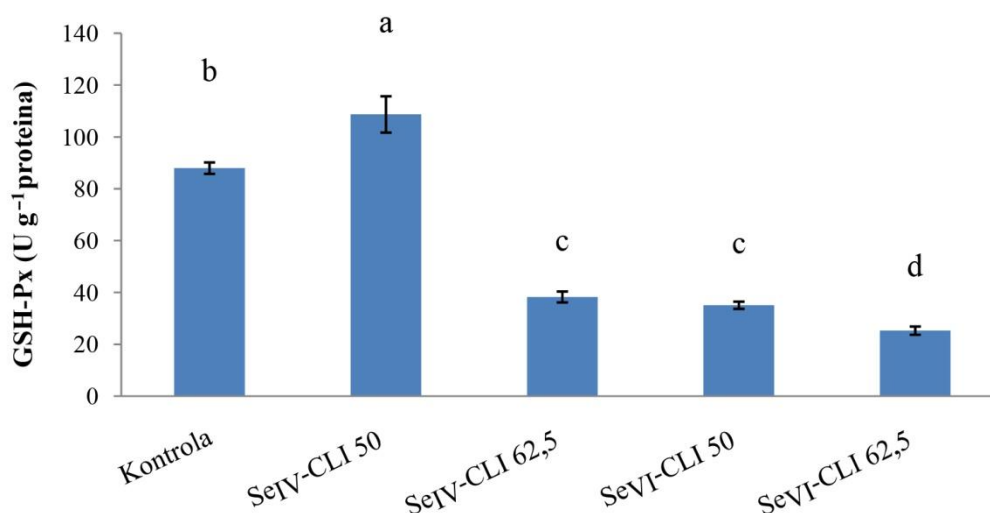
Srednje vrednosti za aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) za gljivu *P. ostreatus* (grafik 5.3) su bile $31,2 \pm 1,3 \text{ U g}^{-1}$ za kontrolu, $50,3 \pm 4,2 \text{ U g}^{-1}$ za uzorak Se_{IV}-CLI 50, $38,4 \pm 2,2 \text{ U g}^{-1}$ za Se_{IV}-CLI 75, $39,3 \pm 1,4 \text{ U g}^{-1}$ za Se_{VI}-CLI 50 i $37,7 \pm 1,0 \text{ U g}^{-1}$ proteina za Se_{VI}-CLI 75. Aktivnost enzima GSH-Px gljive *P. ostreatus* u svim uzorcima odgajenim na supstratu sa dodatkom selena se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolu ($\alpha \leq 0,05$). Najjača aktivnost je dokazana za uzorak Se_{IV}-CLI 50 i bila je oko 1,6 puta veća od kontrole.



Grafik 5.3. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u karpoforu gljive *P. ostreatus* odgajane na supstratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Na grafiku 5.4 su predstavljene vrednosti za aktivnost enzima glutation-peroksidaze koje su kod gljive *C. versicolor* iznosile $88,0 \pm 2,2 \text{ U g}^{-1}$ za kontrolni uzorak, $108,7 \pm 7,0 \text{ U g}^{-1}$ za uzorak Se_{IV}-CLI 50, $38,3 \pm 2,1 \text{ U g}^{-1}$ za Se_{IV}-CLI 62,5, $35,1 \pm 1,4 \text{ U g}^{-1}$ za Se_{VI}-CLI 50 i $25,3 \pm 1,6 \text{ U g}^{-1}$ proteina za Se_{VI}-CLI 62,5. Najveća koncentracija enzima detektovana je za uzorak Se_{IV}-CLI 50 i bila je oko 1,2 puta veća od kontrole, za ostale uzorke sa selenom je utvrđena statistički značajno niža aktivnost u poređenju sa kontrolom. Najniža koncentracija enzima GSH-Px je ustanovljena za uzorak Se_{VI}-CLI 62,5 koja je oko 3,5 puta bila niža od kontrolnog uzorka.



Grafik 5.4. Aktivnost glutation-peroksidaze (GSH-Px) u plodonosnom telu gljive *C. versicolor* odgajane na supstratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Dodatak selena u supstrat za gajenje gljive *P. ostreatus* je statistički značajno uticao na povećanje aktivnosti enzima glutation-peroksidaze. Brojna istraživanja su dokazala da gljive imaju sposobnost da akumuliraju selen i da ga iz neorganskih jedinjenja transformišu u organske oblike, ugrađujući ga prevashodno u proteine (Se-Met i Se-Cys) (Zhao et al., 2004b; Bhatia et al., 2013; Egressy-Molnár et al., 2016). Takođe je poznato da enzim GSH-Px u svom aktivnom centru sadrži Se u formi selenocisteina, te se jača enzimska aktivnost u uzorcima gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom mogla očekivati.

Aktivnost glutation-peroksidaze se za ispitivane uzorke gljive *C. versicolor* smanjivala sledećim redosledom: Se_{IV}-CLI 50 > kontrola > Se_{IV}-CLI 62,5 \approx Se_{VI}-CLI 50 > Se_{VI}-CLI 62,5. Za uzorke obogaćene selenom, sa izuzetkom uzorka Se_{IV}-CLI 50, je utvrđena slabija aktivnost enzima u poređenju sa kontrolom. Kako GSH-Px i CAT dele isti supstrat, dobijeni rezultati se mogu objasniti aktivnošću katalaze koja se za ovu gljivu smanjivala sledećim redosledom: Se_{VI}-CLI 62,5 > Se_{VI}-CLI 50 \approx Se_{IV}-CLI 62,5 > kontrola > Se_{IV}-CLI 50.

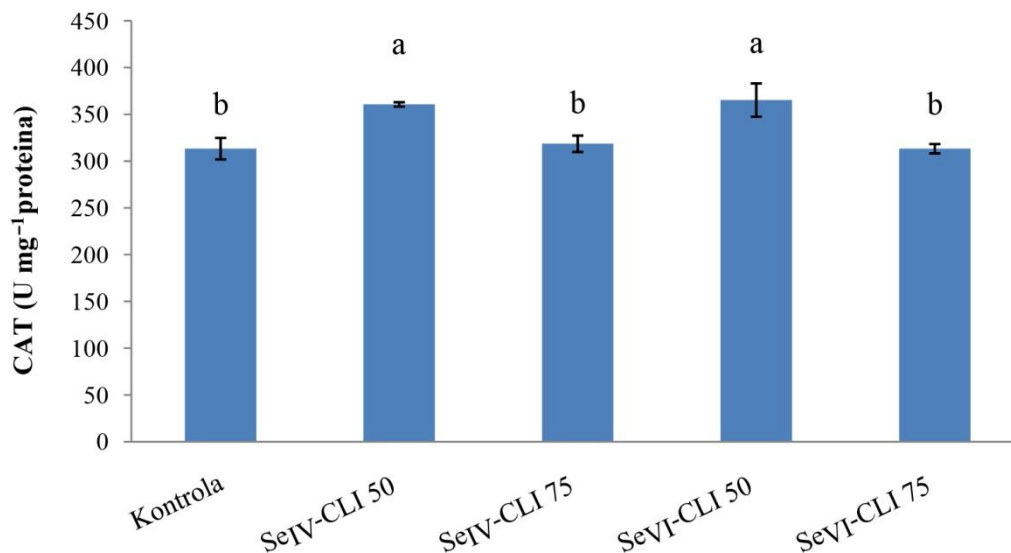
Naime, za uzorke sa najjačom aktivnošću katalaze dokazana je najslabija aktivnost glutacion-peroksidaze i obrnuto. Glutacion-peroksidaza ima veoma važnu ulogu u primarnoj odbrani pri niskim koncentracijama H_2O_2 jer ispoljava veći afinitet ka ovom supstratu u odnosu na katalazu, dok je u uslovima izrazitog oksidativnog stresa CAT značajniji enzim (Kruidenier i Verspaget, 2002).

Kao posledica čestog presejavanja gljiva na hranljive podloge dolazi do njihove depigmentacije, usporava se rast micelije, gubi se aseksualna i seksualna sposobnost razmnožavanja i sposobnost formiranja plodonosnog tela (Zheng et al., 2011). U studiji sprovedenoj 2013. godine iz *Aspergillus nidulans* izolovan je gen za antioksidativni enzim glutacion-peroksidazu (*gpxA*) i kloniran u gljivu *C. militaris* koja je prethodno izgubila sposobnost formiranja plodonosnog tela. Mutant gljive *C. militaris* (sa unetim genom) obnovio je mogućnost formiranja plodonosnog tela, a aktivnost enzima se povećala za oko 2,6 puta (sa 5 na 13 U g^{-1} proteina). Ovim istraživanjem dokazana je veza između degenerativnih promena i nagomilavanja reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u ćeliji, kao i da enzim glutacion-peroksidaza može reverzibilno da utiče na pomenute promene (Xiong et al., 2013).

Ranija istraživanja pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u aktivnosti enzima glutacion-peroksidaze između šešira i drške (Savoie et al., 2008).

5.4.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)

Rezultati pokazuju da su srednje vrednosti za aktivnost katalaze kod gljive *P. ostreatus* iznosile redom: $313,3 \pm 11,5$ U mg^{-1} za kontrolni uzorak, $360,7 \pm 2,4$ U mg^{-1} za uzorak Se_{IV} -CLI 50, $318,6 \pm 8,8$ U mg^{-1} za Se_{IV} -CLI 75, $365,3 \pm 17,8$ U mg^{-1} za Se_{VI} -CLI 50 i $313,3 \pm 5,0$ U mg^{-1} za Se_{VI} -CLI 75 (grafik 5.5). Uzorci Se_{IV} -CLI 75 i Se_{VI} -CLI 75 se nisu statistički značajno razlikovali od kontrole ($\alpha \leq 0,05$). Jača aktivnost enzima katalaze, za oko 16%, je ustanovljena za uzorke Se_{IV} -CLI 50 i Se_{VI} -CLI 50 što ukazuje da je aktivnost zavisila od koncentracije selena dodate u podlogu, dok oksidacioni broj nije imao uticaja.

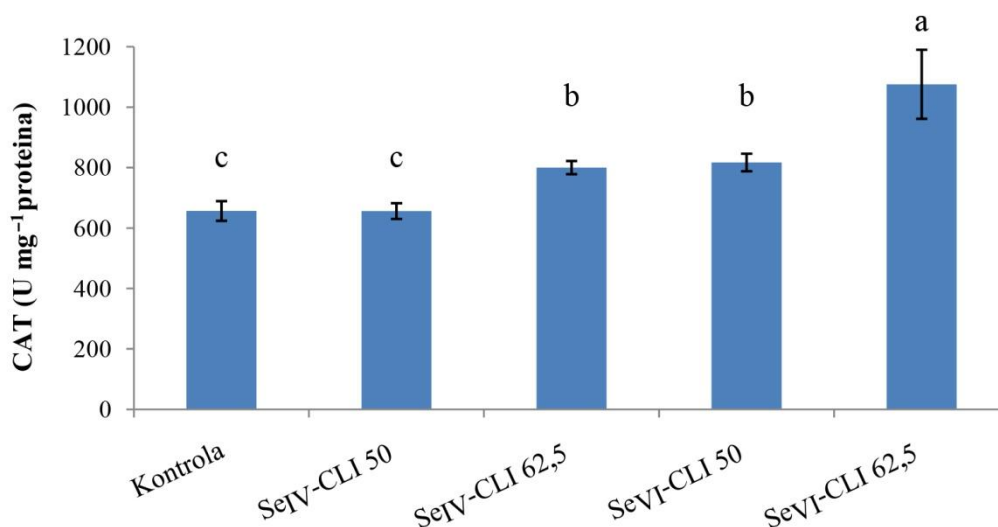


Grafik 5.5. Aktivnost katalaze (CAT) u karpoforu gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Na grafiku 5.6 su predstavljene vrednosti za aktivnost enzima katalaze (CAT) u svežem plodonosnom telu gljive *C. versicolor* odgajene na supstratu sa dodatkom selena u koncentracijama od 50 i 62,5 mg kg⁻¹ u vidu Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI, kao i kontrolnog uzorka. Dobijeni rezultati pokazuju da su srednje vrednosti aktivnosti CAT bile 656,5 \pm 32,5 U mg⁻¹ za kontrolni uzorak, 656,0 \pm 26,1 U mg⁻¹ za uzorak Se_{IV}-CLI 50, 810,0 \pm 21,8 U mg⁻¹ za Se_{IV}-CLI 62,5, zatim 817,0 \pm 29,1 U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 50 i 1075,8 \pm 114,4 U mg⁻¹ za Se_{VI}-CLI 62,5. Uzorak Se_{IV}-CLI 50 se jedini nije statistički značajno razlikovao od kontrole, uzorci Se_{IV}-CLI 62,5 i Se_{VI}-CLI 50 su pokazali jaču aktivnost za oko 24%, dok je uzorak Se_{VI}-CLI 62,5 ispoljio najjaču aktivnost katalaze koja je za približno 65% bila veća u odnosu na kontrolu.

Dobijene vrednosti za aktivnost katalaze za gljivu *C. versicolor* su bile oko dva puta veće u odnosu na vrednosti za *P. ostreatus*.



Grafik 5.6. Aktivnost katalaze (CAT) u plodonosnom telu gljive *C. versicolor* odgajane na supstratu sa dodatkom različite koncentracije selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$). Srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Prethodna istraživanja pokazuju da saprofitne gljive ispoljavaju jaču aktivnost katalaze u odnosu na mikorizne, verovatno kao rezultat intenzivnije razgradnje ligno-celuloznog materijala (Kojo i Lodenius, 1989). Isti autori su ustanovili da je aktivnost katalaze saprobnih gljiva u proseku 27 puta jača u odnosu na mikorizne. U drugom istraživanju najjača aktivnost katalaze detektovana je kod vrsta iz roda *Macrolepiota* i *Russula* dok je najniža aktivnost zabeležena kod *B. edulis* i *P. ostreatus* (Georgescu et al., 2016). Jača aktivnost katalaze smanjuje nivo vodonik-peroksida u ćeliji, sprečava stvaranje OH[•] (hidroksil radikala) i štiti ćelijske membrane kao i biomolekule poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida. Ispitivanjem aktivnosti katalaze u gljivi *A. bisporus* utvrđeno je da je aktivnost enzima u dršci bila 420 U mg⁻¹, dok je u šeširu aktivnost bila veća i iznosila je 560 U mg⁻¹ proteina (Savoie et al., 2008). Istraživano je i kako različiti procesi sušenja utiču na aktivnost katalaze, i ustanovljeno je da se aktivnost i dalje može detektovati kod gljiva sušenih na suncu, dok je pri sušenju u tankom fluidizovanom sloju sva enzimska aktivnost izgubljena (Arumuganathan et al., 2010).

Kako je poznato da gljive mogu da akumuliraju različite metale, a pojedine u veoma visokim koncentracijama, i njihov uticaj na aktivnost katalaze je ispitan. Pozitivna korelacija je utvrđena između aktivnosti katalaze i sadržaja žive (Kojo i Lodenius, 1989), bakra kao i kombinacije cinka, bakra i mangana, dok gvožđe nije statistički značajno uticalo na aktivnost enzima (Wang et al., 2006).

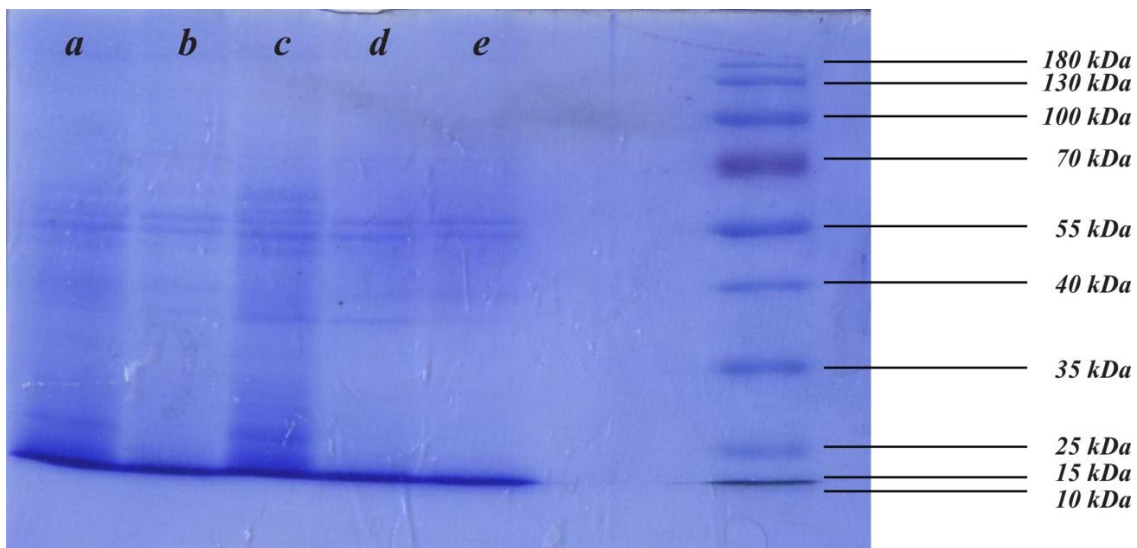
U *in vivo* studijama je pokazano da primena gljiva u ishrani eksperimentalnih životinja utiče na povećanje aktivnosti katalaze u jetri, bubrezima, srcu i mozgu miševa (Lee et al., 2003; Jayakumar et al., 2007), a za jedinjenje metil linoleat izolovano iz gljive *G. lucidum* je utvrđeno da stimuliše ekspresiju gena za katalazu koja je regulisana na nivou transkripcije (Lee et al., 2003).

5.4.4. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)

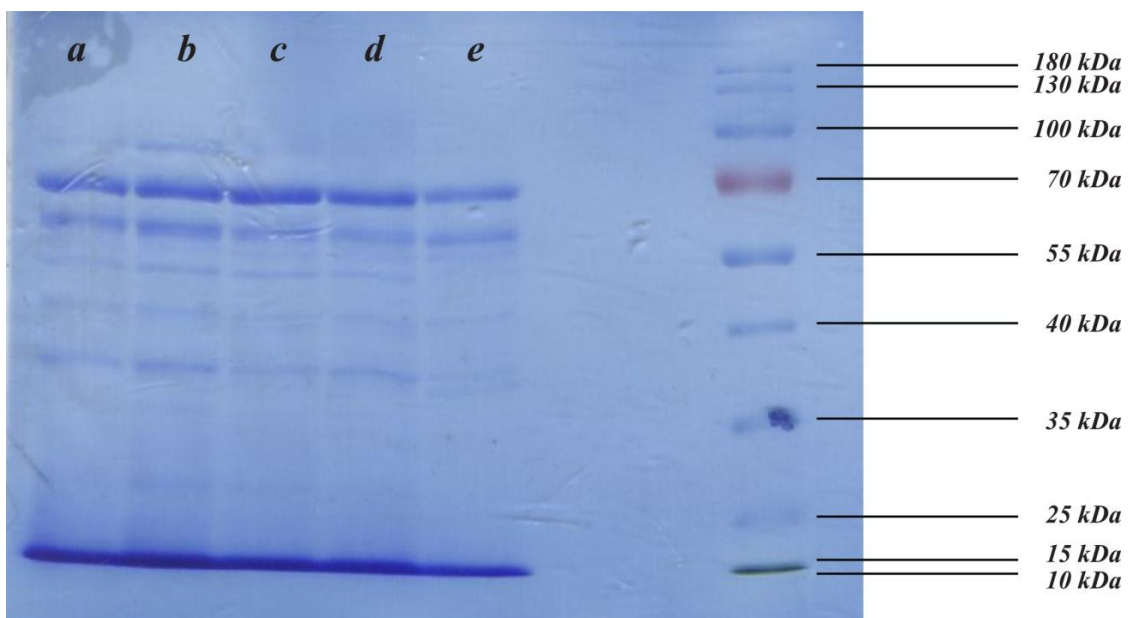
Proteini izolovani iz gljive *P. ostreatus* i gljive *C. versicolor* analizirani su primenom SDS-PAGE elektroforeze i dobijene proteinske frakcije su razvrstane prema molekulskim masama (kDa).

Kod gljive *P. ostreatus* detektovano je približno sedam frakcija i njihova molekulska masa se kretala u opsegu od 25 kDa do 70 kDa (slika 5.1). Najveći broj proteinskih frakcija (preko 50%) se nalazio u regionu između 45 kDa i 65 kDa, sa dominantnim frakcijama od oko 51 kDa, 55 kDa i 58 kDa. U uzorcima su primećene i frakcije od oko 38 kDa i 25 kDa. Proteini sa molekulskom masom većom od 70 kDa nisu detektovani kod ispitivanih uzoraka. Između uzoraka sa selenom (slika 5.1 b-d) i kontrole (slika 5.1 a) nisu uočene razlike u molekulskoj masi proteina.

Veći broj proteinskih frakcija, oko deset, i širi opseg molekulskih masa, od oko 25 kDa do 100 kDa, ustanovljen je kod gljive *C. versicolor* (slika 5.2) u poređenju sa gljivom *P. ostreatus*. Kod svih uzoraka ove gljive dominantne su bile frakcije od približno 70 kDa, 63 kDa, 55 kDa, 45 kDa, 38 kDa i 25 kDa. Uočeno je i da selen prisutan u uzorcima nije uticao na promenu molekulskih masa.



Slika 5.1. SDS-PAGE analiza proteina gljive *P. ostreatus* metodom po Lemli-ju.
a - kontrola, b - Se_{IV}-CLI 50, c - Se_{IV}-CLI 75, d - Se_{VI}-CLI 50 i e - Se_{VI}-CLI 75



Slika 5.2. SDS-PAGE analiza proteina gljive *C. versicolor* metodom po Lemli-ju.
a - kontrola, b - Se_{IV}-CLI 50, c - Se_{IV}-CLI 62,5, d - Se_{VI}-CLI 50 i e - Se_{VI}-CLI 62,5

Za enzim lakazu, sa molekulskom masom od 58 kDa, koji je izolovan i prečišćen iz gljive *P. ostreatus* je dokazano da ispoljava antiviralno dejstvo kroz inhibiciju replikacije hepatitis C virusa (El-Fakharany et al., 2010). Utvrđeno je da enzim lakaza izolovan iz gljive *C. versicolor* ima molekulsku masu od oko 97 kDa, što predstavlja značajno veću vrednost u odnosu na druge izolovane lakaze (Han et al., 2005). Za enzim D-glukoza oksidaza detektovan u gljivi *P. ostreatus* je utvrđeno da ima molekulsku masu od 70 kDa (Shin et al., 1993) i da je karakterističan za gljive koje izazivaju belu trulež.

U prethodnim istraživanjima je ustanovljeno da sve proteinske frakcije mogu usvojiti selen, od najmanjih od oko 8,7 kDa pa sve do frakcija od približno 142,5 kDa. Utvrđeno je i da se najveći procenat selena (oko 58%) usvaja u frakcije sa molekulskom masom manjom od 16 kDa, kao i da sa porastom molekulske mase opada koncentracija selena prisutna u njima. Takođe, selen nije imao uticaja na promenu molekulskih masa proteina (Zhao et al., 2004b; Liu et al., 2011).

Dokazano je da do niskog sadržaja proteinskih frakcija sa molekulskim masama iznad 150 kDa dolazi usled oštećenja ćelijskog zida gljiva ili aktivnosti endogenih proteaza. Niske koncentracije selena stimulišu aktivnost proteaza koje hidrolizuju albumine i globuline do aminokiselina i/ili peptida malih molekulskih masa (Liu et al., 2011), te su se dobijene proteinske frakcije sa molekulskim masama ispod 100 kDa mogle i očekivati.

5.5. Prinos ekstrakata gljiva

Prinos metanolnih ekstrakata gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* prikazan je u tabeli 5.7. Nije primećena statistički značajna razlika u prinosu ekstrakata dobijenih iz kontrolnih i gljiva obogaćenih selenom. Prinos ekstrakata gljive *P. ostreatus* je bio oko pet puta veći u poređenju sa ekstraktima izolovanim iz gljive *C. versicolor*. Razlike u prinosu između gljiva mogu se pripisati činjenici da pripadaju različitim rodovima, kao i različitom vremenu branja.

Tabela 5.7. Prinos metanolnih ekstrakata gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor*

Metanolni ekstrakti	Prinos ekstrakata gljiva (% suve mase) ¹	
	<i>P. ostreatus</i>	<i>C. versicolor</i>
Kontrola	24,13 ± 0,94 ^{2ab}	5,68 ± 0,43 ^a
Se _{IV} -CLI 50	24,36 ± 0,80 ^{ab}	5,97 ± 0,31 ^a
Se _{VI} -CLI 50	23,05 ± 1,10 ^b	6,35 ± 0,67 ^a
Se _{IV} -CLI 62,5	/	5,10 ± 0,55 ^a
Se _{VI} -CLI 62,5	/	5,39 ± 0,53 ^a
Se _{IV} -CLI 75	25,82 ± 0,87 ^a	/
Se _{VI} -CLI 75	25,11 ± 1,26 ^{ab}	/

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Za gljive je ustanovljeno da procentualno sadrže više polarnih komponenti (Vaskovsky et al., 1998), te se jedinjenja sa –OH i –COOH funkcionalnim grupama, poput fenolnih kiselina, lignana, flavonoida mogu lako ekstrahovati polarnim rastvaračima (Wong i Chye, 2009). Prethodna istraživanja dokazuju da se većina niskomolekularnih jedinjenja gljiva, poput fenola i terpena, ekstrahuje primenom metanola kao rastvarača (Cheung i Cheung, 2005). Primenom RP-HPLC analize, u metanolnom ekstraktu gljive *C. versicolor* detektovane su brojne komponente karakteristične za fenolna jedinjenja i terpenoide - poput ganoderinske kiseline (Harhaji et al., 2008). Za alkoholne rastvarače, između ostalih i metanol, se pretpostavlja da oštećuju ćelijsku membranu i tako ekstrahuju značajne količine unutarćelijskog materijala (Ghisalberti, 1993).

5.6. Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

5.6.1. Ukupan sadržaj selena u metanolnim ekstraktima

U metanolnim ekstraktima izolovanim iz gljive *P. ostreatus*, obogaćene selenom kao i kontrolnog uzorka, analiziran je sadržaj selena (tabela 5.8). U plodonosnom telu gljive *P. ostreatus* utvrđen je visok sadržaj selena od 80 do 250 $\mu\text{g g}^{-1}$ (tabela 5.5), dok je u metanolnim ekstraktima sadržaj bio dosta niži i kretao se u opsegu od oko 8 – 27 $\mu\text{g g}^{-1}$, što ukazuje da se kod ove gljive selen pretežno nalazi u jedinjenjima nerastvornim u alkoholima. Ranija istraživanja pokazuju da se selen u vrstama iz roda *Pleurotus* pretežno nalazi u proteinskim i polisaharidnim frakcijama rastvornim u vodi (Savić, 2014). Utvrđeno je i da se najveći procenat selena nalazi u vodorastvornim proteinima, nešto niži sadržaj detektovan je u proteinskim frakcijama rastvornim u alkalijama, dok je najniža koncentracija ustanovljena u proteinima rastvornim u alkoholima (Zhao et al., 2004b).

Tabela 5.8. Ukupan sadržaj selena u metanolnim ekstraktima gljive *P. ostreatus*

konc. Se (mg kg^{-1} supstrata)	Koncentracija selena u metanolnom ekstraktu gljive <i>P. ostreatus</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase) ¹	
	Se _{IV} -CLI	Se _{VI} -CLI
0		0,22 ± 0,01
50	7,8 ± 0,2 ^{2b}	9,1 ± 0,3 ^a
75	21,0 ± 1,1 ^b	27,3 ± 1,5 ^a

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Sadržaj selena u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*, sa i bez dodatog selena, prikazan je u tabeli 5.9. Gotovo sav selen prisutan u gljivi *C. versicolor* je ekstrahovan metanolom i njegov sadržaj je iznosio od oko 85 do 120 $\mu\text{g g}^{-1}$ u ekstraktu, dok je u plodonosnom telu bio u opsegu od 105 do 140 $\mu\text{g g}^{-1}$ (tabela 5.6). Dobijeni rezultati ukazuju na drugačiju distribuciju selena u ispitivanim gljivama. U metanolnom ekstraktu gljive *L. edodes* dokazan je visok sadržaj selena koji se nije statistički značajno razlikovao od koncentracije detektovane u vodenom ekstraktu (Turlo et al., 2010).

Tabela 5.9. Ukupan sadržaj selena u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

konc. Se (mg kg ⁻¹ supstrata)	Koncentracija selena u metanolnom ekstraktu gljive <i>C. versicolor</i> (μg g ⁻¹ suve mase) ¹	
	Se _{IV} -CLI	Se _{VI} -CLI
0		0,47 ± 0,03
50	110,1 ± 3,4 ^{2b}	119,3 ± 2,6 ^a
62,5	96,0 ± 4,4 ^a	86,3 ± 4,1 ^b

¹Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

5.6.2. Polisaharidne komponente

Ukupan sadržaj polisaharida, glukana, kao i α - i β -glukana u ispitivanim ekstraktima prikazan je u tabeli 5.10 za gljivu *P. ostreatus* i tabeli 5.11 za gljivu *C. versicolor*. Povećan sadržaj ukupnih polisaharida, kao i ukupnih i β -glukana primećen je kod svih ekstrakata dobijenih iz gljiva obogaćenih selenom u odnosu na kontrolne ekstrakte. Ekstrakti dobijeni iz gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom selena su imali od 7 do 13% više polisaharida u odnosu na kontrolu, dok je sadržaj β -glukana bio veći za oko 5 do 16%. Sadržaj polisaharida u ekstraktima gljive *C. versicolor* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Dodatkom 50 mg Se kg⁻¹ primećen je značajno veći sadržaj polisaharida (13 do 19%) i β -glukana (17 do 37%) u poređenju sa kontrolnim ekstraktom, dok se pri koncentraciji od 62,5 mg Se kg⁻¹ sadržaj polisaharida nije značajnije menjao.

Ranija istraživanja, takođe, pokazuju da je obogaćivanje selenom uticalo na kvantitativno povećanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata kod različitih vrsta gljiva iz roda *Pleurotus* (Savić, 2014), kao i kod različitih biljaka, poput krompira (Turakainen et al., 2004), kafe (Mazzafera, 1998) i pasulja (Arvy, 1989). Poznato je da selen stimuliše metabolizam glukoze i reguliše glikolizu, kao i sintezu masnih kiselina i pentoznofosfatni put (Zeng i Combos, 2008). Kliničke studije o dijabetesu potvrđuju hipotezu da je metabolizam selena povezan sa metabolizmom ugljenih hidrata i lipida (Ogawa-Wong et al., 2016), ali da su potrebna dalja istraživanja kako bi se ustanovio mehanizam dejstva.

Tabela 5.10. Ukupan sadržaj polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima gljive *P. ostreatus*

<i>P. ostreatus</i>	Ukupan sadržaj polisaharida (mg g ⁻¹)	Sadržaj glukana (mg g ⁻¹) ¹		
		Ukupan	α	β
Kontrola	496,3 ± 10,7 ^{2c}	397,0 ± 8,2 ^c	2,2 ± 0,3 ^c	394,8 ± 9,3 ^c
Se _{IV} -CLI 75	530,6 ± 9,5 ^b	425,8 ± 10,8 ^b	2,4 ± 0,1 ^c	423,4 ± 11,5 ^b
Se _{VI} -CLI 75	556,2 ± 13,3 ^{ab}	461,4 ± 9,9 ^a	1,6 ± 0,2 ^c	459,8 ± 10,2 ^a
Se _{IV} -CLI 50	561,5 ± 12,9 ^a	431,8 ± 7,4 ^b	6,4 ± 0,7 ^a	425,4 ± 8,7 ^b
Se _{VI} -CLI 50	555,9 ± 7,6 ^{ab}	417,4 ± 6,7 ^{bc}	4,6 ± 0,5 ^b	412,8 ± 7,9 ^{bc}

¹Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Procenat β -glukana u odnosu na ukupan sadržaj glukana je u svim ekstraktima bio izuzetno visok (97,0 do 99,5%), što ukazuje da su glukani prevashodno povezani β -glikozidnim vezama. Dobijene niske vrednosti za sadržaj α -glukana su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima u kojima se navodi da je njihova koncentracija u različitim jestivim gljivama najčešće ispod 1% računato na suhu masu (Lee i Kim, 2005).

Tabela 5.11. Ukupan sadržaj polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

<i>C. versicolor</i>	Ukupan sadržaj polisaharida (mg g ⁻¹)	Sadržaj glukana (mg g ⁻¹) ¹		
		Ukupan	α	β
Kontrola	351,0 ± 19,0 ^{2b}	203,0 ± 11,0 ^c	6,0 ± 0,5 ^a	197,0 ± 9,0 ^c
Se _{IV} -CLI 62,5	353,3 ± 7,7 ^b	204,0 ± 8,5 ^c	6,6 ± 0,9 ^a	197,4 ± 8,6 ^c
Se _{VI} -CLI 62,5	355,7 ± 7,4 ^b	204,6 ± 9,2 ^c	6,7 ± 0,8 ^a	197,9 ± 7,7 ^c
Se _{IV} -CLI 50	398,3 ± 8,9 ^a	233,8 ± 10,1 ^b	3,2 ± 0,6 ^b	230,6 ± 7,5 ^b
Se _{VI} -CLI 50	417,6 ± 12,1 ^a	272,8 ± 11,4 ^a	2,6 ± 0,4 ^b	270,2 ± 8,4 ^a

¹Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

5.6.3. Ukupan sadržaj lipida i proteina

Ukupan sadržaj lipida i proteina u ispitivanim ekstraktima prikazan je u tabeli 5.12 za gljivu *P. ostreatus* i tabeli 5.13 za *C. versicolor*. Sadržaj lipida u ekstraktima gljive *P. ostreatus* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Kod ekstrakata dobijenih iz gljive odgajene na supstratu sa dodatkom 75 mg Se kg⁻¹ primećen je veći sadržaj lipida za približno 25%, dok je koncentracija od 50 mg Se kg⁻¹ uslovila smanjenje lipida za 10 do 25% u odnosu na kontrolni ekstrakt. Veći sadržaj ukupnih lipida, za 1,5 do 3,0 puta, utvrđen je kod svih ekstrakata dobijenih iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom u odnosu na kontrolni ekstrakt. Prethodna istraživanja dokazuju da se dodatkom selena, u vidu selenita, sadržaj lipida u metanolnim ekstraktima micelije gljive *Lentinula edodes* povećava za oko 25%, kao i da se selen u njima pretežno nalazi u obliku Se(IV) (Turlo et al., 2010). Ekstrakti gljive *P. ostreatus* P70, odgajene na supstratu sa dodatkom selenita, imali su veći sadržaj lipida za 10% dok se njihov sadržaj neznatno smanjio ili ostao nepromenjen dodatkom selenskog kvasca (Savić, 2014).

Tabela 5.12. Ukupan sadržaj proteina, lipida, fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima gljive *P. ostreatus*

<i>P. ostreatus</i>	Ukupan sadržaj proteina (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj lipida (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj fenola (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj flavonoida (mg g ⁻¹) ¹
Kontrola	12,0 ± 0,7 ^{2b}	178,9 ± 5,0 ^b	11,3 ± 0,2 ^c	8,9 ± 0,2 ^b
Se _{IV} -CLI 75	14,4 ± 0,4 ^a	226,1 ± 3,4 ^a	12,9 ± 0,2 ^b	9,7 ± 0,1 ^a
Se _{VI} -CLI 75	15,0 ± 0,5 ^a	230,6 ± 3,3 ^a	13,4 ± 0,8 ^b	9,9 ± 0,1 ^a
Se _{IV} -CLI 50	7,4 ± 0,6 ^c	162,0 ± 2,8 ^c	17,2 ± 0,7 ^a	10,3 ± 0,2 ^a
Se _{VI} -CLI 50	5,8 ± 0,4 ^d	131,7 ± 2,1 ^d	17,3 ± 0,7 ^a	10,3 ± 0,3 ^a

¹Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Sadržaj ukupnih proteina u ekstraktima gljive *P. ostreatus* zavisio je, kao i u slučaju lipida, od koncentracije dodatog selena. Ekstrakti Se_{IV}-CLI 75 i Se_{VI}-CLI 75 su imali između 20 i 25% više proteina u odnosu na kontrolu, dok je kod ekstrakata dobijenih iz gljive odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg⁻¹ primećen niži sadržaj i do 50%.

Svi ekstrakti dobijeni iz gljive *C. versicolor* (Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 62,5, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50) su sadržali od 17 do čak 127% više proteina u odnosu na kontrolni ekstrakt. Detektovan nizak sadržaj proteina u svim ispitivanim ekstraktima, od 0,6 do 1,8% računato na suhu masu, može se pripisati korišćenu metanola kao rastvarača, pod čijim dejstvom može doći do njihove denaturacije i precipitacije (Fernández i Sinanoğlu, 1985).

Tabela 5.13. Ukupan sadržaj proteina, lipida, fenola i flavonoida u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

<i>C. versicolor</i>	Ukupan sadržaj proteina (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj lipida (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj fenola (mg g ⁻¹)	Ukupan sadržaj flavonoida (mg g ⁻¹) ¹
Kontrola	8,0 ± 0,5 ^{2d}	50,2 ± 2,0 ^e	25,8 ± 1,4 ^b	4,3 ± 0,2 ^d
Se _{IV} -CLI 62,5	14,8 ± 0,4 ^b	122,0 ± 2,4 ^b	28,6 ± 0,3 ^a	19,8 ± 0,9 ^a
Se _{VI} -CLI 62,5	14,8 ± 0,6 ^b	109,4 ± 1,8 ^c	29,7 ± 0,4 ^a	17,5 ± 0,8 ^b
Se _{IV} -CLI 50	18,2 ± 1,0 ^a	154,4 ± 3,1 ^a	25,5 ± 0,3 ^b	8,2 ± 0,2 ^c
Se _{VI} -CLI 50	9,9 ± 0,4 ^c	83,0 ± 1,3 ^d	24,8 ± 0,6 ^b	9,0 ± 0,3 ^c

¹Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

²Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

5.6.4. Ukupan sadržaj fenola i flavonoida

Ukupan sadržaj fenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima prikazan je u tabeli 5.12 za *P. ostreatus* i tabeli 5.13 za *C. versicolor*. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim iz gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg⁻¹ je bio značajno viši (oko 50%) u odnosu na kontrolni ekstrakt ($\alpha \leq 0,05$), dok se pri koncentraciji od 75 mg Se kg⁻¹ njihov sadržaj povećao između 15 i 20%. Sadržaj polifenola u ekstraktima gljive *C. versicolor* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Dodatkom 62,5 mg Se kg⁻¹ primećen je veći sadržaj fenola (10 do 15%) u poređenju sa kontrolnim ekstraktom, dok se pri koncentraciji od 50 mg Se kg⁻¹ njihov sadržaj nije značajnije menjao.

Sadržaj ukupnih fenola u kontrolnom metanolnom ekstraktu gljive *C. versicolor* je bio značajno veći ($25,8 \pm 1,4 \text{ mg g}^{-1}$) u poređenju sa njihovim sadržajem u ekstraktu dobijenim iz gljive *P. ostreatus* ($11,3 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$). Vrednost od $23,3 \text{ mg g}^{-1}$ za ukupne fenole ustanovljena je u metanolnom ekstraktu gljive *C. versicolor* (Mau et al., 2002), dok se njihov sadržaj u ekstraktima gljive *P. ostreatus* kretao u opsegu od 6,7 do $15,7 \text{ mg g}^{-1}$ (Yang et al., 2002; Elmastas et al., 2007; Gąsecka et al., 2015), što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

Brojna istraživanja pokazuju da dodatak selena u supstrat za gajenje gljiva utiče na povećanje sadržaja fenola (Turlo et al., 2010; Bhatia et al., 2014; Savić, 2014; Gąsecka et al., 2015). Kao moguće objašnjenje za pojačanu sintezu fenola navode se dva razloga. Prvi, da se seleniti dodati u podlogu tretiraju kao kontaminanti od strane gljive i da je pojačana sinteza fenola deo mehanizma detoksifikacije i drugi, da seleno-komponente sa antioksidativnim svojstvima deluju kao inhibitori enzima polifenol-oksidade i na taj način indirektno povećavaju sadržaj polifenola (Turlo et al., 2010). U literaturi se navodi i sledeće objašnjenje, da selen pospešuje akumulaciju pojedinih šećera, poput glukoze, koja predstavlja važan supstrat za mnoge metaboličke puteve, te da se na taj način posredno povećava i sadržaj polifenola (Lei et al., 2014; Gąsecka et al., 2015).

Veći sadržaj ukupnih flavonoida ustanovljen je kod svih ekstrakata dobijenih iz gljiva obogaćenih selenom u odnosu na kontrolne ekstrakte. Ekstrakti gljive *P. ostreatus* ($\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 75$, $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 75$, $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$) imali su od 6,5 do 12% više flavonoida u odnosu na kontrolni ekstrakt (tabela 5.12). Razlika je bila još izraženija kod ekstrakata dobijenih iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom kod kojih je utvrđen od 2,0 do 4,5 puta veći sadržaj flavonoida u odnosu na kontrolni ekstrakt (tabela 5.13). Uočeno je i da su flavonoidi najzastupljenija grupa fenolnih jedinjenja (60 do 75%) u svim ekstraktima dobijenim iz gljive *P. ostreatus*, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora (Palacios et al., 2011; Gąsecka et al., 2015).

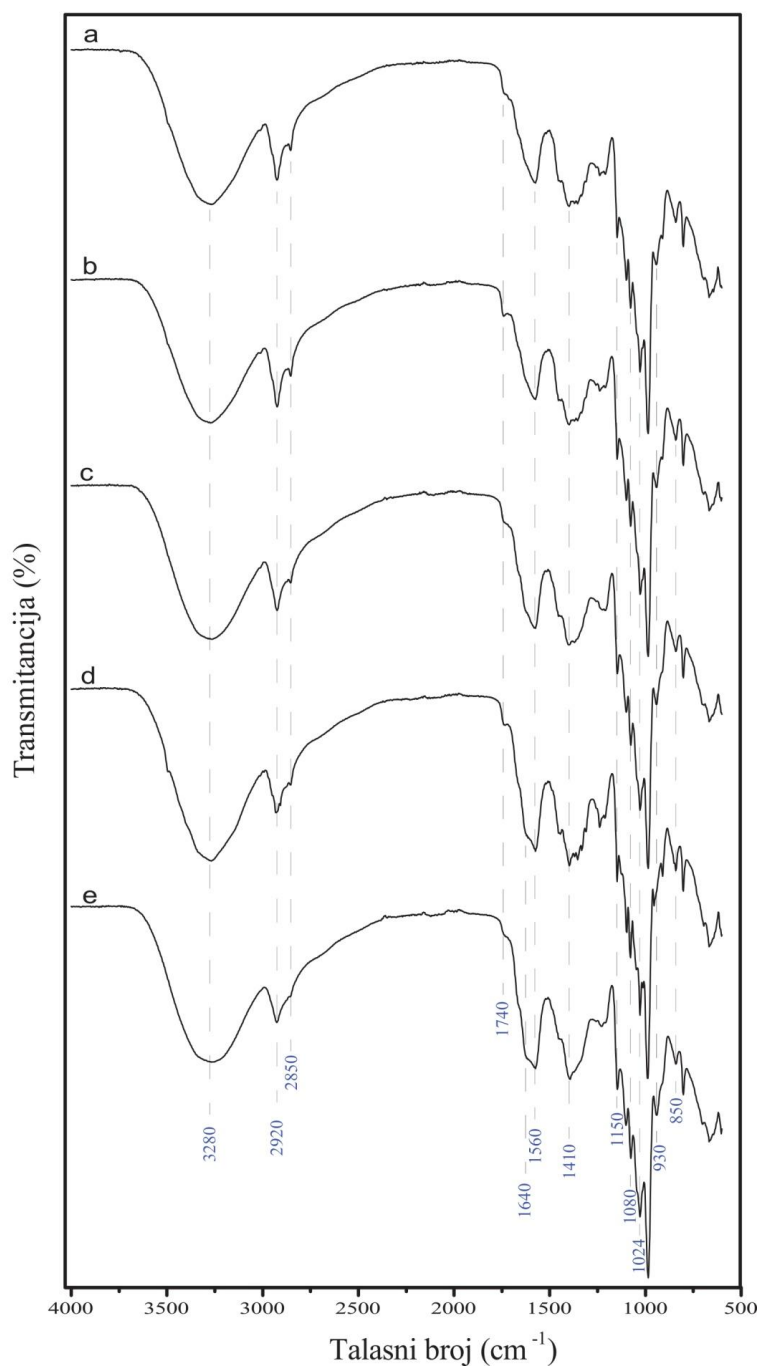
S obzirom da su fenoli i flavonoidi, zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi, poznati kao antioksidativni agensi pretpostavka je da će ekstrakti dobijeni iz gljiva obogaćenih selenom ispoljiti jača antioksidativna svojstva i niže EC_{50} vrednosti u odnosu na kontrolne ekstrakte.

5.6.5. FT-IR spektroskopija

FT-IR spektri metanolnih ekstrakata izolovanih iz gljive *P. ostreatus*, odgajene na supstratu sa dodatkom različitih jedinjenja sa selenom i u različitim koncentracijama, kao i kontrolnog uzorka prikazani su na grafiku 5.7. Ekstrakti predstavljaju smeše odnosno komplekse polisaharida, lipida, polifenola i proteina. Uzorci su analizirani pri rezoluciji od 4 cm^{-1} i u opsegu od $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

FT-IR spektri analiziranih ekstrakata gljive *P. ostreatus* pokazuju široku apsorpcionu traku u oblasti $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ koja se javlja kao rezultat valentnih vibracija hidroksilnih grupa koje formiraju jake inter- i intramolekulske veze u polisaharidnom lancu kao i vibracija OH grupa molekula konstitucione vode (Kozarski et al., 2012; Synytsya i Novak, 2014). Tipična N-H vibracija koja se odnosi na proteine nalazi se u istoj oblasti, tačnije na oko 3400 cm^{-1} i preklapa se sa pomenutim OH vibracijama (Carey, 1992). Dve trake na oko 2920 cm^{-1} i 2850 cm^{-1} odnose se na asimetrične i simetrične CH_2 vibracije istezanja i ukazuju na prisustvo lipida (Mohaček-Grošev et al., 2001; Synytsya et al., 2009). Spektri pokazuju i apsorpcione trake u oblasti $1750\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$ (traka na 1740 cm^{-1} je karakteristična za uronske kiseline) koje ukazuju na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih C=O grupa (Šandula et al., 1999; Kozarski et al., 2012). Na prisustvo malih količina proteina u ispitivanim ekstraktima ukazuju apsorpcioni pikovi na oko 1560 cm^{-1} (amid II) i 1350 cm^{-1} (amid III), dok je traka na oko 1640 cm^{-1} (amid I) prisutna samo kod ekstrakata dobijenih iz gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg^{-1} (grafik 5.7 d i e). Traka na oko 1640 cm^{-1} se, međutim, preklapa sa apsorpcijom aromata, najverovatnije polifenola, što ukazuje i na prisustvo pigmenata (Šandula et al., 1999; Synytsya et al., 2009; Synytsya i Novak, 2014). Trake u regionu $1410\text{-}1310\text{ cm}^{-1}$ ukazuju na prisustvo OH grupe fenolnih jedinjenja i potvrđuju prisustvo pigmenata u ispitivanim ekstraktima (Kozarski et al., 2012; Klaus et al., 2015). Apсорpcione trake u oblasti $1200\text{-}950\text{ cm}^{-1}$, pretežno valentne vibracije C-C i C-O veza kao i deformacione vibracije CCH, COH i HCO veza, ukazuju na prisustvo polisaharida različitog sastava i strukture. Traka na oko 1150 cm^{-1} ukazuje na C-O-C valentne vibracije glikozidno vezanih heksopiranoza, apsorpcioni pik na 1080 cm^{-1} je karakterističan za prisustvo β -glukana odnosno *o*-supstituisanih glukopiranoznih ostataka, dok se traka na oko 1024 cm^{-1} odnosi na C-O valencionu vibraciju istezanja (Sarangi et al., 2006; Synytsya et al., 2009).

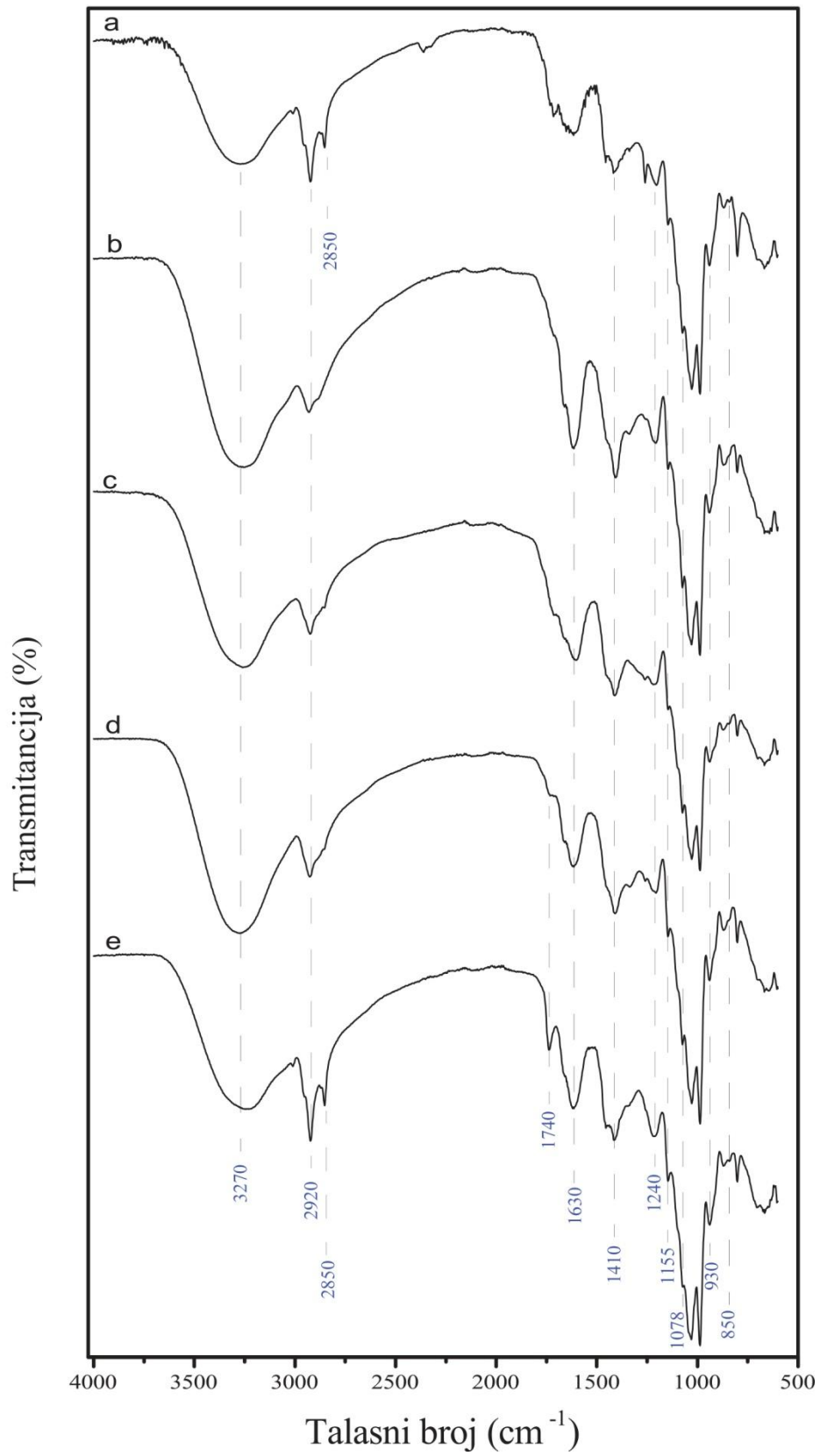
Oblast od $950\text{-}750\text{ cm}^{-1}$ predstavlja „anomerni region“, i u njemu spektri pokazuju slabu traku na oko 930 cm^{-1} koja je karakteristična za ekvatorijalno orijentisanu $\text{C}_1\text{-H}$ vezu, odnosno za $\alpha\text{-D}$ -glikozidne veze, kao i traku na 890 cm^{-1} karakterističnu za $(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D}$ -glukane (Gonzaga et al., 2013; Synytsya i Novak, 2014).



Grafik 5.7. FT-IR spektri metanolnih ekstrakata dobijenih iz gljive *P. ostreatus*. a - kontrola, b - $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 75}$, c - $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 75}$, d - $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 50}$ i e - $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 50}$.

FT-IR spektri metanolnih ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor*, odgajene na supstratu sa dodatkom različitih jedinjenja sa selenom i u različitim koncentracijama, kao i kontrolnog uzorka prikazani su na grafiku 5.8. Široka, jaka traka u oblasti 3500-3000 cm^{-1} rezultat je valentnih vibracija OH grupa koje učestvuju u formiranju različitih po jačini vodoničnih veza, kao i simetričnih i asimetričnih vibracija istezanja N-H veza. Traka na približno 2920 cm^{-1} , rezultat asimetričnih vibracija istezanja metilenskih (CH_2) grupa, je prisutna kod svih uzoraka, dok se traka karakteristična za simetrične CH_2 vibracije istezanja, na oko 2850 cm^{-1} , javlja kod kontrolnog i Se_{VI}-CLI 50 ekstrakta. Spektri ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor*, odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg^{-1} (grafik 5.8 d i e), pokazuju apsorpcione trake u oblasti 1750-1690 cm^{-1} (intenzivna traka na 1740 cm^{-1} karakteristična je za uronske kiseline) koje ukazuju na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih C=O grupa kao strukturnih komponenti polisaharida prisutnih u uzorcima. Najizraženije spektralne razlike između kontrolnog i ekstrakata dobijenih iz selenom obogaćene gljive se uočavaju u amidnom regionu (na oko 1630 cm^{-1}) koji ukazuje na prisustvo proteina. Apсорpcione trake na oko 1411 i 1240 cm^{-1} , detektovane u svim ekstraktima takođe ukazuju na proteine. Prisustvo pigmenata u ispitivanim ekstraktima detektuje se u regionu 1410-1310 cm^{-1} (ukazuje na prisustvo OH grupa u fenolnim jedinjenjima), kao i na osnovu intenzivne trake u oblasti 1650-1600 cm^{-1} koja je indikativna za aromatične C=C grupe koje najverovatnije potiču od polifenola. Spektri pokazuju i jasno izražene pikove na oko 1155, 1078 i 890 cm^{-1} koji su karakteristični za β -glikozidne veze, dok se prisustvo (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -D-glukana detektuje na osnovu traka na oko 930 i 850 cm^{-1} (Kozarski et al., 2012; Synytsya i Novak, 2014).

FT-IR spektri analiziranih uzoraka pokazuju da pored polisaharida sa sličnim strukturnim karakteristikama kao dominantnim komponentama, ekstrakti sadrže i lipide, proteine kao i pigmentne materije - polifenole.



Grafik 5.8. FT-IR spektri metanolnih ekstrakata dobijenih iz gljive *C. versicolor*. a - kontrola, b - Se_{IV}-CLI 62,5, c - Se_{VI}-CLI 62,5, d - Se_{IV}-CLI 50 i e - Se_{VI}-CLI 50.

5.7. Biološka svojstva metanolnih ekstrakata

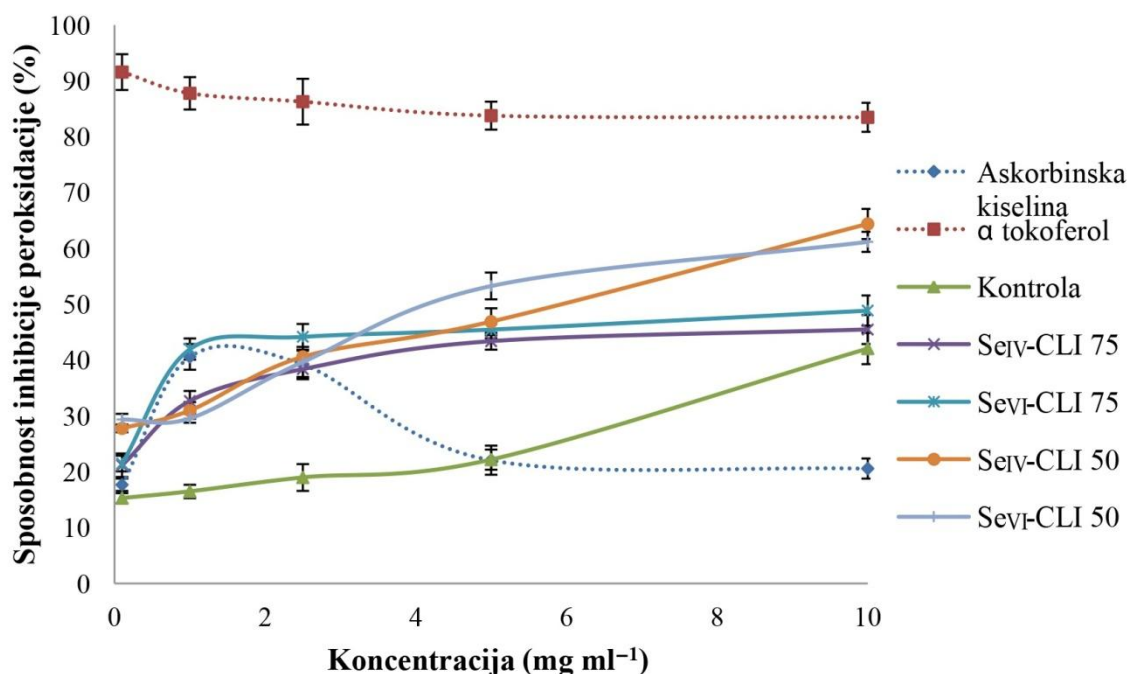
5.7.1. Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

5.7.1.1. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida

Delovanjem slobodnih radikala ili prelaznih metala inicira se peroksidacija lipida (nezasićenih masnih kiselina) i to oduzimanjem protona uz istovremeni transfer elektrona sa metilenske (-CH₂-) grupe polinezasićenih masnih kiselina. U ovom procesu se formiraju tipični produkti oksidacije (konjugovani dieni, lipidni hidroperoksidi, a njihovom degradacijom i alkani, aldehidi, ketoni) koji služe kao biomarkeri za praćenje nivoa nastalih oštećenja. Formiranje konjugovanih diena može se pratiti spektrofotometrijski na 234 nm i ovaj metod se primenjuje za ispitivanje ranog stadijuma lipidne peroksidacije (Moore i Roberts, 1998; Moon i Shibamoto, 2009).

Metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom ispoljili su jače antioksidativno dejstvo u procesu inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu linoleinske kiseline u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do 10,0 mg ml⁻¹ (grafik 5.9). Pri koncentraciji od 0,1 mg ml⁻¹ sposobnost inhibicije kontrolnog ekstrakta je bila 15,3 ± 0,9%, za ekstrakte Se_{IV}-CLI 75 i Se_{VI}-CLI 75 je iznosila 21,2 ± 2,1 i 21,5 ± 1,4%, dok su najveće vrednosti primećene kod ekstrakata Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 i to 27,8 ± 0,7 i 29,4 ± 1,0%. Kontrolni, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 ekstrakti su ispoljili stalni porast inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline sa povećanjem koncentracije i pri 10,0 mg ml⁻¹ dostignute su vrednosti od 42,1 ± 2,8, 64,4 ± 2,7 i 61,2 ± 1,8%. Sposobnost inhibicije ekstrakta Se_{VI}-CLI 75 je pri koncentraciji od 1,0 mg ml⁻¹ bila 42,0 ± 1,9%, sa daljim porastom koncentracija vrednost se neznatno menjala i pri 10,0 mg ml⁻¹ je iznosila 48,9 ± 2,7%. Slično ponašanje je primećeno i za ekstrakt Se_{IV}-CLI 75 koji je ispoljio sposobnost inhibicije od 43,4 ± 1,5% pri koncentraciji od 5,0 mg ml⁻¹ i nešto jače dejstvo od 45,5 ± 2,6% pri 10,0 mg ml⁻¹. U opsegu koncentracija od 1,0 do 5,0 mg ml⁻¹ razlika u inhibiciji između kontrolnog i ekstrakata dobijenih iz gljive obogaćene selenom je bila najizraženija i iznosila je preko 50%.

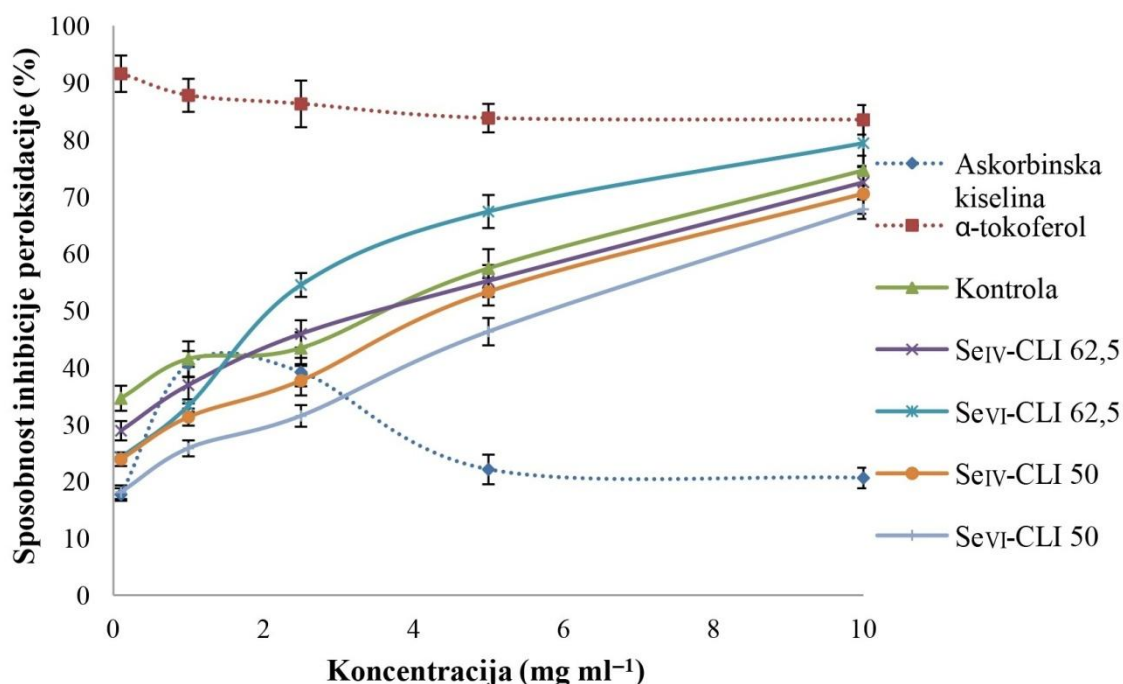
Prethodno istraživanje potvrđuje da metanolni ekstrakti pripremljeni iz micelije gljive *L. edodes* obogaćene selenom ispoljavaju jaču sposobnost inhibicije peroksidacije lipida u odnosu na kontrolni ekstrakt naročito pri nižim koncentracijama (Turlo et al., 2010). U istoj studiji utvrđeno je da se selen u ekstraktu pretežno nalazio u Se (-II), oko 86%, i Se (IV) stanju što je navelo autore na zaključak da je jača aktivnost u funkciji oksidacionog broja. Metanolni ekstrakt gljive *Pleurotus sajor-caju* obogaćene selenom ispoljio je znatno bolju sposobnost inhibicije peroksidacije lipida i posledično formiranja malondialdehida (MDA) u odnosu na kontrolni ekstrakt (Bhatia et al., 2014). Brojne *in vivo* studije potvrđuju važnu ulogu selena poreklom iz gljiva u prevenciji lipidne peroksidacije i očuvanju funkcije i integriteta ćelija i tkiva (El-Demerdash, 2004; Yan i Chang, 2012).



Grafik 5.9. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3).

Sposobnost inhibicije svih ispitivanih metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* se povećavala sa porastom koncentracije (grafik 5.10). Stepem inhibitorne aktivnosti kontrolnog ekstrakta je pri testiranim koncentracijama ($0,1-10,0 \text{ mg ml}^{-1}$) bio u opsegu od $34,6 \pm 2,2$ do $74,6 \pm 2,6\%$. Pri istim koncentracijama vrednosti za $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$ ekstrakt su bile od $23,9 \pm 1,2$ do $70,5 \pm 3,5\%$, za $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$ su se kretale od $18,1 \pm 1,2$ do $67,8 \pm 1,7\%$ i za $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 62,5$ od $28,9 \pm 1,7$ do $72,5 \pm 2,9\%$. Ekstrakt $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$ je ispoljio najjači stepen inhibitorne aktivnosti koji je pri koncentraciji od $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ iznosio $24,2 \pm 0,3\%$ i koji je dostigao maksimum od $79,4 \pm 2,1\%$ pri koncentraciji od $10,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Sposobnost inhibicije testiranih standarda, askorbinske kiseline i α -tokoferola je pri koncentraciji od $10,0 \text{ mg ml}^{-1}$ iznosila $20,6 \pm 1,8$ i $83,5 \pm 2,6\%$. Tokoferol je ispoljio veći procenat inhibicije pri nižim koncentracijama, dok je najveća vrednost za askorbinsku kiselinu dostignuta pri koncentraciji od $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji sposobnost inhibicije peroksidacije se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole smanjivala sledećim redosledom: α -tokoferol > $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$ > kontrola > $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 62,5$ > $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$ > $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$ > askorbinska kiselina.



Grafik 5.10. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije ($n=3$).

U sistemu β -karoten-linoleinska kiselina EC_{50} vrednost za metanolni ekstrakt gljive *Pleurotus squarrosulus* je bila $3,79 \text{ mg ml}^{-1}$ (Pal et al., 2010), dok je u istom sistemu EC_{50} vrednost za *P. ostreatus* iznosila $2,74 \pm 0,16 \text{ mg ml}^{-1}$ (Reis et al., 2012a). Procenat inhibicije lipidne peroksidacije metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* je, u modelu tiobarbiturne kiseline (TBA), iznosio 20% pri koncentraciji od $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ (Karaman et al., 2010). Mau et al. (2002) su, primenjujući DETBA metod (1,3-dietil-2-tiobarbiturna kiselina), ustanovili da je pri koncentraciji od $0,6 \text{ mg ml}^{-1}$ metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* došlo do peroksidacije 58,56% prisutnih lipida (linoleinske kiseline), što ovu gljivu svrstava u antioksidanse sa umerenom aktivnošću.

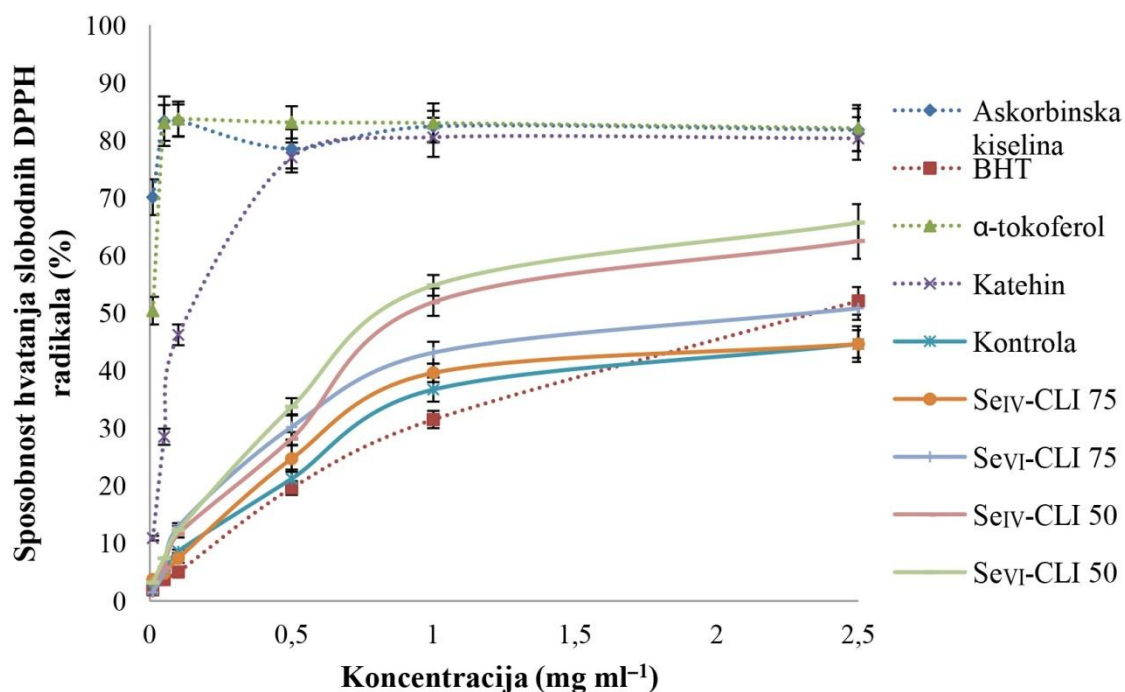
Redukcija hidroperoksida, hvatanje slobodnih radikala, formiranje kompleksa sa jonima metala ili pak kombinacija svega navedenog, se navode kao mogući mehanizmi na osnovu kojih ekstrakti gljiva inhibiraju peroksidaciju lipida (Das i Pereira, 1990). Ustanovljena je visoka korelacija između sadržaja ukupnih fenola (Mau et al., 2002; Karaman et al., 2010), flavonoida (Das i Pereira, 1990), tokoferola (Tsai et al., 2007) i pojedinih monosaharidnih jedinica (Lo et al., 2011) i inhibitorne aktivnosti. Utvrđeno je da se inhibitorna aktivnost povećava sa porastom koncentracija manoze i naročito ramnoze, dok povećanje koncentracija glukoze i posebno arabinoze utiče na smanjenje aktivnosti (Lo et al., 2011).

5.7.1.2. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

Slobodni DPPH radikali (tamnoljubičasta boja rastvora) se u prisustvu antioksidansa, sa sposobnošću doniranja vodonikovog jona (protonovanja), prevode u neradikalni oblik DPPH-H pri čemu dolazi do obezbojavanja ispitivanog rastvora (Lü et al., 2010). Fenolnim, amino ili tiofenolnim funkcionalnim grupama se pripisuje sposobnost hvatanja DPPH radikala (Wang i Zhang, 2003).

Sposobnost hvatanja DPPH radikala ispitivanih pozitivnih kontrola se kretala u opsegu od $70,1 \pm 3,1$ do $81,8 \pm 3,7\%$ za askorbinsku kiselinu, od $1,9 \pm 0,0$ do $52,1 \pm 2,4\%$ za BHT, od $50,4 \pm 2,4$ do $82,1 \pm 4,0\%$ za α -tokoferol i od $10,9 \pm 0,4$ do $80,3 \pm 3,7\%$ za katehin u opsegu koncentracija od $0,01$ do $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$.

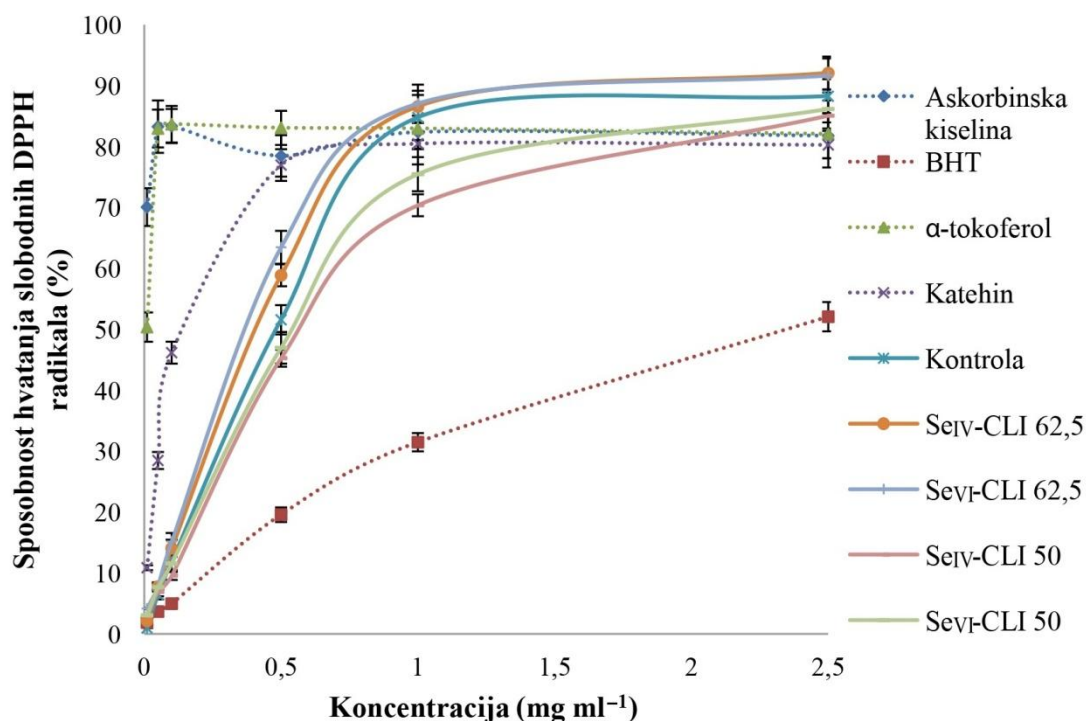
Metanolni ekstrakti kontrolni, Se_{IV}-CLI 75, Se_{VI}-CLI 75, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 gljive *P. ostreatus* su pokazali sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala od $8,6 \pm 0,3$, $7,4 \pm 0,8$, $12,9 \pm 0,6$, $11,6 \pm 0,6$ i $12,3 \pm 0,7\%$ pri koncentraciji od $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$. Sa porastom koncentracije rasla je i sposobnost hvatanja radikala koja je pri $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ dostigla vrednosti od $44,6 \pm 2,4\%$ za kontrolni, $44,6 \pm 3,1\%$ za Se_{IV}-CLI 75, $50,8 \pm 2,0\%$ za Se_{VI}-CLI 75, $62,5 \pm 3,1\%$ za Se_{IV}-CLI 50 i $65,7 \pm 3,2\%$ za Se_{VI}-CLI 50 ekstrakt (grafik 5.11). Pri koncentraciji od $1,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ekstrakti dobijeni iz gljive obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost hvatanja radikala, od 8 do 50%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji sposobnost redukcije slobodnih radikala se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole smanjivala sledećim redosledom: α -tokoferol \approx askorbinska kiselina \approx katehin $>$ Se_{VI}-CLI 50 $>$ Se_{IV}-CLI 50 $>$ BHT \approx Se_{VI}-CLI 75 $>$ Se_{IV}-CLI 75 \approx kontrola.



Grafik 5.11. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3).

Metanolni ekstrakti kontrolni, Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 62,5, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 gljive *C. versicolor* pokazali su sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala od $11,9 \pm 1,4$, $14,1 \pm 1,4$, $15,2 \pm 1,4$, $9,6 \pm 0,7$ i $11,6 \pm 1,4\%$ pri koncentraciji od $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$. Ova sposobnost ekstrakta se, kao i kod bukovače, povećavala sa povećanjem njihove koncentracije i pri $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ su dostignute vrlo visoke vrednosti od $88,3 \pm 2,8$, $92,1 \pm 2,7$, $91,7 \pm 2,8$, $85,1 \pm 2,5$ i $86,2 \pm 3,2\%$ (grafik 5.12). Pri najvećoj testiranoj koncentraciji sposobnost redukcije slobodnih radikala se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole smanjivala sledećim redosledom: Se_{IV}-CLI 62,5 \approx Se_{VI}-CLI 62,5 > kontrola > Se_{VI}-CLI 50 \approx Se_{IV}-CLI 50 > α -tokoferol \approx askorbinska kiselina \approx katehin >> BHT.



Grafik 5.12. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3).

Svi ispitivani metanolni ekstrakti gljive *C. versicolor* pokazali su znatno veću sposobnost redukcije slobodnih radikala u odnosu na ekstrakte gljive *P. ostreatus*. Dobijeni rezultati se mogu objasniti na osnovu ustanovljene veoma visoke pozitivne korelacije između sposobnosti hvatanja DPPH radikala i ukupnog sadržaja fenola ($r = 0,956$).

Ranija istraživanja su pokazala da su metanolni ekstrakti gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od $0,64 \text{ mg ml}^{-1}$ imali sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala od 24,6% (Mau et al., 2002), dok je pri koncentraciji od $50,0 \text{ mg ml}^{-1}$ ta vrednost iznosila 80,3% (Han et al., 2015). Karaman i saradnici (2010) su ustanovili da je pri koncentraciji metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* od $0,24 \text{ mg ml}^{-1}$ postignuta sposobnost redukcije DPPH radikala od 50%. Isti autori su za metanolni ekstrakt gljive *P. ostreatus* odredili EC_{50} vrednost pri koncentraciji od $0,47 \text{ mg ml}^{-1}$. U literaturi se još navodi da je EC_{50} vrednost za ekstrakte ove gljive postignuta pri koncentraciji od $4,42 \text{ mg ml}^{-1}$ (Gąsecka et al., 2016) odnosno $6,54 \pm 0,16 \text{ mg ml}^{-1}$ (Reis et al., 2012a). Metanolni ekstrakt gljive *P. ostreatus* pokazao je sposobnost hvatanja DPPH radikala u opsegu od 49,3 – 85,1% pri koncentracijama od 0,125 do 2 mg ml^{-1} (Alam et al., 2010).

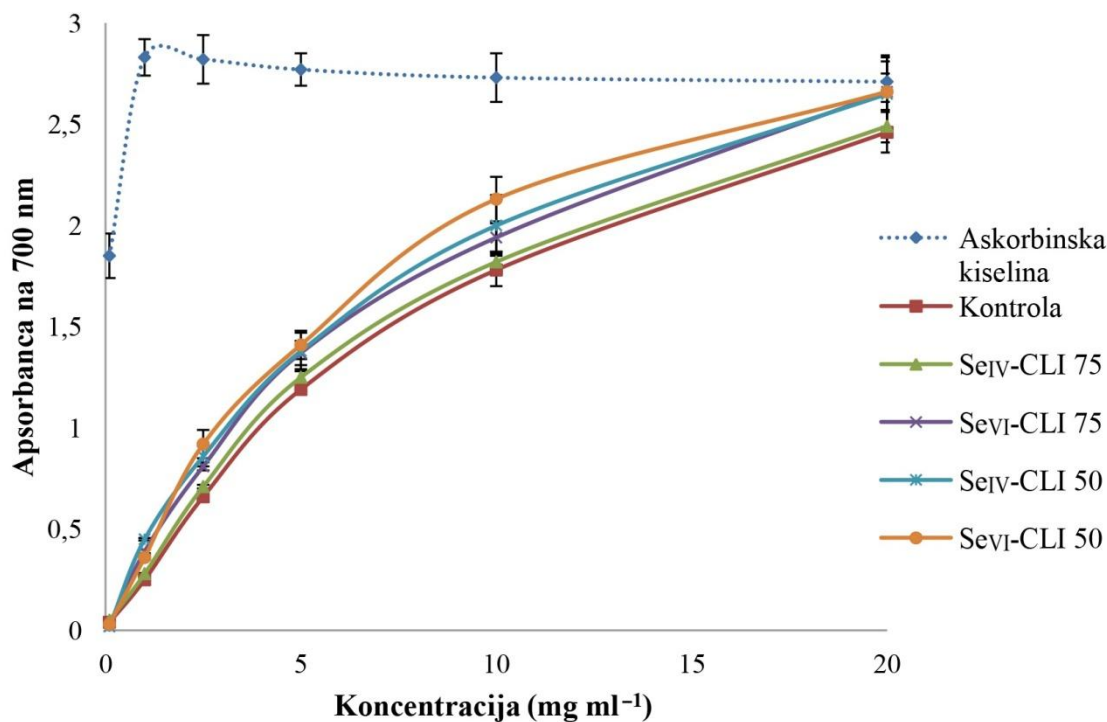
Ranija istraživanja potvrđuju da se sa povećanjem koncentracije selena u metanolnom ekstraktu gljive *P. ostreatus* povećava i sadržaj ukupnih fenola kao i sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Pri koncentraciji od $52,1 \text{ mg Se kg}^{-1}$ sposobnost hvatanja radikala je iznosila $47,1 \pm 1,4\%$, sa porastom koncentracije do $63,5 \text{ mg Se kg}^{-1}$ ustanovljen je i veći procenat hvatanja radikala od $49,5 \pm 0,5\%$ (Gąsecka et al., 2015). Osim toga, potvrđeno je da ekstrakti izolovani iz gljiva obogaćenih selenom pokazuju bolju sposobnost hvatanja slobodnih DPPH, OH^{\cdot} i $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikala u odnosu na kontrolne ekstrakte (Zhao et al., 2004a; Zhao et al., 2008; Turlo et al., 2010; Bhatia et al., 2014).

5.7.1.3. Redukciona svojstva

Redukcija Fe^{3+} u Fe^{2+} se često koristi kao pokazatelj sposobnosti doniranja elektrona ispitivanog antioksidansa, pri čemu dolazi do promene boje rastvora iz žute u plavu (Prusko plavo) i rasta apsorbanse (Reis et al., 2012a).

Vrlo visoka sposobnost redukcije jona gvožđa ustanovljena je za pozitivnu kontrolu, askorbinsku kiselinu, i iznosila je $2,71 \pm 0,12$ pri koncentraciji od $20,0 \text{ mg ml}^{-1}$.

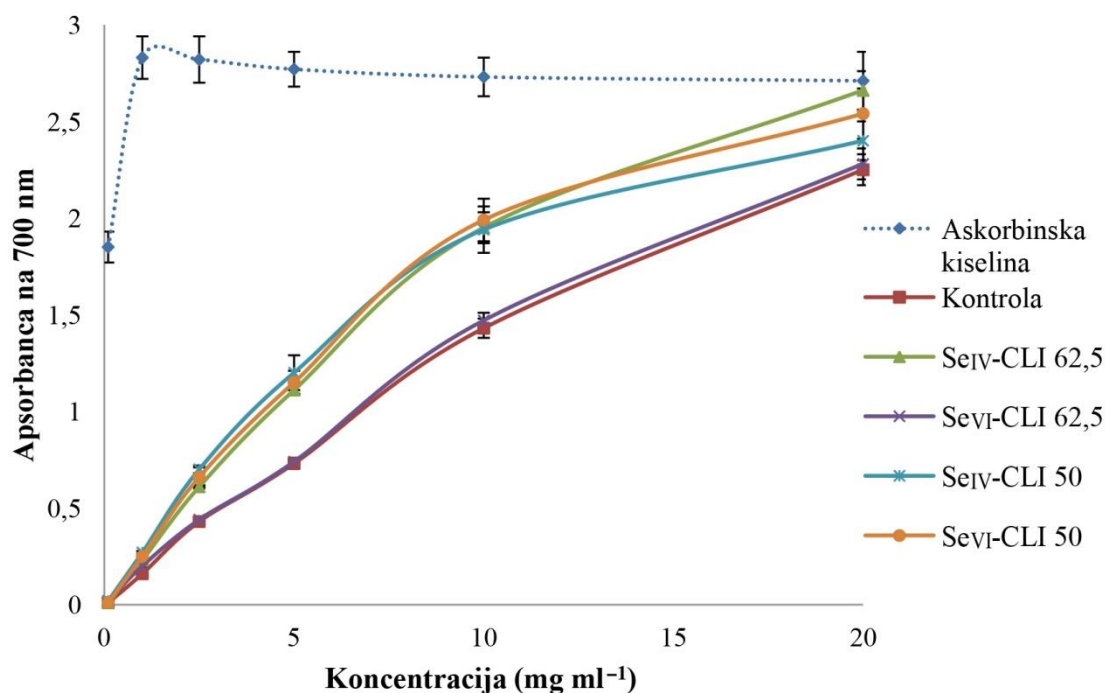
Metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost redukcije jona gvožđa u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do $20,0 \text{ mg ml}^{-1}$ (grafik 5.13). Reduktivna sposobnost metanolnih ekstrakata kontrolnog, $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 75}$, $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 75}$, $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 50}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 50}$ gljive *P. ostreatus* se povećavala sa povećanjem koncentracije, i pri $20,0 \text{ mg ml}^{-1}$ te vrednosti su bile bliske pozitivnoj kontroli. Pri ovoj koncentraciji ustanovljene su vrednosti na A_{700} od $2,46 \pm 0,10$, $2,49 \pm 0,08$, $2,66 \pm 0,09$, $2,65 \pm 0,18$ i $2,66 \pm 0,18$. Ekstrakti dobijeni iz gljive obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost redukcije, od 3 do 20%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom pri koncentraciji od $10,0 \text{ mg ml}^{-1}$. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji, $20,0 \text{ mg ml}^{-1}$, reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata i askorbinske kiseline je bila u sledećem odnosu: askorbinska kiselina $\approx \text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 50} \approx \text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 50} \approx \text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 75} > \text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 75} > \text{kontrola}$.



Grafik 5.13. Sposobnost redukcije metanolnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* odgajene na substratu sa dodatkom različitih koncentracija selen.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3).

Kao i u slučaju bukovače, metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost redukcije jona gvožđa u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do 20,0 mg ml⁻¹ (grafik 5.14). Redukciona sposobnost metanolnih ekstrakata kontrolnog, Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 62,5, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 je zavisila od koncentracije i povećavala se sa njenim porastom. Ustanovljeno je da su pri koncentraciji od 10,0 mg ml⁻¹ ekstrakti dobijeni iz gljive obogaćene selenom ispoljili jaču sposobnost redukcije, od 3 do 40%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom. Ekstrakti kontrolni, Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 62,5, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 su ispoljili vrednost A₇₀₀ od 1,43 \pm 0,05, 1,95 \pm 0,08, 1,47 \pm 0,07, 1,94 \pm 0,12 i 1,99 \pm 0,04 pri koncentraciji od 10,0 mg ml⁻¹. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji, 20,0 mg ml⁻¹, reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata i askorbinske kiseline je bila u sledećem odnosu: askorbinska kiselina \approx Se_{IV}-CLI 62,5 > Se_{VI}-CLI 50 > Se_{IV}-CLI 50 > Se_{VI}-CLI 62,5 > kontrola.



Grafik 5.14. Sposobnost redukcije metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti \pm standardne devijacije (n=3).

Visoka reduktivna sposobnost metanolnih ekstrakata gljiva *C. versicolor* i *P. ostreatus* je potvrđena i ranijim istraživanjima. Utvrđeno je da je redukciona sposobnost metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od 4,0 mg ml⁻¹ iznosila 0,79 (Mau et al., 2002). Sposobnost redukcije metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* je pri koncentraciji od 10,0 mg ml⁻¹ bila 1,19 (Mau et al., 2002), pri koncentraciji od 25,0 mg ml⁻¹ je iznosila približno 2,25 (Yang et al., 2002), dok je pri koncentraciji od 3,31 \pm 0,03 mg ml⁻¹ dostignuta vrednost od 0,5 – EC₅₀ (Reis et al., 2012a).

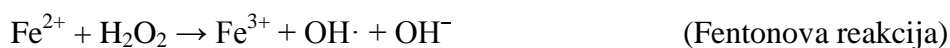
U istraživanju sprovedenom u Poljskoj se navodi da metanolni ekstrakti pripremljeni iz micelije gljive *L. edodes* obogaćene selenom ispoljavaju jaču redukcionu sposobnost, i do 30%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom (Turlo et al., 2010), što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Dosadašnja istraživanja ukazuju da reduktoni (endioli sa karbonilnom grupom do hidroksilne), prisutni u medicinskim i jestivim gljivama, doprinose njihovoj značajnijoj reduktivnoj sposobnosti (Mau et al., 2002; Wong i Chye, 2009). Isti se mogu formirati direktno iz ugljenih hidrata (Zhang et al., 2008).

Lo i saradnici (2011) su ustanovili da i hidroksilne grupe polisaharida, prisutnih u ekstraktima, mogu donirati elektron i tako prekinuti slobodno-radikalnu lančanu reakciju. Pomenuti rezultati su potvrđeni i od strane Vunduk i saradnika (2016) koji navode da postoji jaka negativna korelaciona zavisnost između sadržaja ukupnih polisaharida ($r = -0,9792$) i EC_{50} vrednosti za sposobnost redukcije jona gvožđa. Nešto jača sposobnost redukcije metanolnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* se verovatno može objasniti većim sadržajem polisaharida i β -glukana u odnosu na ekstrakte izolovane iz gljive *C. versicolor*.

5.7.1.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Fe(II)-joni su snažni pro-oksidansi. Sposobnost gvožđa da redukuje vodonik-peroksid, Fentonovom reakcijom, do hidroksil radikala se povezuje sa nastankom brojnih bolesti, poput kardiovaskularnih oboljenja, tumora, Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, kao i sa starenjem (Halliwell i Gutteridge, 1990; Perron et al., 2008).

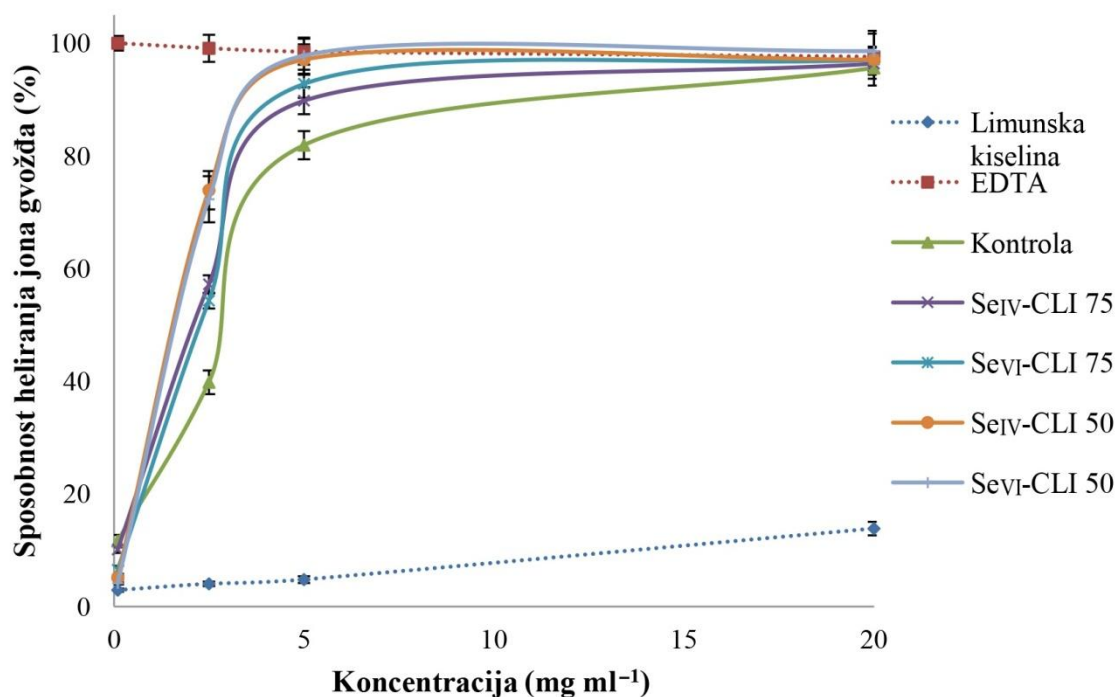


Metoda se bazira na kvantitativnoj reakciji ferozina sa Fe(II)-jonima, pri čemu nastaje kompleks crvene boje. U prisustvu helirajućih agenasa intenzitet crvene boje slabi usled kompetitivnog „hvatanja“ Fe(II)-jona od strane agensa pre samog ferozina (Wong i Chye, 2009).

Sposobnost heliranja sintetičkog metal helatora, EDTA, je iznosila približno 100% pri svim ispitivanim koncentracijama (od 0,1 do 20,0 mg ml⁻¹), dok su se vrednosti za limunsku kiselinu kretale u opsegu od $2,89 \pm 0,3$ do $13,82 \pm 1,2\%$ pri istim koncentracijama.

Metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost heliranja jona gvožđa u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do 20,0 mg ml⁻¹ (grafik 5.15). Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata kontrolnog, Se_{IV}-CLI 75, Se_{VI}-CLI 75, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 gljive *P. ostreatus* zavisila je od koncentracije i povećavala se sa njenim porastom. Pri koncentraciji od 5,0 mg ml⁻¹ svi ispitivani ekstrakti su helirali preko 80% Fe(II)-jona, dok je pri koncentraciji od 20,0 mg ml⁻¹ ta vrednost prelazila 95%.

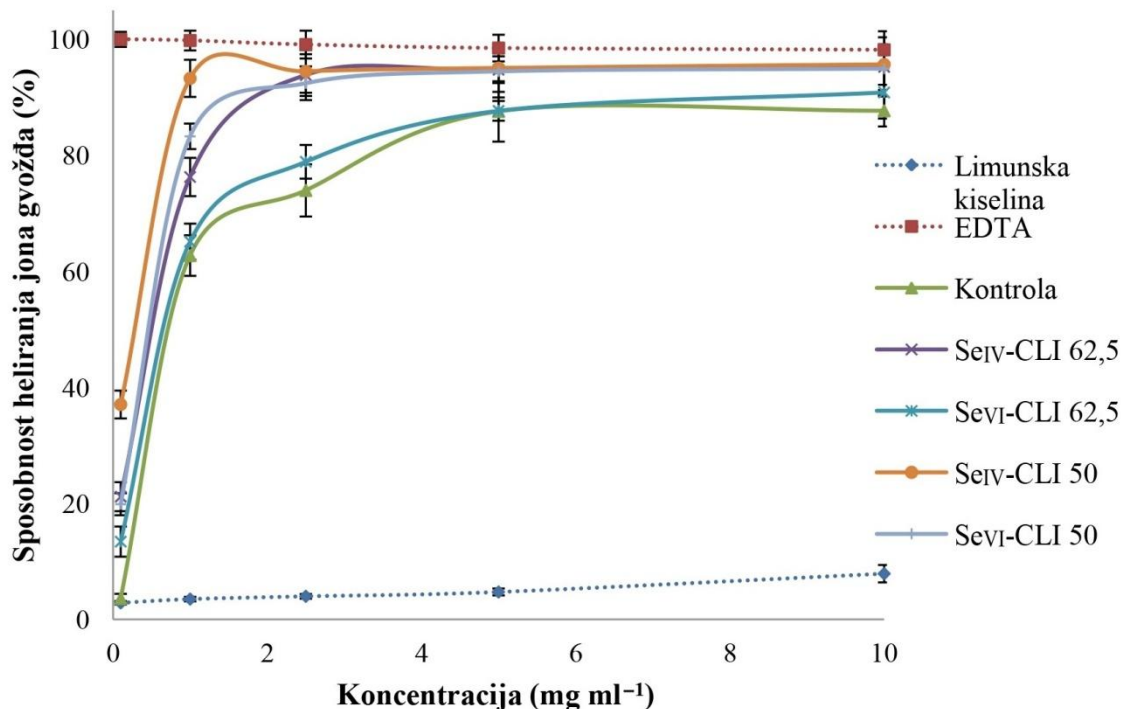
Ekstrakti dobijeni iz gljive obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost heliranja, od 10 do 20%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom pri koncentraciji od 5,0 mg ml⁻¹. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji helirajuća sposobnost se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole smanjivala sledećim redosledom: Se_{VI}-CLI 50 > EDTA > Se_{IV}-CLI 50 ≈ Se_{VI}-CLI 75 > Se_{IV}-CLI 75 > kontrola > limunska kiselina.



Grafik 5.15. Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* prikazana je na grafiku 5.16. Pri koncentraciji od 2,5 mg ml⁻¹ ekstrakti obeleženi sa Se_{IV}-CLI 50, Se_{VI}-CLI 50 i Se_{IV}-CLI 62,5 ispoljili su izuzetno visok helirajući efekat koji je iznosio preko 92%, dalje povećanje koncentracije do 10,0 mg ml⁻¹ uslovalo je neznatni porast od oko 2%. Pri koncentraciji od 5,0 mg ml⁻¹ sposobnost heliranja kontrolnog i Se_{VI}-CLI 62,5 ekstrakta je iznosila približno 87%, dalji rast koncentracije nije značajnije uticao na porast sposobnosti heliranja Fe(II)-jona. Svi metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost heliranja jona gvožđa u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do 10,0 mg ml⁻¹. Pri koncentraciji od 2,5 mg ml⁻¹ ekstrakti dobijeni iz gljive obogaćene selenom ispoljili su jaču sposobnost heliranja, od 7 do 28%, u poređenju sa kontrolnim ekstraktom. Helirajuća sposobnost se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji smanjivala sledećim redosledom: EDTA > Se_{IV}-CLI 50 ≈ Se_{IV}-CLI 62,5 ≈ Se_{VI}-CLI 50 > Se_{VI}-CLI 62,5 > kontrola > limunska kiselina.



Grafik 5.16. Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selen.

Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

Prethodna ispitivanja su pokazala da metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od 2,4 mg ml⁻¹ helira 13,2% Fe(II)-jona (Mau et al., 2002), dok su znatno veće vrednosti od 93,2 ± 0,87% utvrđene za isti ekstrakt gljive iz ovog roda, ali vrste *C. gibbosa* pri koncentraciji od 1,0 mg ml⁻¹ (Ga i Kaviyarasana, 2011). Alam i saradnici (2010) su ustanovili da metanolni ekstrakt gljive *P. ostreatus* ispoljava izuzetno visoku sposobnost heliranja Fe(II)-jona koja pri koncentraciji od 1,0 mg ml⁻¹ iznosi više od 82%. Vrednosti za sposobnost heliranja jona gvožđa od oko 70% ustanovljene pri koncentraciji od 1,6 mg ml⁻¹ za ekstrakt gljive *P. ostreatus* (Yang et al., 2002) najpribližnije su rezultatima ovog istraživanja.

Poznato je da hidroksilne grupe (-OH) polisaharida mogu graditi koordinativne kovalentne veze sa jonima metala, poput bakra ili gvožđa, koje pri tom inaktiviraju i onesposobljavaju da dalje reaguju sa drugim molekulima ili jonima (Zhao et al., 2008). Osim toga, utvrđeno je da polisaharidni ekstrakti izolovani iz gljive *Ganoderma lucidum* obogaćene selenom ispoljavaju jaču antioksidativnost, usled sposobnosti selena da gradi komplekse sa jonima metala (Zhao et al., 2008). U istraživanju iz 2006. godine potvrđeno je da je mehanizam na osnovu kog selen ispoljava antioksidativna svojstva upravo njegova sposobnost da gradi koordinativne kovalentne veze sa jonima metala i tako sprečava oksidativna oštećenja DNK lanca (Battin et al., 2006). Selen je u polisaharidima najverovatnije prisutan u vidu selenil grupe (-SeH) ili estara selenaste ili selenove kiseline (Huang, 1994).

Ranija istraživanja ukazuju da postoji i pozitivna korelacija između sposobnosti heliranja Fe(II)-jona i ukupnog sadržaja polifenola. Fenolna jedinjenja, pored dobro poznate i opisane sposobnosti da hvataju slobodne radikale, pokazuju i izuzetnu moć heliranja jona metala koja je u funkciji njihove strukture, broja i položaja hidroksilnih grupa (Khokhar i Apenten, 2003; Perron et al., 2008).

5.7.1.5. Vrednosti EC₅₀ za metanolne ekstrakte u antioksidativnim metodama

Antioksidativna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva ispitana su primenom različitih metoda (sposobnost hvatanja DPPH radikala, inhibicija peroksidacije lipida, reduktivna sposobnost i sposobnost heliranja Fe(II)-jona i izražena pomoću EC₅₀ vrednosti (mg ml⁻¹) koje predstavljaju efektivne koncentracije ekstrakata pri kojima se postiže 50% antioksidativnih aktivnosti, tabele 5.14 i 5.15. Niže EC₅₀ vrednosti ukazuju na jača antioksidativna svojstva ekstrakata i obrnuto.

Pleurotus ostreatus

Dobijene EC₅₀ vrednosti pri ispitivanju sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala za ekstrakte Se_{VI}-CLI 75, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 su iznosile 2,28, 1,60 i 1,44 mg ml⁻¹ (tabela 5.14). Nije ustanovljena statistički značajna razlika ($\alpha \leq 0,05$) između EC₅₀ vrednosti za ekstrakte Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50. Vrednosti EC₅₀ za kontrolni i Se_{IV}-CLI 75 ekstrakt nisu se mogle očitati sa grafika, > 2,50 mg ml⁻¹. Regresionom analizom je ustanovljena veoma visoka negativna korelacija između EC₅₀ vrednosti i ukupnog sadržaja fenola ($r = -0,9861$), flavonoida ($r = -0,8189$) i ukupnih polisaharida ($r = -0,7839$). Vrednosti EC₅₀ su se smanjivale sa povećanjem koncentracije fenola i flavonoida u ekstraktima. Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između ukupnog sadržaja selena i sposobnosti hvatanja DPPH radikala. U ispitivanim metanolnim ekstraktima je detektovan nizak sadržaj ukupnog selena koji je iznosio 0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$ u kontrolnom ekstraktu i između 7,8 i 27,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ u ekstraktima izolovanim iz gljive obogaćene selenom. Povećanje sposobnosti hvatanja radikala za približno 5% ustanovljeno je sa porastom koncentracije selena sa 52,1 na 63,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Gąsecka et al., 2015). Kako su u ispitivanim ekstraktima utvrđene od 2,5 do 8,0 puta niže koncentracije selena, pretpostavka je da se doprinos selena ogledao u povećanju ukupnog sadržaja fenola, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Turlo et al., 2010; Bhatia et al., 2014).

Dobijene EC₅₀ vrednosti pri ispitivanju sposobnosti inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline za ekstrakte Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 su iznosile 5,83 mg ml⁻¹ (tabela 5.14).

Vrednosti EC_{50} za kontrolni, Se_{IV} -CLI 75 i Se_{VI} -CLI 75 ekstrakt, u kojima je ustanovljen najniži sadržaj fenola, su bile preko $> 10,0 \text{ mg ml}^{-1}$ i nisu se mogle očitati sa grafika. Regresionom analizom je utvrđena visoka, statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih fenola ($r = -0,9834$) i flavonoida ($r = -0,7605$), i umerena negativna korelacija za ukupan sadržaj polisaharida ($r = -0,6806$). Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između ukupnog sadržaja selena i sposobnosti inhibicije peroksidacije lipida. Vrednosti EC_{50} za ispitivani standard α -tokoferol su bile ispod $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$.

Vrednosti EC_{50} pri merenju sposobnosti redukcije metanolnih ekstrakata su iznosile $1,97 \text{ mg ml}^{-1}$ za kontrolni ekstrakt i između $1,11$ i $1,80 \text{ mg ml}^{-1}$ za ekstrakte izolovane iz gljive obogaćene selenom (tabela 5.14). Ustanovljena je veoma visoka statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja polisaharida ($r = -0,9685$), flavonoida ($r = -0,9199$) i polifenola ($r = -0,8520$) i umerena pozitivna korelacija sa sadržajem ukupnih proteina ($r = 0,5769$). Korelacija između ukupnog sadržaja selena i EC_{50} vrednosti nije bila statistički značajna. Askorbinska kiselina se pokazala kao veoma dobar redukujući agens ($EC_{50} < 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$).

Ustanovljene EC_{50} vrednosti za sposobnost heliranja Fe(II)-jona su iznosile $4,83 \text{ mg ml}^{-1}$ za kontrolni ekstrakt, za ekstrakte Se_{IV} -CLI 75 i Se_{VI} -CLI 75 su bile $2,73$ i $3,14 \text{ mg ml}^{-1}$, dok su za ekstrakte Se_{IV} -CLI 50 i Se_{VI} -CLI 50 ustanovljene najniže vrednosti, $0,84$ i $1,13 \text{ mg ml}^{-1}$ (tabela 5.14). Testirani standard, EDTA, je ispoljio veoma visoku sposobnost heliranja Fe(II)-jona ($EC_{50} < 0,1 \text{ mg ml}^{-1}$). Regresionom analizom je ustanovljena veoma visoka negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja fenola ($r = -0,962$), flavonoida ($r = -0,9564$) i ukupnih polisaharida ($r = -0,8541$). Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između ukupnog sadržaja selena i sposobnosti heliranja Fe(II)-jona. Poznato je da selen gradi koordinativne kovalentne veze sa jonima metala, kao i da ispoljava jači afinitet ka formiranju kompleksa sa jonima bakra u odnosu na jone gvožđa (Battin et al., 2006).

U ispitivanim ekstraktima nije dokazana očekivana veza između EC₅₀ vrednosti i ukupnog selena verovatno zbog njegovog niskog detektovanog sadržaja. Pretpostavka je da bi primenom metoda koje se baziraju na heliranju Cu⁺ i/ili Cu²⁺ jona (Říha et al., 2013) ekstrakti ispoljili bolje dejstvo.

Tabela 5.14. Vrednosti EC₅₀ metanolnih ekstrakata gljive *P. ostreatus*, odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena, u antioksidativnim metodama

Metanolni ekstrakti gljive <i>P. ostreatus</i>	EC ₅₀ ¹ (mg ekstrakta ml ⁻¹)			
	Sposobnost hvatanja DPPH radikala	Inhibicija peroksidacije lipida	Sposobnost redukcije	Sposobnost heliranja
Kontrola	> 2,50	> 10	1,97 ± 0,12 ^a	4,83 ± 0,23 ^a
Se _{IV} -CLI 75	> 2,50	> 10	1,80 ± 0,14 ^a	2,73 ± 0,21 ^b
Se _{VI} -CLI 75	2,28 ± 0,17 ^{2a}	> 10	1,36 ± 0,10 ^b	3,14 ± 0,17 ^b
Se _{IV} -CLI 50	1,60 ± 0,11 ^b	5,83 ± 0,18 ^a	1,11 ± 0,07 ^b	0,84 ± 0,09 ^c
Se _{VI} -CLI 50	1,44 ± 0,08 ^b	5,83 ± 0,21 ^a	1,28 ± 0,12 ^b	1,13 ± 0,08 ^c

¹EC₅₀ vrednosti: efektivna koncentracija pri kojoj je 50% 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala prevedeno u redukovani DPPH-H oblik; postignuto 50% inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline; dostignuta vrednost apsorbance od 0,5 za reduktivnu sposobnost; helirano 50% Fe(II)-jona. EC₅₀ vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

²Svaka vrednost je izražena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, α ≤ 0,05, ANOVA, Tukey HSD

Coriolus versicolor

Metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *C. versicolor* su pokazali dobru sposobnost hvatanja DPPH radikala (Tabela 5.15). Vrednosti EC₅₀ za kontrolni, Se_{IV}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 50 ekstrakt su bile u opsegu od 0,96 do 1,09 mg ml⁻¹ i između njih nije ustanovljena statistički značajna razlika (α ≤ 0,05). Ustanovljene EC₅₀ vrednosti za ekstrakte Se_{IV}-CLI 62,5 i Se_{VI}-CLI 62,5 su bile niže i iznosile su od 0,73 do 0,77 mg ml⁻¹. Regresionom analizom je ustanovljena veoma visoka i statistički značajna negativna korelacija između EC₅₀ vrednosti i ukupnog sadržaja fenola (r = - 0,9577) i flavonoida (r = - 0,8364) i umerena pozitivna korelacija sa sadržajem ukupnih polisaharida (r = 0,7477) i β-glukana (r = 0,6816).

U ranijim istraživanjima je utvrđeno da je sposobnost hvatanja slobodnih radikala ugljenih hidrata niska i da se polisaharidi odlikuju nešto većom sposobnošću hvatanja radikala od samih monosaharida (Tsiapali et al., 2001). Korelacija između ukupnog sadržaja selena i EC_{50} vrednosti nije bila statistički značajna.

Dobijene EC_{50} vrednosti pri ispitivanju sposobnosti inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline za ekstrakte Se_{IV} -CLI 50 i Se_{VI} -CLI 50 su iznosile 5,15 i 5,86 $mg\ ml^{-1}$, dok su za kontrolni i Se_{IV} -CLI 62,5 ekstrakt bile 3,64 i 3,94 $mg\ ml^{-1}$ i između njih nije postojala statistički značajna razlika (tabela 5.15). Najniža EC_{50} vrednost je ustanovljena za ekstrakt Se_{VI} -CLI 62,5 i iznosila je 2,15 $mg\ ml^{-1}$. Regresionom analizom je utvrđena visoka, statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih fenola ($r = -0,8215$) i visoka statistički značajna pozitivna korelacija za ukupan sadržaj polisaharida ($r = 0,92$) i β -glukana ($r = 0,9078$). Korelacija između ukupnog sadržaja selena i sposobnosti inhibicije peroksidacije lipida nije bila statistički značajna.

Vrednosti EC_{50} pri merenju sposobnosti redukcije metanolnih ekstrakata su iznosile 3,26 $mg\ ml^{-1}$ za kontrolni ekstrakt i između 1,86 i 2,90 $mg\ ml^{-1}$ za ekstrakte izolovane iz gljive obogaćene selenom (tabela 5.15). Regresionom analizom je utvrđena statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih polisaharida ($r = -0,7283$) i β -glukana ($r = -0,6482$). Ustanovljena je i umerena negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih proteina ($r = -0,5343$), što se može pripisati prisustvu redukativnih aminokiselina poput cisteina, metionina i tirozina u proteinima ekstrakta. Statistički značajna, vrlo visoka i negativna korelacija potvrđena je između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja selena ($r = -0,875$), koji ulazi u sastav pomenutih aminokiselina, cisteina i metionina.

Ustanovljene EC_{50} vrednosti za sposobnost heliranja Fe(II)-jona su iznosile 1,32 $mg\ ml^{-1}$ za kontrolni ekstrakt, za ekstrakte Se_{IV} -CLI 62,5 i Se_{VI} -CLI 62,5 su bile 0,71 i 1,10 $mg\ ml^{-1}$, dok su za ekstrakte Se_{IV} -CLI 50 i Se_{VI} -CLI 50 ustanovljene vrednosti od 0,30 i 0,65 $mg\ ml^{-1}$ (tabela 5.15). Ustanovljena je visoka negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja selena ($r = -0,817$) i umerena negativna korelacija sa sadržajem ukupnih proteina ($r = -0,6621$).

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima u kojima se navodi da se antioksidativna uloga selena ispoljava upravo u građenju koordinatnih veza sa jonima metala (Battin et al., 2006).

Tabela 5.15. Vrednosti EC_{50} metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*, odgajene na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selena, u antioksidativnim metodama

Metanolni ekstrakti gljive <i>C. versicolor</i>	EC_{50}^a (mg ekstrakta ml ⁻¹)			
	Sposobnost hvatanja DPPH radikala	Inhibicija peroksidacije lipida	Sposobnost redukcije	Sposobnost heliranja
Kontrola	0,96 ± 0,05 ^a	3,64 ± 0,21 ^c	3,26 ± 0,13 ^a	1,32 ± 0,04 ^a
Se _{IV} -CLI 62,5	0,77 ± 0,03 ^b	3,94 ± 0,17 ^c	2,15 ± 0,18 ^c	0,71 ± 0,02 ^c
Se _{VI} -CLI 62,5	0,73 ± 0,01 ^b	2,75 ± 0,09 ^d	2,90 ± 0,09 ^b	1,10 ± 0,03 ^b
Se _{IV} -CLI 50	1,09 ± 0,08 ^a	5,15 ± 0,33 ^b	1,86 ± 0,11 ^c	0,30 ± 0,01 ^d
Se _{VI} -CLI 50	1,03 ± 0,05 ^a	5,86 ± 0,24 ^a	1,99 ± 0,14 ^c	0,65 ± 0,03 ^c

^a EC_{50} vrednosti: efektivna koncentracija pri kojoj je 50% 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala prevedeno u redukovani DPPH-H oblik; postignuto 50% inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline; dostignuta vrednost apsorbance od 0,5 za reduktivnu sposobnost; helirano 50% Fe(II)-jona. EC_{50} vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^bSvaka vrednost je izražena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $\alpha \leq 0,05$, ANOVA, Tukey HSD

Poređenjem svih metanolnih ekstrakata obe gljive ustanovljena je statistički značajna, vrlo visoka i negativna korelacija između EC_{50} vrednosti za sposobnost hvatanja DPPH radikala i ukupnog sadržaja polifenola ($r = -0,9653$) i visoka pozitivna korelacija sa sadržajem ukupnih polisaharida ($r = 0,7794$) i β -glukana ($r = 0,8588$). Iste komponente su dominantno uticale i na EC_{50} vrednosti za sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (ukupni polifenoli, $r = -0,9214$; ukupni polisaharidi, $r = 0,7349$; β -glukani, $r = 0,82$). Korelacija između EC_{50} vrednosti za sposobnost redukcije i ukupnog sadržaja polisaharida ($r = -0,8488$) i β -glukana ($r = -0,7958$) je bila statistički značajna, visoka i negativna. Vrednost EC_{50} za sposobnost heliranja Fe(II)-jona je bila visoko negativno korelisana sa sadržajem ukupnih fenola ($r = -0,7703$) i umereno pozitivno sa sadržajem β -glukana ($r = 0,5697$), a potvrđena je i umerena negativna korelacija ($r = -0,6172$) sa ukupnim sadržajem selena.

5.7.2. Antimikrobna svojstva metanolnih ekstrakata gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*

5.7.2.1. Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije

Minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne (MBC) koncentracije kontrolnih i metanolnih ekstrakata izolovanih iz gljiva obogaćenih selenom su prikazane u tabeli 5.16 za *P. ostreatus* i tabeli 5.17 za *C. versicolor*.

Iz prikazanih rezultata se uočava da su ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* ispoljili jače antibakterijsko delovanje, sa nižim ustanovljenim inhibitornim koncentracijama, na Gram pozitivne u odnosu na Gram negativne bakterije. Kod Gram pozitivnih bakterija, najveću osetljivost na ispitivane ekstrakte su pokazali *R. equi* (MIC vrednosti od 1,25 do 20 mg ml⁻¹), *S. epidermidis* (MIC vrednosti od 2,5 do 10 mg ml⁻¹) i *B. cereus* (MIC vrednosti od 10 do 20 mg ml⁻¹). Pored inhibitornog, svi ekstrakti su na ove bakterije delovali i baktericidno u koncentracijama od 5 do 20 mg ml⁻¹. Baktericidno dejstvo je, osim na pomenute bakterije, utvrđeno još i za ekstrakte Se_{IV}-CLI 75 i Se_{VI}-CLI 75 i to u koncentraciji od 40 mg ml⁻¹ na *B. spizizenii*. Kao najrezistentnije na dejstvo ekstrakata su se izdvojile vrste iz roda *Listeria*, sa visokim ustanovljenim MIC vrednostima ili, kao u slučaju *L. innocua*, ni najveća testirana koncentracija nije bila dovoljna da se zaustavi rast ove bakterije (MIC > 40 mg ml⁻¹). Na *Listeria* sp. nijedan ekstrakt nije ispoljio baktericidno dejstvo.

Među testiranim Gram negativnim bakterijama kao najosetljivija se izdvojila *S. sonnei*, sa MIC vrednostima od 2,5 do 20 mg ml⁻¹, zatim slede *Y. enterocolitica* i vrste iz roda *Salmonella* (MIC vrednosti od 5 do 40 mg ml⁻¹), dok su najrezistentniji na dejstvo ekstrakata bili *P. aeruginosa* i vrste iz roda *Proteus*, kod kojih su ustanovljene MIC vrednosti od 40 mg ml⁻¹ ili se, kao u slučaju nekih ekstrakata, u primenjenom opsegu koncentracija nisu mogle odrediti. Baktericidno dejstvo je ustanovljeno jedino za ekstrakt Se_{IV}-CLI 50 na *Y. enterocolitica* pri koncentraciji od 40 mg ml⁻¹.

U testiranom opsegu koncentracija (0,3125 do 40 mg ml⁻¹) nijedan ekstrakt nije ispoljio inhibitorno dejstvo na ispitivane kvasce.

Tabela 5.16. MIC (mg ml⁻¹) i MBC (mg ml⁻¹) vrednosti metanolnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije i kvasce

Mikroorganizam		Kontrola	Se _{IV} -CLI	Se _{VI} -CLI	Se _{IV} -CLI	Se _{VI} -CLI
			75	75	50	50
<i>S. aureus</i>	MIC	10	10	10	20	10
ATCC 25923	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i>	MIC	2,5	10	10	10	5
ATCC 12228	MBC	5	20	20	10	10
<i>B. cereus</i>	MIC	10	10	10	20	10
ATCC 11778	MBC	10	10	10	20	10
<i>B. spizizenii</i>	MIC	40	40	40	–	40
ATCC 6633	MBC	–	40	40	–	–
<i>E. faecalis</i>	MIC	10	10	10	40	10
ATCC 29212	MBC	–	–	–	–	–
<i>L.monocytogenes</i>	MIC	20	40	40	40	40
ATCC 19111	MBC	–	–	–	–	–
<i>L. innocua</i>	MIC	–	–	–	–	–
ATCC 33090	MBC	–	–	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	MIC	10	40	20	10	10
ATCC 19119	MBC	–	–	–	–	–
<i>R. equi</i>	MIC	1,25	5	2,5	20	2,5
ATCC 6939	MBC	5	10	10	20	5
<i>P. aeruginosa</i>	MIC	40	40	40	40	40
ATCC 27853	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. sonnei</i>	MIC	2,5	5	2,5	20	20
ATCC 29930	MBC	–	–	–	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	MIC	5	5	10	40	40
ATCC 27729	MBC	–	–	–	40	–
<i>P. mirabilis</i>	MIC	40	40	40	40	–
ATCC 12453	MBC	–	–	–	–	–
<i>P. hauseri</i>	MIC	40	40	40	–	–
ATCC 13315	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. Enteritidis</i>	MIC	10	10	10	40	20
ATCC 13076	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. Typhimurium</i>	MIC	5	10	10	40	40
ATCC 14028	MBC	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	MIC	10	20	10	40	40
ATCC 25922	MBC	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i> O157:H7	MIC	10	40	20	–	–
ATCC 35150	MBC	–	–	–	–	–
<i>C. freundii</i>	MIC	10	10	10	40	40
ATCC 43864	MBC	–	–	–	–	–
<i>C. albicans</i>	MIC	–	–	–	–	–
ATCC 10231	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. cerevisiae</i>	MIC	–	–	–	–	–
ATCC 9763	MBC	–	–	–	–	–

Kod ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor* primećeno je da ispoljavaju jače inhibitorno i baktericidno dejstvo na Gram pozitivne u odnosu na Gram negativne bakterije (tabela 5.17). Najosetljivije bakterije na delovanje ekstrakata su bile *B.spizizenii*, sa MIC vrednostima ispod testiranih ($< 0,3125 \text{ mg ml}^{-1}$), *R. equi* (MIC vrednosti od $0,3125$ do $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$) i *S. epidermidis* (MIC vrednosti od $0,625$ do 5 mg ml^{-1}). Nešto više koncentracije je bilo potrebno primeniti da bi se inhibirao rast bakterija *S. aureus* (MIC od $1,25$ do 5 mg ml^{-1}) i *B. cereus* (5 mg ml^{-1}). Najrezistentnije bakterije su, kao i u slučaju ekstrakata izolovanim iz bukovače, bile vrste iz roda *Listeria*, a posebno *L. innocua* na koju su samo kontrolni i ekstrakt Se_{VI}-CLI 62,5 delovali inhibitorno i to u koncentracijama od 40 i 20 mg ml^{-1} . Nijedan od testiranih ekstrakata nije ispoljio baktericidno dejstvo na *L. monocytogenes* i *L. innocua*, dok su za sve ostale testirane bakterije utvrđene MBC vrednosti, sa izuzetkom ekstrakta Se_{IV}-CLI 50.

Među testiranim Gram negativnim bakterijama, najniže inhibitorne koncentracije su utvrđene za *S. sonnei* (od $2,5$ do 5 mg ml^{-1}) i *Y. enterocolitica* (od $2,5$ do 5 mg ml^{-1}). Rast svih ostalih testiranih bakterija je bio zaustavljen pri nešto višim koncentracijama ekstrakata, od 10 do 40 mg ml^{-1} , sa izuzetkom ekstrakta Se_{VI}-CLI 50 kod kog ni najviša primenjena koncentracija (40 mg ml^{-1}) nije delovala inhibitorno na bakterije *P. aeruginosa* i *P. mirabilis*. Za isti ekstrakt nije ustanovljeno baktericidno dejstvo na ispitivane bakterije, dok je za ekstrakte Se_{IV}-CLI 62,5 i Se_{IV}-CLI 50 utvrđeno baktericidno dejstvo samo na *P. hauseri* pri koncentraciji od 40 mg ml^{-1} . Kontrolni ekstrakt je delovao baktericidno na pet od deset testiranih Gram negativnih bakterija i to pri 40 mg ml^{-1} , dok je ekstrakt Se_{VI}-CLI 62,5 delovao baktericidno na osam od deset Gram negativnih bakterija (MBC vrednosti od 20 do 40 mg ml^{-1}).

U testiranom opsegu koncentracija ($0,3125$ do 40 mg ml^{-1}) nijedan ekstrakt nije ispoljio inhibitorno dejstvo na ispitivane kvasce.

Tabela 5.17. MIC (mg ml⁻¹) i MBC (mg ml⁻¹) vrednosti metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* na Gram pozitivne i Gram negativne bakterije i kvasce

Mikroorganizmi		Kontrola	Se _{IV} -CLI 62,5	Se _{VI} -CLI 62,5	Se _{IV} -CLI 50	Se _{VI} -CLI 50
<i>S. aureus</i>	MIC	2,5	2,5	1,25	5	2,5
ATCC 25923	MBC	5	20	10	–	10
<i>S. epidermidis</i>	MIC	0,625	5	1,25	1,25	5
ATCC 12228	MBC	1,25	10	1,25	1,25	10
<i>B. cereus</i>	MIC	5	5	5	5	5
ATCC 11778	MBC	5	5	5	5	5
<i>B. spizizenii</i>	MIC	< 0,3125	< 0,3125	< 0,3125	< 0,3125	< 0,3125
ATCC 6633	MBC	0,625	0,625	< 0,3125	1,25	0,625
<i>E. faecalis</i>	MIC	5	10	5	10	10
ATCC 29212	MBC	40	20	40	–	40
<i>L.monocytogenes</i>	MIC	20	40	20	20	20
ATCC 19111	MBC	–	–	–	–	–
<i>L. innocua</i>	MIC	40	–	20	–	–
ATCC 33090	MBC	–	–	–	–	–
<i>L. ivanovii</i>	MIC	10	10	10	20	20
ATCC 19119	MBC	40	40	20	–	–
<i>R. equi</i>	MIC	0,3125	2,5	0,3125	2,5	2,5
ATCC 6939	MBC	2,5	5	2,5	5	5
<i>P. aeruginosa</i>	MIC	40	40	40	40	–
ATCC 27853	MBC	–	–	40	–	–
<i>S. sonnei</i>	MIC	2,5	2,5	2,5	5	5
ATCC 29930	MBC	–	–	40	–	–
<i>Y. enterocolitica</i>	MIC	5	5	5	10	10
ATCC 27729	MBC	40	–	40	–	–
<i>P. mirabilis</i>	MIC	40	40	20	40	–
ATCC 12453	MBC	40	–	40	–	–
<i>P. hauseri</i>	MIC	20	20	10	40	40
ATCC 13315	MBC	40	40	20	40	–
<i>S. Enteritidis</i>	MIC	10	10	10	10	10
ATCC 13076	MBC	40	–	20	–	–
<i>S. Typhimurium</i>	MIC	10	20	10	20	20
ATCC 14028	MBC	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	MIC	20	40	20	20	20
ATCC 25922	MBC	–	–	40	–	–
<i>E. coli</i> O157:H7	MIC	20	40	40	40	40
ATCC 35150	MBC	–	–	–	–	–
<i>C. freundii</i>	MIC	20	20	20	20	20
ATCC 43864	MBC	40	–	40	–	–
<i>C. albicans</i>	MIC	–	–	–	–	–
ATCC 10231	MBC	–	–	–	–	–
<i>S. cerevisiae</i>	MIC	–	–	–	–	–
ATCC 9763	MBC	–	–	–	–	–

Prethodna istraživanja potvrđuju da ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* ispoljavaju antimikrobno delovanje pogotovo na Gram pozitivne bakterije. Metanolni ekstrakti gljive *P. ostreatus* su delovali inhibitorno na vrste iz roda *Bacillus* (Akyuz et al., 2010; Karaman et al., 2010), na *S. aureus* (Akyuz et al., 2010) i *Clostridium perfringens*, dok na rast *L. monocytogenes* nisu imali uticaja (Venturini et al., 2008). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju su u saglasnosti sa literaturnim podacima, vrste iz roda *Staphylococcus* i *B. cereus* su bile osetljive, dok se *L. monocytogenes* pokazala kao najrezistentnija na delovanje ekstrakata ove gljive, i njen rast je bio inhibiran tek primenom visokih koncentracija. U literaturi se za antibakterijsko delovanje ekstrakata gljive *P. ostreatus* na Gram negativne bakterije mogu naći čak i kontradiktorni rezultati. Karaman i saradnici (2010) su ustanovili da su vrste iz roda *Proteus* bile osetljive, dok su *E. coli* i *Salmonella* sp. bile rezistentne na delovanje metanolnih ekstrakata ove gljive. U drugom istraživanju se navodi da je rast *E. coli* bio inhibiran delovanjem ekstrakata gljive *P. ostreatus* (Akyuz et al., 2010).

Metanolni ekstrakti gljive *C. versicolor* su ispoljili jaču antibakterijsku aktivnost, u odnosu na ekstrakte izolovane iz *P. ostreatus*, na *S. aureus*, vrste iz roda *Bacillus* i *S. Enteritidis*, dok je za *E. coli*, *S. flexneri* i *P. mirabilis* ustanovljena rezistencija u testiranom opsegu koncentracija (Karaman et al., 2010).

Brojna ranija istraživanja navode da različiti ekstrakti gljiva ispoljavaju izraženije antimikrobno delovanje sa nižim ustanovljenim minimalnim inhibitornim koncentracijama na Gram pozitivne u odnosu na Gram negativne bakterije (Venturini et al., 2008; Karaman et al., 2010; Alves et al., 2012) što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Kao moguće objašnjenje za ovakve rezultate se navodi razlika u građi ćelijskog zida, koji se kod Gram pozitivnih bakterija sastoji od debelog sloja peptidoglukana (koji čini 50–90% ćelijskog zida), dok je kod Gram negativnih bakterija znatno složeniji i čini ga tanak sloj peptidoglukana (1–10% celokupne mase ćelijskog zida) okružen spoljašnjom membranom (lipopolisaharidnim slojem - LPS). Primenom različitih hemijskih i molekularnih testova je utvrđeno da upravo LPS sloj ima važnu ulogu u obezbeđivanju selektivne propustljivosti ovih bakterija i da predstavlja efikasnu barijeru za prolaz različitih jedinjenja i štetnih agenasa.

Takođe, periplazmatski prostor Gram negativnih bakterija, koji se nalazi između peptidoglukana i LPS sloja sadrži enzime (poput hidrolitičkih enzima) čija je uloga da razgrade molekule unete iz spoljašnje sredine. S druge strane, Gram pozitivne bakterije se sastoje od tanke, hidrofilne, porozne i znatno propustljivije strukture što ih čini manje otpornim na različite agense između ostalih i na ekstrakte gljiva (Klančnik et al., 2010; Li et al., 2010).

Iz dobijenih rezultata se uočava i da ekstrakti izolovani iz iste vrste gljive, odgajene pod identičnim uslovima, uz jedinu razliku u tretmanu sa selenom ili bez (kontrola) ispoljavaju različito antimikrobno delovanje.

U studiji, koja se bavila ispitivanjem uticaja selena na patogene bakterije, ustanovljeno je da se sa povećanjem koncentracije ovog elementa sa 6,25 na 100 mg ml⁻¹ povećavaju i zone inhibicije bakterija *S. aureus* i *E. coli* (sa 10 na 22,5 mm), dok je *P. aeruginosa* bio rezistentniji i pri 100 mg Se ml⁻¹ je uočena zona inhibicije od 17,5 mm. Osim toga, utvrđeno je da je minimalna baktericidna koncentracija selena na *S. aureus* ustanovljena pri 3,125 mg Se ml⁻¹ dok je pri duplo većoj koncentraciji od 6,25 mg ml⁻¹ određeno baktericidno dejstvo na *P. aeruginosa*. Na osnovu SEM mikrografija je ustanovljeno da u prisustvu 50 mg Se ml⁻¹ dolazi do deformacija i gubitka turgidnosti i citoplazmatskog materijala iz ćelija *S. aureus*. Selen u istoj koncentraciji dovodi do deformacija štapićastog oblika i grupisanja ćelija *P. aeruginosa* (Khalid et al., 2014).

Ranija istraživanja, o neorganskim jedinjenjima selena, pokazuju da Na₂SeO₃ pri koncentraciji od 10 µg ml⁻¹ deluje inhibitorno na rast *Helicobacter pylori* u *in vitro* i *in vivo* studijama (Kumar et al., 2010). Drugi autori su ustanovili da Na-selenit, pri istoj koncentraciji, ispoljava antibakterijsko delovanje na *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *Klebsiella planticola* sa zonama inhibicije u opsegu od 15,5 do 26,3 mm (Alam et al., 2016). Suprotno njima, Vasić i saradnici (2011) primećuju da ni pri koncentraciji od 10 mg ml⁻¹ Na-selenit ne ispoljava baktericidno dejstvo na *Bacillus* sp., *E. coli* i *Pseudomonas* sp., ali da utiče na njihov metabolizam i sintezu vanćelijskih proteina, kao i da pojačava efikasnost antibiotika.

Usled sve većeg interesovanja za nanočestice sa antimikrobnim svojstvima primenom selenit-redukujuće bakterije *Stenotrophomonas maltophilia* uspešno su sintetisane Se^0 nanočestice koje deluju inhibitorno na *E. coli* u koncentraciji od $125 \mu\text{g ml}^{-1}$ i na *P. aeruginosa* i *S. aureus* u koncentraciji od $250 \mu\text{g ml}^{-1}$. Kao mogući mehanizam dejstva navodi se produkcija reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u kontaktu sa bakterijama (Zonaro et al., 2015). Naime, u prisustvu tiola, poput glutationa (GSH), koji se sintetiše u bakterijama, formiraju se selenid anjoni (R-Se^-) koji potom, u reakciji sa kiseonikom (O_2) stvaraju superoksid radikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Tran et al., 2009). Ustanovljeno je da, osim bakterija, i gljiva *L. edodes* poseduje sposobnost da redukuje organska i neorganska jedinjenja sa selenom do elementarnog stanja i akumulira sferne Se^0 nanočestice u miceliji, što je i potvrđeno SEM i TEM mikrografijama (Vetchinkina et al., 2013).

U ovoj disertaciji, metanolni ekstrakti $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 75}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 75}$ izolovani iz gljive *P. ostreatus* su ispoljili jače antimikrobno delovanje na Gram negativne bakterije u odnosu na ekstrakte $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 50}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 50}$. U ekstraktima $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI 75}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 75}$ je detektovan veći sadržaj selena, približno tri puta, i niži sadržaj polifenola za oko 30%. Najširi spektar antibakterijskog dejstva i najniže minimalne inhibitorne koncentracije, za većinu ispitivanih bakterija, su utvrđene za ekstrakt $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI 62,5}$, izolovan iz gljive *C. versicolor*, u kom je detektovan visok sadržaj ukupnog selena ($86,3 \pm 4,1 \mu\text{g Se g}^{-1}$) i najviši sadržaj ukupnih polifenola ($29,7 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$). Takođe, ustanovljene su niže MIC i MBC vrednosti za ekstrakte izolovane iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom (sa većim sadržajem ukupnog selena i polifenola) na Gram pozitivne bakterije u odnosu na ekstrakte izolovane iz gljive *P. ostreatus*. Pretpostavka je da bi analiza oksidacionog stanja selena u ispitivanim ekstraktima pomogla da se ustanovi njegov doprinos antimikrobnoj aktivnosti.

5.7.2.2. Određivanje kinetike rasta bakterija merenjem optičke gustine (OD)

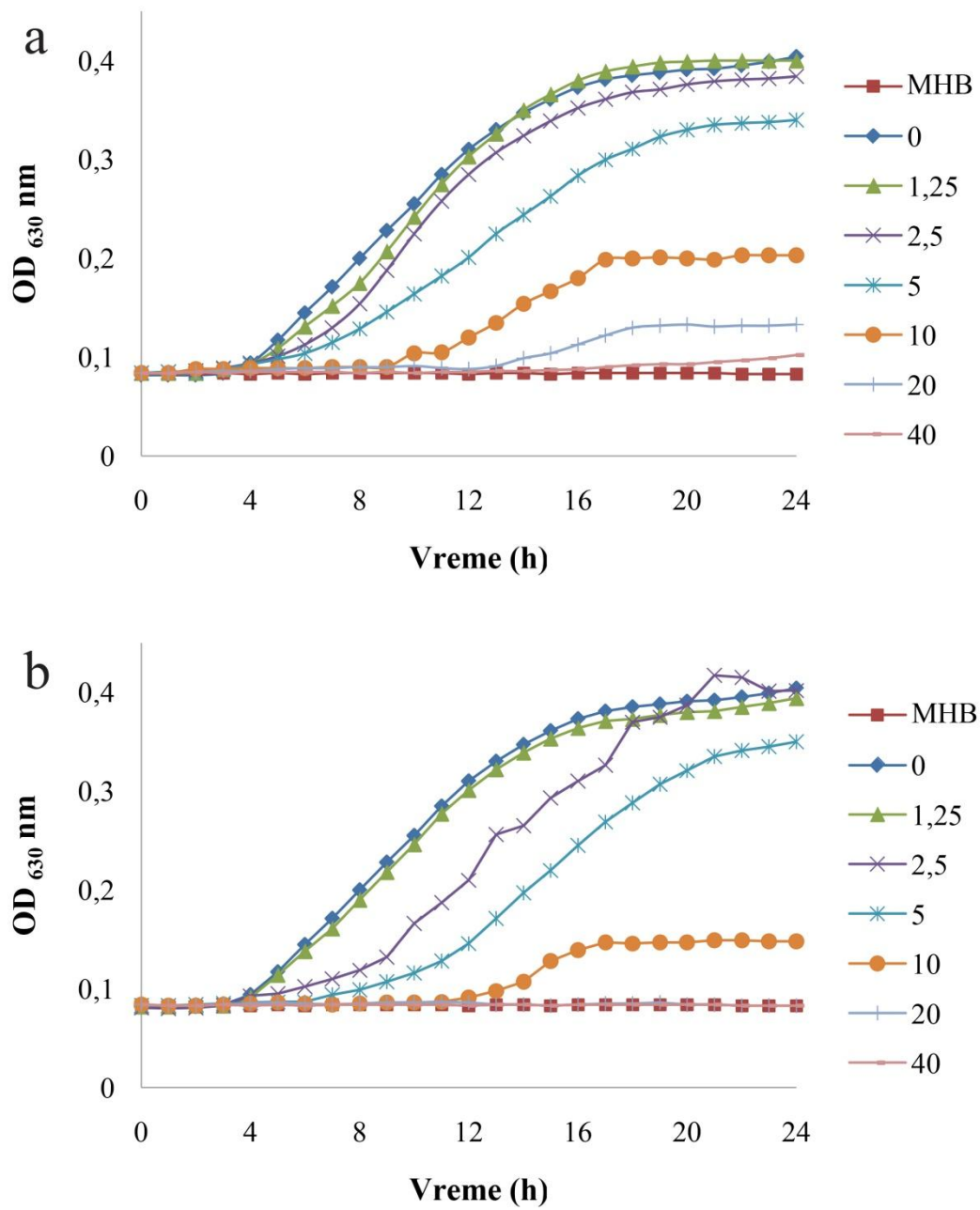
Gram pozitivna bakterija, *S. aureus* i Gram negativna bakterija, *S. Enteritidis* su izabrane za dalja mikrobiološka ispitivanja, premda su za pojedine ispitivane bakterije utvrđene i niže minimalne inhibitorne vrednosti (MIC). Rastuća rezistencija *S. aureus* na postojeće antibiotike predstavlja veliki problem kako za lekare kliničare tako i za ljudsku zajednicu uopšte, jer se sve češće pojavljuju i vanbolnički rezistentni sojevi. Otpornost bakterija *S. aureus* na sve β -laktamske antibiotike označena je kao rezistencija na meticilin (MRSA). Promena mehanizama rezistencije kao i slabljenje efikasnosti postojećih antibiotika ukazuje na potrebu za novim antistafilokoknim agensima (Chambers i DeLeo, 2009). Prema izveštaju centra za kontrolu bolesti iz 2011. godine (CDC, 2011), najčešći uzročnici trovanja hranom, sa desetinama miliona prijavljenih slučajeva godišnje, su ne-tifoidne *Salmonella* spp. i *S. aureus*. Infekcije izazvane vrstama iz roda *Salmonella* predstavljaju globalni problem, kako u nisko tako i u visoko razvijenim zemljama (WHO, 2015). Kontrolni metanolni ekstrakti obe gljive, kao i ekstrakt Se_{IV}-CLI 75 izolovan iz gljive *P. ostreatus* i ekstrakt Se_{VI}-CLI 62,5 dobijen iz gljive *C. versicolor* su, na osnovu rezultata prethodnog ispitivanja, izdvojeni za dalja testiranja. Na krivama rasta određenim merenjem optičke gustine (engl. optical density, OD) moguće je utvrditi lag, eksponencijalnu i stacionarnu fazu dok se faza odumiranja ne može odrediti s obzirom da uređaj ne razlikuje mrtve od živih ćelija.

Krive rasta *S. aureus* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (od 1,25 do 40 mg ml⁻¹) kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* predstavljene su na grafiku 5.17a. Pri koncentracijama ekstrakta od 1,25 – 5 mg ml⁻¹ početak eksponencijalne faze je, kao i za pozitivnu kontrolu, uočen u četvrtom satu, dok su krajnje dostignute OD vrednosti bile približno iste. Pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg ml⁻¹, za koju je na osnovu mikrodulicione metode ustanovljeno da predstavlja MIC, konstantovano je da eksponencijalna faza počinje tek u devetom satu, da traje kraće u odnosu na pozitivnu kontrolu i da ćelije *S. aureus* ranije ulaze u stacionarnu fazu. Dostignute OD vrednosti su iznosile približno polovinu od maksimalne. Pri koncentraciji od 20 mg ml⁻¹ eksponencijalna faza počinje tek u 13. satu i traje vrlo kratko, a krajnje dostignute OD vrednosti su znatno niže od maksimalne.

Koncentracija od 40 mg ml⁻¹ je uslovila izostanak faza rasta i dobijena prava je bila paralelna sa negativnom kontrolom (MHB).

Krive rasta *S. aureus* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) metanolnog ekstrakta Se_{IV}-CLI 75 gljive *P. ostreatus* predstavljene su na grafiku 5.17b. Za razliku od kontrolnog metanolnog ekstrakta, primećeno je da dodatak Se_{IV}-CLI 75 u koncentracijama od 2,5 i 5 mg ml⁻¹ utiče na produžetak lag i kasniji ulazak u eksponencijalnu fazu, nakon 6 h odnosno 8 h, međutim krajnje dostignute vrednosti su bile približno jednake ćelijama *S. aureus* raslim u odsustvu ekstrakata. Pri koncentraciji ekstrakta Se_{IV}-CLI 75 od 10 mg ml⁻¹ početak eksponencijalne faze je primećen u 13. satu, sama faza je trajala nepuna 3 h, a dostignute OD vrednosti su bile približno 4 puta niže u odnosu na maksimalnu (pozitivnu kontrolu). Faze rasta nisu detektovane pri koncentracijama ekstrakta Se_{IV}-CLI 75 od 20 i 40 mg ml⁻¹.

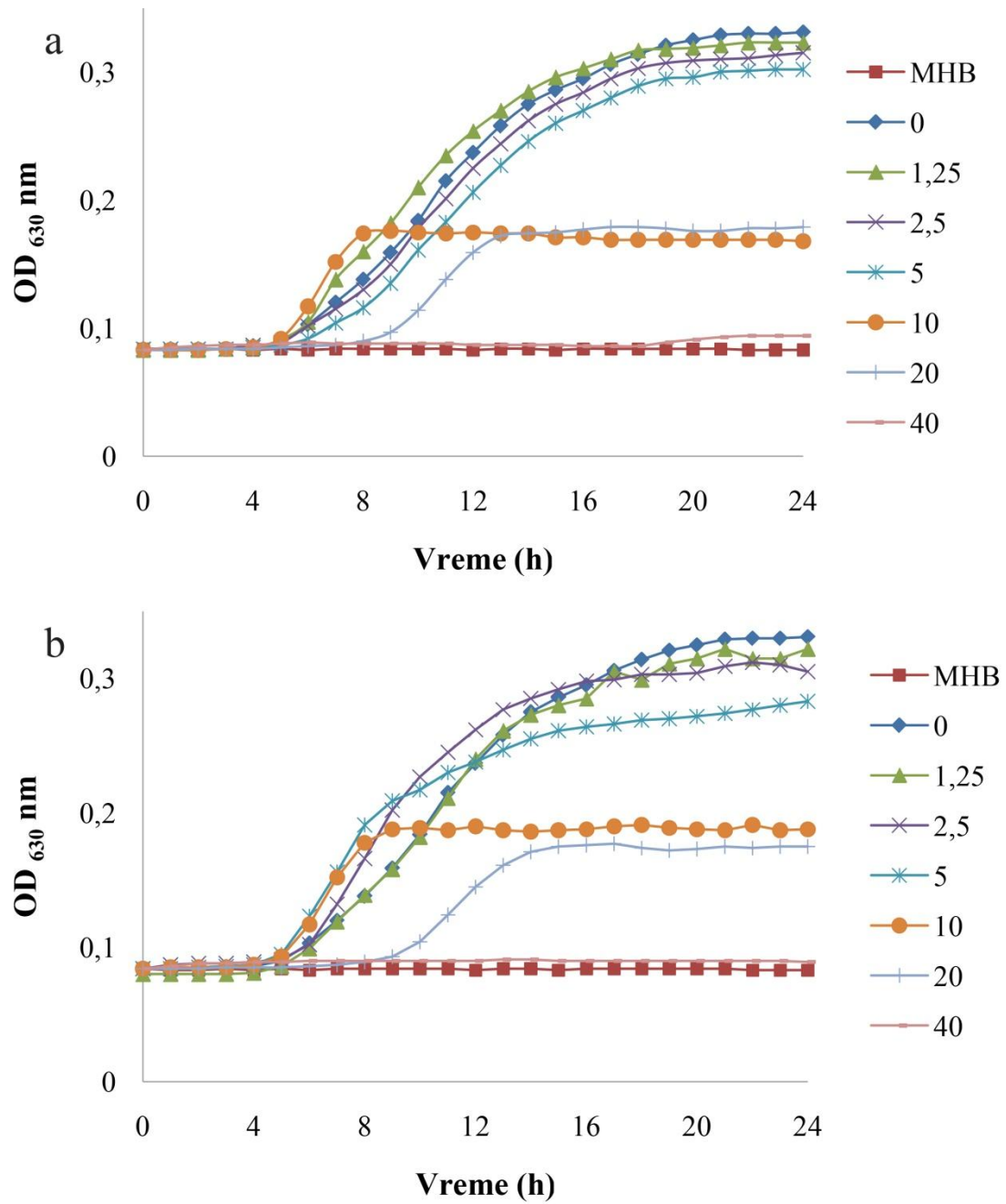
Iako su mikrodilucionom metodom utvrđene iste MIC vrednosti za ova dva ekstrakta, na osnovu krivih rasta se uočava da pri istim koncentracijama ekstrakt Se_{IV}-CLI 75 utiče da ćelije *S. aureus* kasnije uđu u eksponencijalnu fazu, koja u njegovom prisustvu kraće traje, a krajnje dostignute OD vrednosti su znatno niže u odnosu na kontrolni ekstrakt.



Grafik 5.17. Krive rasta *S. aureus* u prisustvu različitih koncentracija (a) kontrolnog i (b) Se_{IV}-CLI 75 metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*.

Krive rasta *S. Enteritidis* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus* predstavljene su na grafiku 5.18a. Pri koncentracijama nižim od 10 mg ml⁻¹ nije ustanovljena inhibicija rasta *S. Enteritidis* ćelija i dobijene krive su bile paralelne pozitivnoj kontroli. Minimalna inhibitorna koncentracija (10 mg ml⁻¹), određena mikrodilucionom metodom, je uticala na dužinu ekspanzionalne faze koja je trajala samo tri sata nakon čega su ćelije odmah ušle u stacionarnu fazu. Pri koncentraciji ekstrakta od 20 mg ml⁻¹ primećeno je da je početna, lag faza produžena i da je prelazak u sledeću, ekspanzionalnu fazu, pomeren sa petog na deveti sat. Krajnje dostignute OD vrednosti, pri koncentracijama od 10 i 20 mg ml⁻¹, su bile približno dva puta niže od maksimalne (pozitivne kontrole). Kao i u slučaju *S. aureus*, koncentracija ekstrakta od 40 mg ml⁻¹ je uslovlila izostanak faza rasta *S. Enteritidis* ćelija.

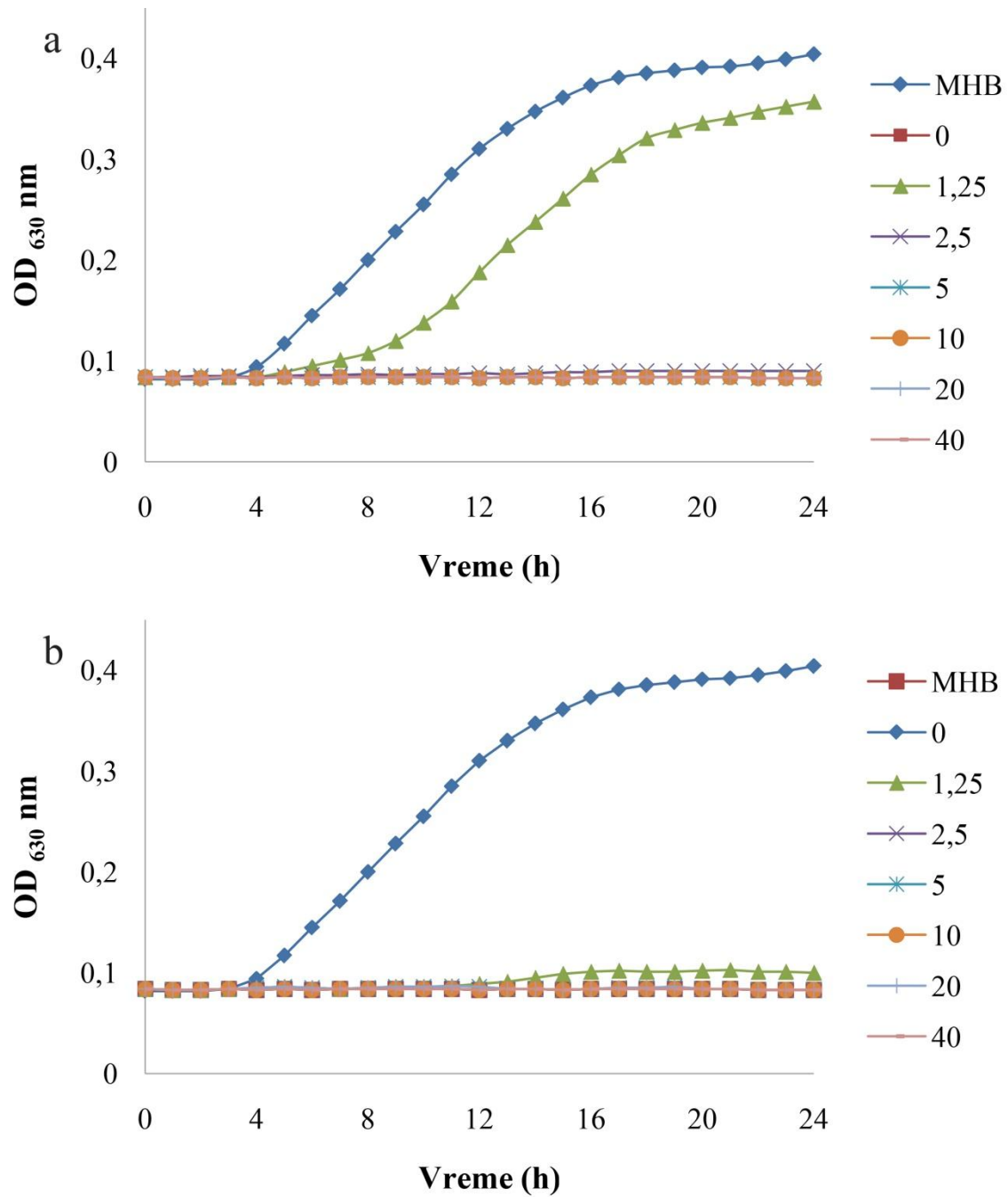
Krive rasta *S. Enteritidis* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) metanolnog ekstrakta Se_{IV}-CLI 75 gljive *P. ostreatus* predstavljene su na grafiku 5.18b. Poređenjem sa kontrolnim ekstraktom ove gljive nisu uočene značajnije razlike. Koncentracije ekstrakta od 10 i 20 mg ml⁻¹ su uticale da ekspanzionalna faza traje znatno kraće (3 – 4 h) i dostignute OD vrednosti nakon 24 h su bile približno dva puta niže u poređenju sa pozitivnom kontrolom, dok je koncentracija od 40 mg ml⁻¹ uslovlila potpuni izostanak faza rasta.



Grafik 5.18. Krive rasta *S. Enteritidis* u prisustvu različitih koncentracija (a) kontrolnog i (b) Se_{IV}-CLI 75 metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*.

Krive rasta *S. aureus* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* predstavljene su na grafiku 5.19a. Pri koncentraciji ekstrakta od 1,25 mg ml⁻¹ primećeno je da se početak eksponencijalne faze pomera sa četvrtog na sedmi sat, međutim nakon 24 h dostignuta OD vrednost se nije značajno razlikovala od pozitivne kontrole. Koncentracije od 2,5 – 40 mg ml⁻¹ su uslovile izostanak faza rasta i dobijene prave su bile paralelne sa negativnom kontrolom (MHB). Mikrodilucionom metodom je za ovaj ekstrakt ustanovljena minimalna inhibitorna koncentracija od 2,5 mg ml⁻¹.

Krive rasta *S. aureus* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) metanolnog ekstrakta Se_{VI}-CLI 62,5 gljive *C. versicolor* predstavljene su na grafiku 5.19b. Sve ispitivane koncentracije ovog ekstrakta su uslovile izostanak faza rasta ćelija *S. aureus* što se na grafiku uočava pravama koje su paralelne sa negativnom kontrolom, odnosno Mueller-Hinton bujonom. Za ovaj ekstrakt je primenom mikrodilucione metode ustanovljena minimalna inhibitorna koncentracija od 1,25 mg ml⁻¹.

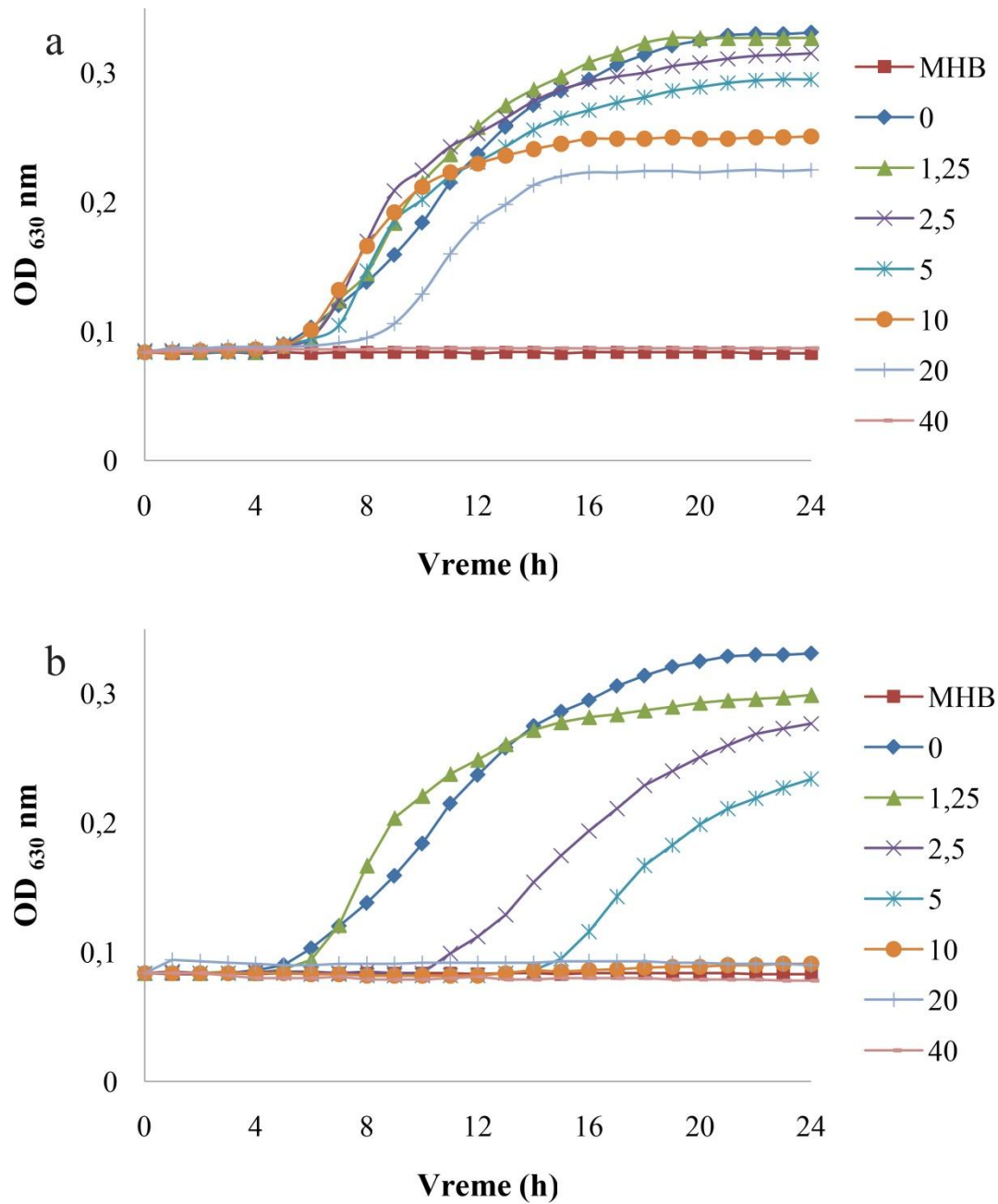


Grafik 5.19. Krive rasta *S. aureus* u prisustvu različitih koncentracija (a) kontrolnog i (b) SeVI-CLI 62,5 metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*.

Krive rasta *S. Enteritidis* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* predstavljene su na grafiku 5.20a. Koncentracije ekstrakta od 1,25 – 5 mg ml⁻¹ nisu inhibirale rast ćelija *S. Enteritidis* i dobijene krive su bile paralelne pozitivnoj kontroli. Koncentracije od 10 i 20 mg ml⁻¹ su uticale na dužinu eksponencijalne faze koja je trajala približno 6 h nakon čega su ćelije ušle u stacionarnu fazu. Dostignute OD vrednosti su bile niže u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Odsustvo faza rasta ćelija *S. Enteritidis* je ustanovljeno pri koncentraciji ekstrakta od 40 mg ml⁻¹.

Krive rasta *S. Enteritidis* ćelija u prisustvu različitih koncentracija (1,25 – 40 mg ml⁻¹) metanolnog ekstrakta Se_{VI}-CLI 62,5 gljive *C. versicolor* predstavljene su na grafiku 5.20b. U poređenju sa kontrolnim ekstraktom, koncentracije Se_{VI}-CLI 62,5 od 2,5 i 5 mg ml⁻¹ su uticale da ćelije *S. Enteritidis* uđu u eksponencijalnu fazu tek nakon 10 h odnosno 15 h. Pri istim koncentracijama ekstrakta nakon 24 h nije detektovan početak stacionarne faze. Koncentracije od 10 – 40 mg ml⁻¹ su uslovile izostanak faza rasta ćelija *S. Enteritidis*.

Iako su mikrodilucionom metodom utvrđene iste MIC vrednosti za ova dva ekstrakta, primenom Se_{VI}-CLI 62,5 za ćelije *S. Enteritidis* nisu detektovane faze rasta, dok su u prisustvu kontrolnog ekstrakta ćelije ušle u eksponencijalnu fazu, ali je ona kraće trajala i krajnje dostignute OD vrednosti su bile niže u poređenju sa pozitivnom kontrolom.



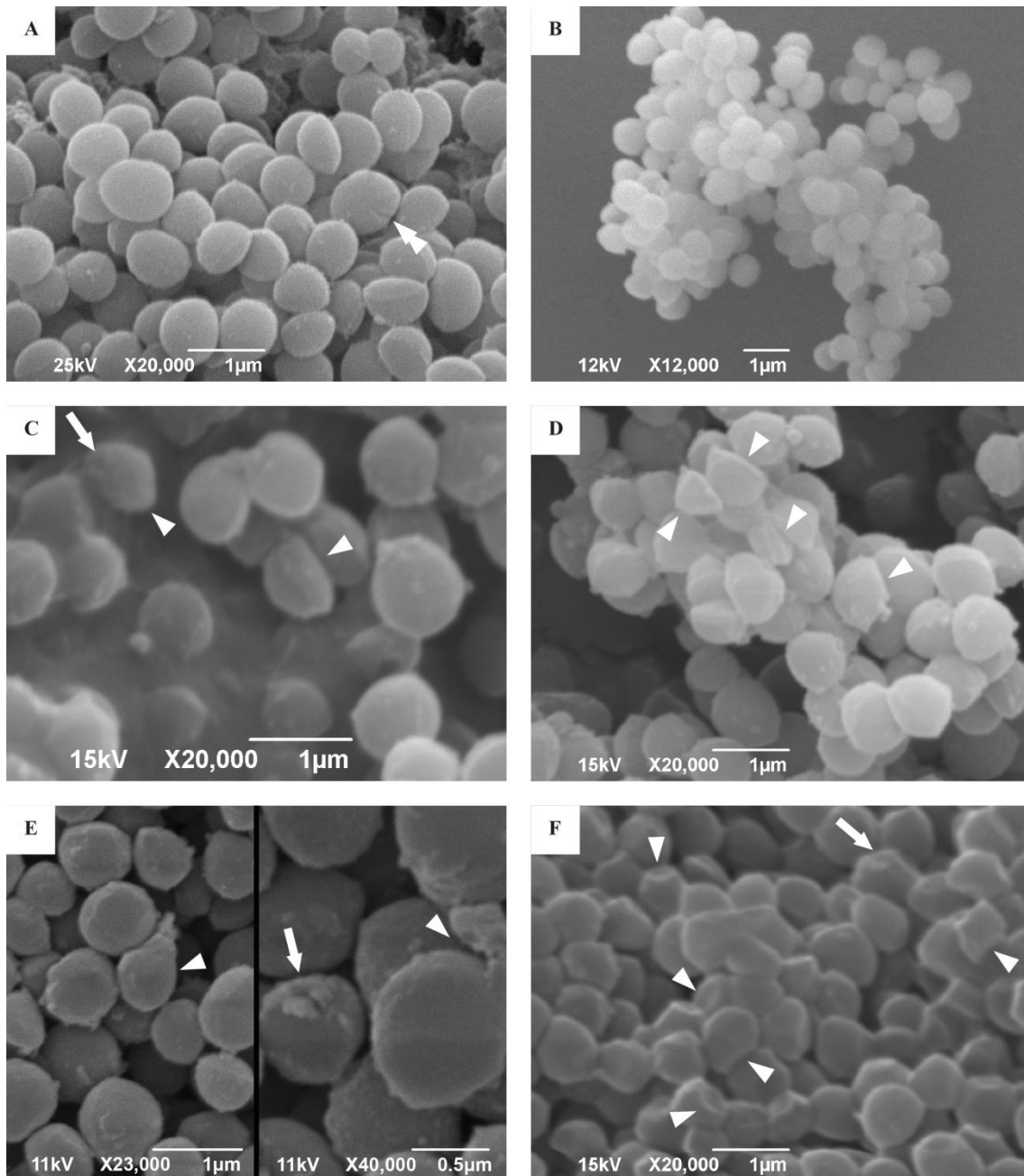
Grafik 5.20. Krive rasta *S. Enteritidis* u prisustvu različitih koncentracija (a) kontrolnog i (b) SeVI-CLI 62,5 metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*.

5.7.2.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

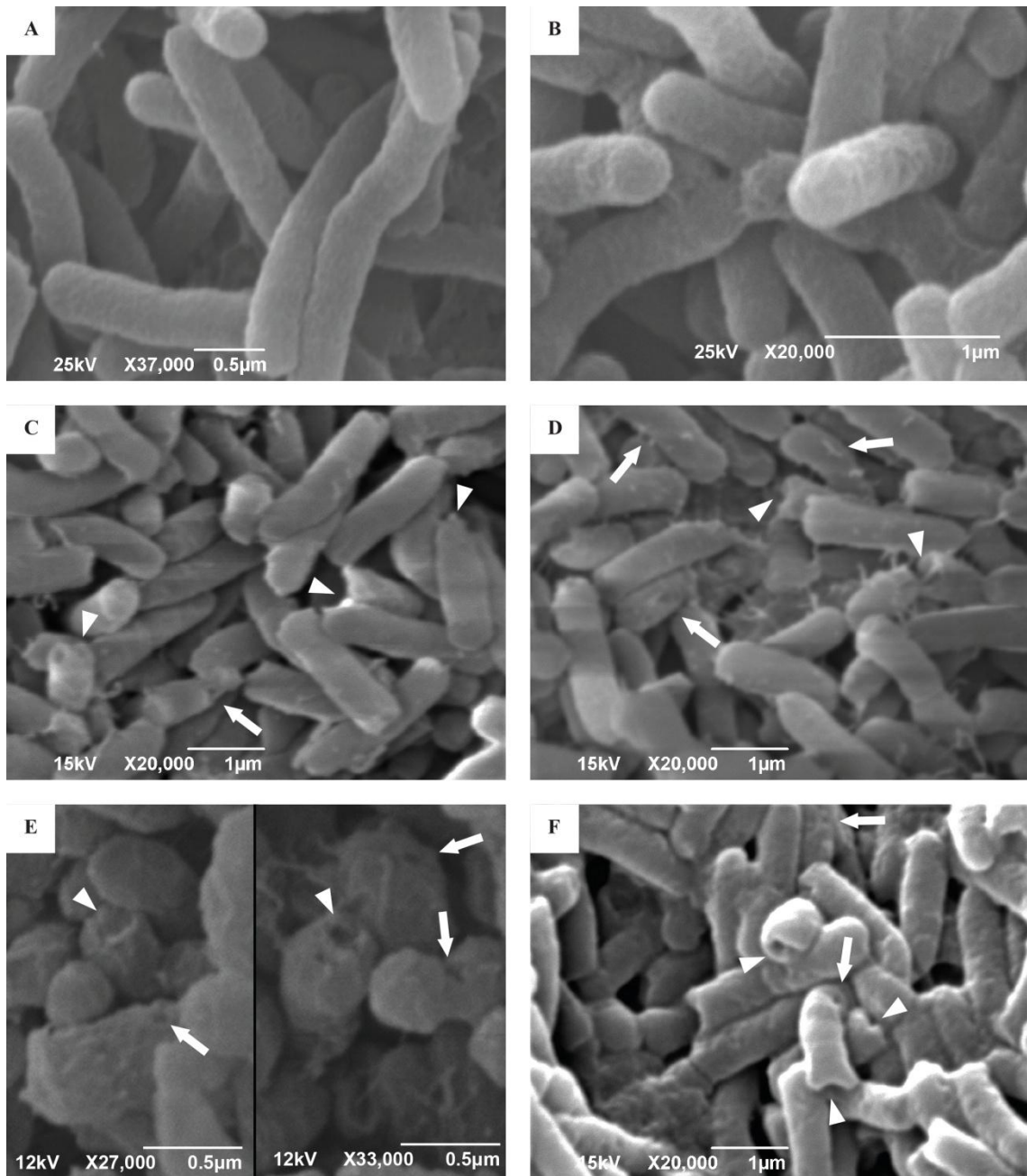
Ćelije *S. aureus* su pod dejstvom minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) metanolnih ekstrakata gljiva *P. ostreatus* (kontrolni i Se_{IV}-CLI 75) i *C. versicolor* (kontrolni i Se_{VI}-CLI 62,5) pokazale značajne morfološke promene u odnosu na netretirane (kontrolne) ćelije. Na slici 5.3 a i b, su prikazane netretirane ćelije *S. aureus* loptastog oblika, raspoređene u vidu grozdastih formacija. Kod netretiranih ćelija se uočava i formiranje septe što ukazuje da se proces razmnožavanja (binarne deobe) neometano odvija. Nakon dejstva metanolnih ekstrakata uočavaju se promene oblika *S. aureus* ćelija koje izgledaju izduženo i deformisano (slika 5.3 c-f), a kod pojedinih ćelija su detektovane i promene na ćelijskom zidu u vidu pukotina (slika 5.3 c, e i f).

Netretirane ćelije *S. Enteritidis* su štapićastog oblika, prosečne dužine od 2 do 4 µm, sa neoštećenom membranom i jasno odvojene jedne od drugih (slika 5.4 a i b). Nakon tretmana metanolnim ekstraktima gljiva uočavaju se kraće ćelije (oko 2 µm) sa izmenjenim odnosom zapremine i površine. Pri nižim odnosima površine i zapremine difuzija nutrienata i otpadnih produkata kroz bakterijske ćelijske membrane je usporenija, a sama ćelija je manje evoluciono sposobna (Harris i Theriot, 2016). Na mikrografijama tretiranih ćelija primećuju se i oštećenja ćelijskog zida i to pretežno u blizini septalne regije i na polovima. Za ralikom od netretiranih, ćelije pod dejstvom ekstrakata se grupišu, a ćelijski sadržaj se izliva u međućelijski prostor (slika 5.4 c-f).

SEM mikrografije potvrđuju značajan antimikrobni potencijal metanolnih ekstrakata gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* obogaćenih selenom.



Slika 5.3. (a i b) SEM mikrografije netretiranih (kontrolnih) ćelija *S. aureus*; (c) izgled bakterijske ćelije nakon delovanja kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*; (d) izgled ćelija nakon delovanja Se_{IV}-CLI 75 metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*; (e) izgled ćelija nakon delovanja kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*; (f) izgled bakterijskih ćelija nakon delovanja Se_{VI}-CLI 62,5 metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*; (dupla strelica pokazuje početak formiranja septe, glava strelice označava morfološki izmenjene ćelije, dok strelica pokazuje pukotine u ćelijskom zidu).



Slika 5.4. (a i b) SEM mikrografije netretiranih ćelija *S. Enteritidis*; (c) izgled bakterijske ćelije nakon delovanja kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*; (d) izgled ćelija nakon delovanja Se_{IV}-CLI 75 metanolnog ekstrakta gljive *P. ostreatus*; (e) izgled ćelija nakon delovanja kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*; (f) izgled bakterijskih ćelija nakon delovanja Se_{VI}-CLI 62,5 metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*; (glava strelice označava pukotine na polovima bakterije, dok strelica pokazuje pukotine u blizini septalne regije).

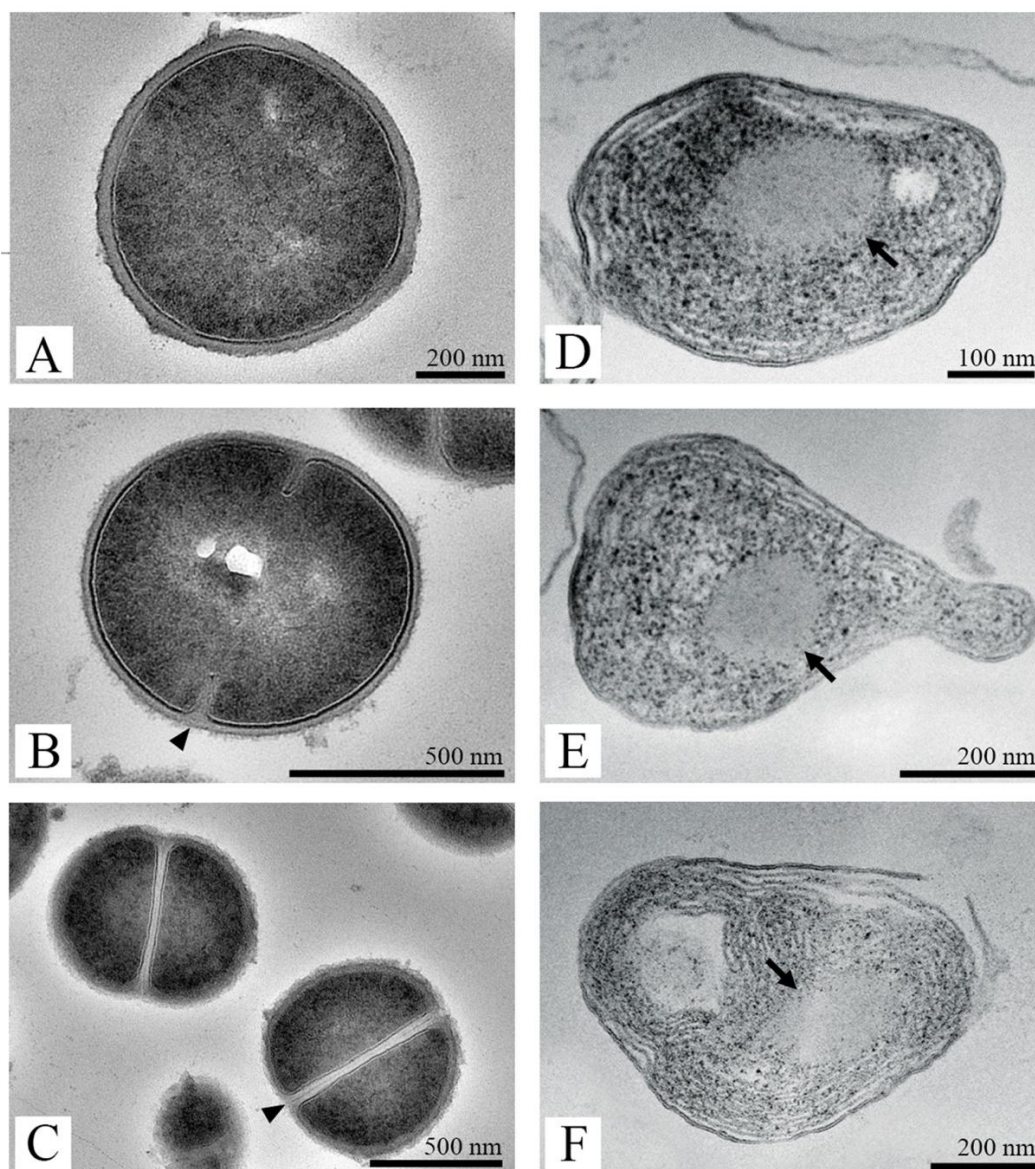
5.7.2.4. Transmisiono elektronska mikroskopija (TEM)

Antibakterijsko dejstvo kontrolnog metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor* potvrđeno je TEM analizom. Na slici 5.5 a-c se uočavaju okrugle netretirane (kontrolne) ćelije *S. aureus* koje su uhvaćene u različitim stadijumima razmnožavanja. Početak formiranja septe i invaginacija ćelijske membrane (citokineza) ka unutrašnjosti ćelije (slika 5.5b), kao i sinteza ćelijskog zida na novonastalim ćerkama ćelijama (slika 5.5c) su detektovani kod netretiranih *S. aureus* ćelija. Na mikrografijama se uočava i debeo ćelijski zid (peptidoglikan), neoštećena ćelijska membrana i veliki broj tamnih okruglih granula raspoređenih pretežno ka membrani koje predstavljaju ribozome.

Brojne ultrastrukturne promene nastale na *S. aureus* ćelijama se uočavaju nakon tretmana metanolnim ekstraktom (slika 5.5 d-f). Na TEM mikrografijama se primećuje da je oblik tretiranih ćelija izmenjen, izduženiji i deformisaniji, dok je sam ćelijski zid znatno tanji u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Velika okrugla „tela” bez membrane sa elektronskom gustinom sličnoj septi (peptidoglikanskom sloju) se takođe uočavaju u citoplazmi. Detektovane su i lizirane ćelije sa u potpunosti izmenjenom i oštećenom citoplazmom koja je u formi lamela (slika 5.5 f).

SEM i TEM mikrografije ćelija *S. aureus* tretiranih metanolnim ekstraktima ukazuju da je došlo do ireverzibilnih oštećenja citoplazmatične membrane i gubitka njene permeabilnosti. Ranija istraživanja pokazuju da komponente eteričnih ulja, poput terpena, deluju na citoplazmatičnu membranu bakterija što dovodi do izmenjene morfologije samih ćelija (Carson et al., 2002; Nazzaro et al., 2013). Ustanovljeno je da pod dejstvom eteričnog ulja *Origanum vulgare* dolazi do promene oblika ćelija *S. aureus* što je autore navelo na zaključak da je citoplazmatična membrana oštećena (de Souza et al., 2010). Kod ćelija *S. aureus* tretiranih antimikrobnim peptidima uočeno je prisustvo velikih okruglih „tela” bez membrane (Hartmann et al., 2010). Za detektovana „tela” je konstatovano da imaju sličnu elektronsku gustinu kao septa (mureinski sloj), te je izvedena pretpostavka da se ova „tela” formiraju u citoplazmi u slučajevima kada je onemogućena translokacija komponenata ćelijskog zida sa citoplazmatične strane na drugu stranu membrane i da predstavljaju nagomilane prekursore peptidoglikana i teihojnih kiselina.

S obzirom da su biosinteza i unakrsno povezivanje i formiranje mreže peptidoglikana funkcije regulisane citoplazmatičnom membranom, prisustvo ovih „tela” u ćelijama *S. aureus* tretiranim metanolnim ekstraktima gljiva takođe ukazuju na njeno oštećenje. Na mikrografijama se uočavaju i lizirane ćelije (slike 5.3 e-f i 5.5 f) čiji je unutarćelijski sadržaj u potpunosti izmenjen, što navodi na pretpostavku da je do lize došlo usled aktiviranja enzima koji učestvuju u procesima autolize ili kao posledica slabljenja ćelijskog zida (Carson et al., 2002; Matijašević et al., 2016).

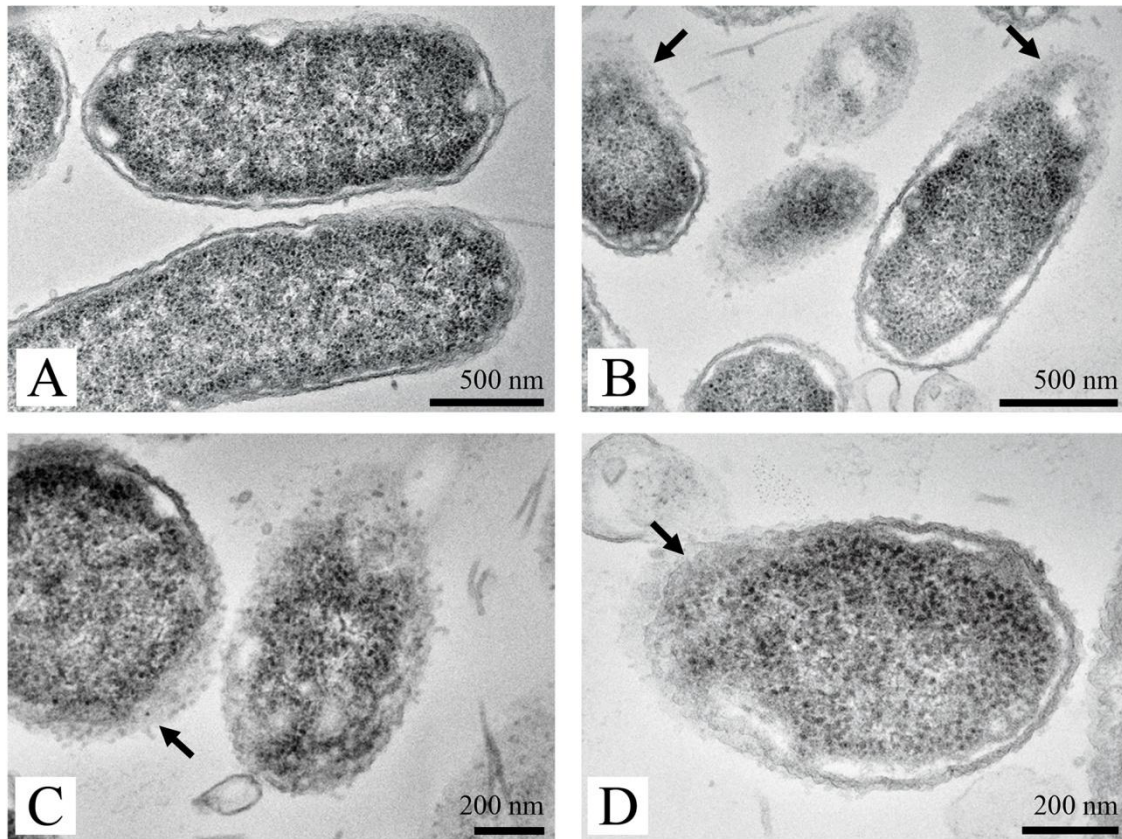


Slika 5.5. (a-c) TEM mikrografije okruglih netretiranih ćelija *S. aureus* uhvaćenih u različitim stadijumima razmnožavanja; (d-f) izgled bakterijske ćelije nakon delovanja metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*.

Na slici 5.6a prikazana je kontrolna ćelija *S. Enteritidis* sa neoštećenim ćelijskim zidom, bez pukotina, ispod kog se nalazi tanak periplazmatski prostor. Unutarćelijski sadržaj je normalno distribuiran, a citoplazmatska membrana je tesno priljubljena uz ćelijski zid.

TEM mikrografije bakterijskih ćelija tretiranih ekstraktom ukazuju da dolazi do pucanja ćelijskog zida, gubitka ćelijskog materijala i ćelijske lize (slika 5.6 b-d). Uočava se i odvajanje citoplazmatske membrane od ćelijskog zida, kao i nesimetrično distribuiranje citoplazme i izmenjen ćelijski sadržaj. Periplazmatski prostor tretiranih ćelija pod dejstvom ekstrakta postaje širi i nepravilan.

SEM i TEM mikrografije ukazuju da je kao posledica dejstva metanolnih ekstrakata došlo do oštećenja ćelijskog zida ćelija *S. Enteritidis*. Pukotine na ćelijskom zidu se pretežno uočavaju u blizini septalne regije i na polovima (slike 5.4 c-f i 5.6 b-d). Kako su ove regije kod Gram-negativnih bakterija poput *E. coli* i *S. Enteritidis* bogate negativno naelektrisanim kardiolipinom (Romantsov et al., 2009), pretpostavka je da pojedine komponente ekstrakata reaguju upravo sa ovim slojem. Na SEM mikrografijama se uočava da dolazi i do grupisanja ćelija (slika 5.4 c-f). Utvrđeno je da pod dejstvom etarskog ulja dolazi do oštećenja ćelijskog zida *S. Enteritidis* što za posledicu ima gubitak turgidnosti i citoplazmatskog materijala i konačno rezultira grupisanjem bakterijskih ćelija (Tyagi et al., 2013). Helander i saradnici (1998) su ispitujući komponente eteričnih ulja, ustanovili da monoterpeni mogu da dezintegrišu spoljašnju membranu Gram-negativnih bakterija što dovodi do izlivanja ćelijskog sadržaja iz ćelije u ekstracelularni prostor. Slične morfološke promene na membrani *P. aeruginosa* uočene su i u ranijim istraživanjima u kojima se navodi da do pucanja ćelijskog zida dolazi pod dejstvom polifenola iz čaja (Yi et al., 2010). Takođe, primenom TEM analiza utvrđeno je da se katehin (flavonoid) vezuje za spoljašnju membranu Gram-negativne bakterije *E.coli*. Kao mogući mehanizam, navodi se interakcija katehina sa aminokiselinama lokalizovanim na unutrašnjem zidu pore čime se inhibira funkcija porina - zaduženih za transport malih hidrofilnih molekula i sprečava apsorpcija hranljivih sastojaka poput glukoze (Nakayama et al., 2013).



Slika 5.6. (a) TEM mikrografije kontrolnih *S. Enteritidis* ćelija; (b-d) izgled bakterijske ćelije nakon delovanja metanolnog ekstrakta gljive *C. versicolor*.

Poznato je da se većina niskomolekularnih jedinjenja gljiva, poput fenola i terpena, ekstrahuje primenom metanola kao rastvarača (Cheung i Cheung, 2005). Karaman i saradnici (2010) su analizirajući fenolne komponente metanolnih ekstrakata gljiva detektovali visok sadržaj kafene kiseline i niži sadržaj galne i protokatehinske kiseline u ekstraktu gljive *C. versicolor*, dok su galna i protokatehinska bile dominantne fenolne kiseline ekstrakta gljive *P. ostreatus*. Primenom RP-HPLC analize, Harhaji i saradnici (2008) su u metanolnom ekstraktu gljive *C. versicolor* detektovali brojne komponente karakteristične za fenolna jedinjenja i terpenoide (poput ganoderinske kiseline).

Pretpostavlja se da fenolne kiseline, zbog svoje delimične lipofilne prirode, prolaze kroz ćelijsku membranu olakšanom difuzijom, povećavaju njenu propustljivost i prouzrokuju curenje unutarćelijskog sadržaja. Fenolne kiseline verovatno utiču i na smanjenje unutraćelijske pH vrednosti i dovode do denaturacije proteina (Campos et al., 2009a). Ranija istraživanja pokazuju da fenolne kiseline, derivati cimetine kiseline (*p*-kumarinska, kafena i ferulinska kiselina) prouzrokuju jače curenje jona, poput kalijuma i fosfora, u poređenju sa derivatima benzojeve kiseline (protokatehinska, galna i vanilinska kiselina).

Osim toga, poznato je da su Gram-pozitivne bakterije, usled razlike u građi, osetljivije na dejstvo polifenola u poređenju sa Gram-negativnim (Cardona et al., 2013), što može biti jedno od objašnjenja veće osetljivosti i nižih MIC vrednosti ustanovljenih za metanolne ekstrakte gljiva korišćenih u ovom radu na Gram-pozitivne bakterije.

Rezultati ovih eksperimenata dokazuju da metanolni ekstrakti gljiva, kako kontrolnih tako i obogaćenih selenom, poseduju značajan inhibitorski efekat na patogene mikroorganizme dovodeći do štetnih morfoloških promena u ćelijskim strukturama kao i na površini ćelijske membrane patogena. U vezi sa navedenim podacima metanolni ekstrakti gljiva se mogu smatrati potencijalnim agensom za sprečavanje rasta patogenih mikroorganizama koji se mogu izolovati iz hrane.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu ispitivanja usvojivosti selena dodatog u supstrat u vidu različitih jedinjenja i određivanja aktivnosti enzimskih antioksidanata u svežim plodonosnim telima gljiva *Pleurotus ostreatus* i *Coriolus versicolor*, kao i na osnovu hemijske karakterizacije i testiranja bioloških svojstava metanolnih ekstrakata izolovanih iz gljiva obogaćenih selenom izvedeni su sledeći zaključci:

1. Praćenjem uticaja različitih jedinjenja sa selenom na rast micelije gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* na laboratorijskim hranljivim podlogama utvrđeno je da su se Se-obogaćeni zeoliti pokazali kao dobar izvor ovog elementa. Kao najbolji izvor selena za gljivu *P. ostreatus* izdvojio se $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$, dok su Na-selenit i Na-selenat pri svim ispitivanim koncentracijama značajnije inhibirali rast micelije ove gljive. Neorganska so, natrijum-selenat je delovala najtoksičnije na rast micelije gljive *C. versicolor*, dok je dodatak $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ pri nižim koncentracijama stimulisao njen rast.

2. Ispitivanjem mogućnosti usvajanja selena dodatog u supstrat u različitim koncentracijama i obliku ustanovljeno je da su se Se-obogaćeni zeoliti izdvojili kao bolji izvori ovog elementa za gljivu *P. ostreatus* u poređenju sa Na_2SeO_3 i Na_2SeO_4 . Kada je selen dodat u supstrat u koncentraciji od 75 mg kg^{-1} u vidu $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$ njegov sadržaj u plodonosnom telu je bio između $210 - 250 \mu\text{g g}^{-1}$, dok je dodatkom Na_2SeO_3 i Na_2SeO_4 detektovan sadržaj između $110 - 160 \mu\text{g Se g}^{-1}$ računato na suhu masu uzorka. Dodatkom selena u koncentraciji od 50 mg kg^{-1} nije uočena statistički značajna razlika u usvojivosti ovog elementa (u proseku $85 \mu\text{g g}^{-1}$) između različitih tretmana. Razlika u morfologiji između kontrolnih i gljiva sa selenom nije uočena. Takođe, nije konstatovano ni kašnjenje u fruktifikaciji gljiva obogaćenih selenom u odnosu na kontrolni uzorak.

3. Ispitivanjem mogućnosti usvajanja selena u plodonosno telo gljive *C. versicolor* primećeno je da je dodatak veće koncentracije u supstrat uslovio smanjenje sposobnosti gljive da akumulira ovaj element, kao i da su pogodniji izvori bili $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI}$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI}$ u odnosu na neorganske soli.

Kada je selen dodat u supstrat u koncentraciji od 62,5 mg kg⁻¹ u vidu Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI njegov sadržaj u plodonosnom telu je iznosio u proseku 110 µg g⁻¹, dok je dodatkom Na₂SeO₃ i Na₂SeO₄ detektovan sadržaj između 50 – 80 µg Se g⁻¹ računato na suhu masu uzorka. Nije uočena razlika u morfologiji plodonosnih tela između kontrolnih i gljiva obogaćenih selenom. Obe ispitivane koncentracije selena (50 i 62,5 mg kg⁻¹) dodate u supstrat u obliku Na₂SeO₄ uslovile su kašnjenje u fruktifikaciji, u proseku dve nedelje, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Za druga ispitivana jedinjenja sa selenom kašnjenje u formiranju plodonosnih tela nije uočeno.

4. Generalno, kod obe gljive bolja usvojivost selena je ustanovljena dodatkom Se-obogaćenog zeolita u supstrat u poređenju sa dodatkom Na-selenita i Na-selenata. Bolja akumulacija ovog elementa iz Se(IV)- i Se(VI)-modifikovanog zeolita može se objasniti sposobnošću ovog minerala da vezuje vodonikov jon (zahvaljujući negativno naelektrisanj alumosilikatnoj mreži) i tako reguliše pH sredine.

5. Praćenjem uticaja Se-obogaćenog zeolita (Se_{IV}-CLI i Se_{VI}-CLI) na aktivnost enzima antioksidativnog sistema zaštite u svežem plodonosnom telu gljive *P. ostreatus* ustanovljeno je da je bolja aktivnost detektovana dodatkom niže koncentracije selena u supstrat. Dodatkom 50 mg Se kg⁻¹ utvrđena je jača aktivnost enzima superoksid-dismutaze (22,5–37%), glutation-peroksidaze (26–61%) i katalaze (oko 16%) u poređenju sa kontrolnom gljivom. Koncentracija od 75 mg Se kg⁻¹ uslovlila je jaču aktivnost superoksid-dismutaze (10–31%) i glutation-peroksidaze (oko 22%), dok se aktivnost katalaze nije statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu gljivu.

6. Ispitivanjem aktivnosti enzima antioksidativnog sistema zaštite u svežim plodonosnim telima gljive *C. versicolor* utvrđena je najjača aktivnost superoksid-dismutaze i katalaze, kao i najslabija aktivnost-glutation peroksidaze dodatkom Se_{VI}-CLI u koncentraciji 62,5 mg Se kg⁻¹. Između Se_{IV}-CLI 50 i kontrolnog uzorka nije ustanovljena statistički značajna razlika ($\alpha \leq 0,05$) u aktivnosti superoksid-dismutaze. Kod ostalih uzoraka sa selenom (Se_{IV}-CLI 62,5, Se_{VI}-CLI 50 i Se_{VI}-CLI 62,5) dokazana je jača aktivnost SOD u odnosu na kontrolu i to od 24 do 38%. Najveća koncentracija glutation-peroksidaze dokazana je za uzorak Se_{IV}-CLI 50 i bila je oko 1,2 puta veća od kontrole.

Za ostale uzorke sa selenom je utvrđena statistički značajno niža aktivnost u poređenju sa kontrolom. Praćenjem aktivnosti katalaze ustanovljeno je da se uzorak Se_{IV}-CLI 50 jedini nije statistički značajno razlikovao od kontrole. Uzorci Se_{IV}-CLI 62,5 i Se_{VI}-CLI 50 su ispoljili jaču aktivnost enzima za oko 24%, dok je uzorak Se_{VI}-CLI 62,5 ispoljio najjaču aktivnost katalaze koja je za oko 65% bila veća u odnosu na kontrolu.

7. Skriningom proteinskog profila gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor*, sa i bez dodatog selena, kod gljive *P. ostreatus* detektovano je približno sedam frakcija sa molekulskim masama u opsegu od 25 kDa do 70 kDa. Kod gljive *C. versicolor* detektovan je veći broj proteinskih frakcija, oko deset, i širi opseg molekulskih masa, od oko 25 kDa do 100 kDa. Na osnovu dobijenih gelova ustanovljeno je da selen prisutan u uzorcima nije uticao na promenu molekulskih masa ispitivanih gljiva.

8. Analizom sadržaja selena u metanolnim ekstraktima utvrđena je veća koncentracija ovog elementa u ekstraktima pripremljenim iz gljive *C. versicolor*. Gotovo sav selen prisutan u gljivi *C. versicolor* je ekstrahovan metanolom i njegov sadržaj je iznosio od oko 85 do 120 $\mu\text{g g}^{-1}$ u ekstraktu i od 105–140 $\mu\text{g g}^{-1}$ u plodonosnom telu. U plodonosnim telima gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom utvrđen je visok sadržaj ovog elementa (80–250 $\mu\text{g g}^{-1}$), dok je u metanolnim ekstraktima sadržaj bio dosta nizak i kretao se u opsegu od oko 8–27 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ što ukazuje da se kod ove gljive selen pretežno nalazi u formi nerastvornej u alkoholima. Dobijeni rezultati ukazuju na drugačiju distribuciju selena u ispitivanim gljivama.

9. Ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima dobijenim iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom je povećan (7–13%) u odnosu na kontrolni ekstrakt. Sadržaj polisaharida u ekstraktima gljive *C. versicolor* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Dodatkom 50 mg Se kg^{-1} u supstrat primećen je značajno veći sadržaj polisaharida (13 do 19%), dok se pri koncentraciji od 62,5 mg Se kg^{-1} sadržaj polisaharida nije statistički značajno promenio.

10. Sadržaj ukupnih i β -glukana u ekstraktima dobijenim iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom je povećan u odnosu na kontrolni ekstrakt. Sadržaj ovih polisaharidnih komponenata u ekstraktima gljive *C. versicolor* je zavisio od koncentracije dodatog selena. Dodatkom niže koncentracije selena (50 mg kg^{-1}) ustanovljen je veći sadržaj ukupnih i β -glukana u ekstraktima u poređenju sa kontrolom, dok se dodatkom veće koncentracije selena ($62,5 \text{ mg kg}^{-1}$) sadržaj komponenti nije promenio.

11. Sadržaj lipida u ekstraktima gljive *P. ostreatus* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Kod ekstrakata dobijenih iz gljive odgajene na supstratu sa dodatkom 75 mg Se kg^{-1} primećen je veći sadržaj lipida za približno 25%, dok je koncentracija od 50 mg Se kg^{-1} uslovlila smanjenje lipida za 10 do 25% u odnosu na kontrolni ekstrakt. Veći sadržaj ukupnih lipida, za 1,5 do 3,0 puta, utvrđen je kod svih ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom u odnosu na kontrolni ekstrakt.

12. Sadržaj ukupnih proteina u ekstraktima gljive *P. ostreatus* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Ekstrakti $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 75$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 75$ su imali između 20 i 25% više proteina u odnosu na kontrolu, dok je kod ekstrakata dobijenih iz gljive odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg^{-1} primećen niži sadržaj i do 50%. Svi ekstrakti izolovani iz gljive *C. versicolor* su sadržali od 17 do čak 127% više proteina u odnosu na kontrolni ekstrakt.

13. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim iz gljive *P. ostreatus*, odgajene na supstratu sa dodatkom selena, se povećao za 15–50% u odnosu na kontrolni ekstrakt. Sadržaj fenola u ekstraktima gljive *C. versicolor* zavisio je od koncentracije dodatog selena. Dodatkom $62,5 \text{ mg Se kg}^{-1}$ u supstrat primećen je veći sadržaj fenola od 10 do 15% u poređenju sa kontrolnim ekstraktom, dok se pri koncentraciji od 50 mg Se kg^{-1} njihov sadržaj nije značajnije menjao.

14. Veći sadržaj ukupnih flavonoida ustanovljen je kod svih ekstrakata dobijenih iz gljiva obogaćenih selenom u odnosu na kontrolne ekstrakte. Ekstrakti gljive *P. ostreatus* imali su od 6,5 do 12% više flavonoida u odnosu na kontrolni ekstrakt.

Razlika je bila još izraženija kod ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom kod kojih je utvrđen 2,0 do 4,5 puta veći sadržaj flavonoida u poređenju sa kontrolnim ekstraktom.

15. Primenom FT-IR analize nije uočena značajnija razlika u spektrima između ekstrakata izolovanih iz gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* odgajenih na supstratu sa i bez dodatka selen. Traka na oko 1640 cm^{-1} (amid I) koja ukazuje na prisustvo proteina detektovana je samo kod ekstrakata izolovanih iz gljive *P. ostreatus* odgajene na supstratu sa dodatkom 50 mg Se kg^{-1} . Kod gljive *C. versicolor*, najizraženije spektralne razlike između kontrolnog i ekstrakata pripremljenih iz selenom obogaćene gljive se uočavaju u amidnom regionu (na oko 1630 cm^{-1}).

16. Metanolni ekstrakti izolovani iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom ispoljili su jače antioksidativno dejstvo u procesu inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu linoleinske kiseline u odnosu na kontrolni ekstrakt u ispitivanom opsegu koncentracija. Najjača sposobnost inhibicije peroksidacije lipida je ustanovljena za ekstrakte $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$ i pri koncentraciji od 10 mg ml^{-1} je iznosila $64,4 \pm 2,7$ odnosno $61,2 \pm 1,8\%$. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida svih ispitivanih metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* se povećavala sa porastom koncentracije. Ekstrakt $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$ je ispoljio najjači stepen inhibitorne aktivnosti koji je dostigao maksimum od $79,4 \pm 2,1\%$ pri koncentraciji od 10 mg ml^{-1} .

17. Sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljiva uglavnom su rasle sa povećanjem njihove koncentracije. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ($2,5\text{ mg ml}^{-1}$) najjača sposobnost je ustanovljena za ekstrakte $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 50$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 50$ izolovane iz gljive *P. ostreatus* i iznosila je $62,5 \pm 3,1\%$ odnosno $65,7 \pm 3,2\%$. Kod gljive *C. versicolor* najjača aktivnost je utvrđena za ekstrakte $\text{Se}_{\text{IV}}\text{-CLI } 62,5$ i $\text{Se}_{\text{VI}}\text{-CLI } 62,5$ i pri istoj istoj koncentraciji je bila $92,1 \pm 2,7$ odnosno $91,7 \pm 2,8\%$.

18. Svi metanolni ekstrakti izolovani iz gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* obogaćenih selenom ispoljili su jaču sposobnost redukcije jona gvožđa u odnosu na kontrolne ekstrakte u ispitivanom opsegu koncentracija. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ekstrakata (20 mg ml^{-1}) dostignute vrednosti su bile bliske pozitivnoj kontroli (askorbinska kiselina).

19. Metanolni ekstrakti izolovani iz gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* obogaćenih selenom ispoljili su jači helirajući efekat u odnosu na kontrolne ekstrakte u ispitivanom opsegu koncentracija. Pri koncentraciji od 5 mg ml^{-1} ekstrakti gljive *P. ostreatus* su ispoljili jaču sposobnost heliranja Fe (II) jona od 10 do 20%, dok je pri koncentraciji od $2,5 \text{ mg ml}^{-1}$ za ekstrakte gljive *C. versicolor* ta vrednost bila veća 7–28% u poređenju sa kontrolnim ekstraktom.

20. Najniže EC_{50} vrednosti pri ispitivanju sposobnosti inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline ustanovljene su za ekstrakte $Se_{IV}\text{-CLI } 50$ i $Se_{VI}\text{-CLI } 50$ izolovane iz gljive *P. ostreatus* i iznosile su $5,83 \text{ mg ml}^{-1}$. Regresionom analizom je utvrđena visoka, statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih fenola i flavonida. Kod gljive *C. versicolor* najniža EC_{50} vrednost je ustanovljena za ekstrakt $Se_{VI}\text{-CLI } 62,5$ i iznosila je $2,15 \text{ mg ml}^{-1}$. Regresionom analizom je utvrđena visoka, statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih fenola i visoka statistički značajna pozitivna korelacija sa ukupnim sadržajem polisaharida i β -glukana. Korelacija između ukupnog sadržaja selena u ekstraktima i sposobnosti inhibicije peroksidacije lipida nije bila statistički značajna.

21. Najniže EC_{50} vrednosti pri ispitivanju sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala za gljivu *P. ostreatus* su ustanovljene za ekstrakte $Se_{IV}\text{-CLI } 50$ i $Se_{VI}\text{-CLI } 50$ i iznosile su 1,60 odnosno $1,44 \text{ mg ml}^{-1}$. Svi ekstrakti dobijeni iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom su pokazali dobru sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ($EC_{50} < 1,0 \text{ mg ml}^{-1}$). Veoma visoka i statistički značajna negativna korelacija je ustanovljena između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja fenola i flavonoida. Nije ustanovljena statistički značajna korelacija između ukupnog sadržaja selena i sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala.

22. Svi ekstrakti dobijeni iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom su pokazali dobru redukcionu sposobnost ($EC_{50} < 1,8 \text{ mg ml}^{-1}$), koja je, na osnovu regresione analize, bila visoko korelirana sa sadržajem ukupnih polisaharida, flavonoida i fenola. Dobijene EC_{50} vrednosti za ekstrakte gljive *C. versicolor* obogaćene selenom su se kretale u opsegu od $1,86 - 2,90 \text{ mg ml}^{-1}$. Regresionom analizom je utvrđena statistički značajna negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i sadržaja ukupnih polisaharida i β -glukana. Statistički značajna, vrlo visoka i negativna korelacija potvrđena je i između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja selena.

23. Ustanovljene EC_{50} vrednosti za sposobnost heliranja Fe(II) jona kod svih ekstrakata dobijenih iz gljive *P. ostreatus* obogaćene selenom su bile niže u odnosu na kontrolni ekstrakt. Veoma visoka negativna korelacija utvrđena je između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja fenola, flavonoida i ukupnih polisaharida. Svi ekstrakti dobijeni iz gljive *C. versicolor* obogaćene selenom su pokazali dobru sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ($EC_{50} < 1,10 \text{ mg ml}^{-1}$). Ustanovljena je visoka negativna korelacija između EC_{50} vrednosti i ukupnog sadržaja selena što se objašnjava sposobnošću ovog elementa da gradi koordinativne kovalentne veze sa jonima metala.

24. Zahvaljujući dobrim antioksidativnim sposobnostima, gljive obogaćene selenom mogu biti iskorišćene u terapeutske svrhe, u prehrambenoj industriji (kao zamena sintetičkim antioksidansima) i u farmaceutskoj industriji. U prehrambenoj industriji bi se mogle koristiti kao zaštita namirnicama koje sadrže masti i ulja, a koje usled užeglosti vrlo brzo postaju neupotrebljive.

25. Ispitivanjem antimikrobnih sposobnosti ekstrakata gljiva obogaćenih selenom utvrđeno je da su Gram-pozitivne bakterije uglavnom bile osetljivije na dejstvo ekstrakata u poređenju sa Gram-negativnim vrstama. Takođe, analizirani ekstrakti, u ispitivanom opsegu koncentracija, nisu inhibirali rast kvasaca.

26. Posmatranjem antimikrobne aktivnosti ekstrakata izolovanih iz gljive *P. ostreatus* na Gram pozitivne bakterije utvrđeno je da su bakterije *R. equi*, *S. epidermidis* i *B. cereus* ispoljile najveću osetljivost. Pored inhibitornog, svi ekstrakti su na ove bakterije delovali i baktericidno u koncentracijama od 5 do 20 mg ml^{-1} .

Baktericidno dejstvo je, osim na pomenute bakterije, utvrđeno još i za ekstrakte Se_{IV}-CLI 75 i Se_{VI}-CLI 75 i to u koncentraciji od 40 mg ml⁻¹ na *B. spizizenii*.

Među testiranim Gram negativnim bakterijama kao najosetljivija se izdvojila *S. sonnei*, zatim slede *Y. enterocolitica* i vrste iz roda *Salmonella*. Baktericidno dejstvo je potvrđeno jedino za ekstrakt Se_{IV}-CLI 50 na *Y. enterocolitica* pri koncentraciji od 40 mg ml⁻¹.

27. Na osnovu ispitivanja antimikrobne aktivnosti ustanovljeno je da su najosetljivije bakterije na delovanje ekstrakata izolovanih iz gljive *C. versicolor* bile *B.spizizenii*, *R. equi* i *S. epidermidis*. Nijedan od testiranih ekstrakata nije ispoljio baktericidno dejstvo na *L. monocytogenes* i *L. innocua*, dok su za sve ostale testirane bakterije utvrđene MBC vrednosti, sa izuzetkom ekstrakta Se_{IV}-CLI 50.

Među testiranim Gram negativnim bakterijama, najniže inhibitorne koncentracije su utvrđene za *S. sonnei* i *Y. enterocolitica* (od 2,5 do 5 mg ml⁻¹). Najjača antimikrobna aktivnost je ustanovljena za ekstrakt Se_{VI}-CLI 62,5 koji je delovao baktericidno na osam od deset testiranih Gram negativnih bakterija (MBC vrednosti od 20 do 40 mg ml⁻¹).

28. Praćenjem kinetike rasta mikroorganizama merenjem optičke gustine, za minimalne inhibitorne koncentracije utvrđene mikrodilucionom metodom, određene su fazu u kojoj ekstrakti ispoljavaju antimikrobno dejstvo. Na osnovu krivih rasta se uočava da pri istim koncentracijama ekstrakt Se_{IV}-CLI 75 izolovan iz gljive *P. ostreatus* utiče da ćelije *S. aureus* kasnije uđu u eksponencijalnu fazu, koja u prisustvu ovog ekstrakta kraće traje, a krajnje dostignute OD vrednosti su znatno niže u odnosu na kontrolni ekstrakt.

Takođe, primenom Se_{VI}-CLI 62,5 ekstrakta izolovanog iz gljive *C. versicolor* za ćelije *S. Enteritidis* nisu detektovane faze rasta, dok su u prisustvu kontrolnog ekstrakta ćelije ušle u eksponencijalnu fazu, ali je ona kraće trajala i krajnje dostignute OD vrednosti su bile niže u poređenju sa ćelijama *S. Enteritidis* raslim u odsustvu ekstrakata.

29. Primenom SEM i TEM tehnika utvrđene su morfološke i ultrastrukturne promene koje su nastale na bakterijama pod dejstvom ekstrakata gljiva. Nakon dejstva metanolnih ekstrakata uočene su promene oblika *S. aureus* ćelija koje izgledaju izduženo i deformisano, a kod pojedinih ćelija su detektovane i promene na ćelijskom zidu u vidu pukotina. Kod ćelija *S. Enteritidis* tretiranih ekstraktima primećeno je oštećenje ćelijskog zida i to pretežno u blizini septalne regije i na polovima. Takođe, za ralik od netretiranih, ćelije pod dejstvom ekstrakata se grupišu, a ćelijski sadržaj se izliva u međućelijski prostor.

SEM i TEM mikrografije ćelija *S. aureus* tretiranih metanolnim ekstraktima ukazuju da je došlo do ireverzibilnih oštećenja citoplazmatične membrane i gubitka njene permeabilnosti, dok se kao posledica dejstva ekstrakata na ćelije *S. Enteritidis* javlja pucanje ćelijskog zida, gubitak ćelijskog materijala i ćelijska liza.

30. Rezultati antimikrobnih testiranja dokazuju da metanolni ekstrakti gljiva, kako kontrolni tako i obogaćeni selenom, poseduju značajan inhibitorski i letalni efekat na mikroorganizme. Ekstrakti gljiva se mogu smatrati potencijalnim agensom za sprečavanje rasta mikroorganizama poreklom iz hrane s obzirom da predstavljaju smeše različitih komponenata i da kao takvi smanjuju verovatnoću pojave rezistencije koja poslednjih godina predstavlja sve ozbiljniji globalni problem.

Većina uzoraka gljiva *P. ostreatus* i *C. versicolor* odgajanih na supstratu sa dodatkom selena u vidu Se(IV)- i Se(VI)-obogaćenog zeolita pokazuje jaču aktivnost enzimskih antioksidanata: superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze i katalaze. S obzirom na zaštitnu ulogu ovih enzima, gljive odgajene na ovaj način bi duži vremenski period zadržale boju, teksturu, aromu i kvalitet, dok bi se njihovom eventualnom administracijom *in vivo* moglo uticati na smanjenje oksidativnih oštećenja biomolekula i usporavanje starenja. U *in vitro* uslovima ekstrakti gljiva obogaćeni selenom su pokazali izuzetan antimikrobni i antioksidativni potencijal. Korišćenjem gljiva u prehrambenoj industriji kao prirodnih antioksidanata koji nemaju neželjena dejstva moguće je zaštititi namirnice podložne oksidaciji, poput ulja i masti. Takođe, zbog sve učestalijeg problema rastuće rezistencije mikroorganizama na postojeće antibiotike primena gljiva i njihovih ekstrakata kao prirodnih izvora jedinjenja sa antimikrobnim svojstvima može biti vrlo interesantna.

7. LITERATURA

1. Ajuwon, O. R., Marnewick, J. L., Davids, L. M. (2015): Rooibos (*Aspalathus linearis*) and its Major Flavonoids - Potential Against Oxidative Stress-Induced Conditions. In: Gowder, S. J. T. (Ed.), Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress. InTech
2. Akyuz, M., Onganer, A. N., Erecevit, P., Kirbag, S. (2010): Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of Turkey. Gazi University Journal of Science 23(2):125-130.
3. Alam, M. F., Safhi, M. M., Moni, S. S., Jabeen, A. (2016): *In Vitro* Antibacterial Spectrum of Sodium Selenite against Selected Human Pathogenic Bacterial Strains. Scientifica, 2016. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9176273>
4. Alam, N., Yoon, K. N., Lee, K. R., Shin, P. G., Cheong, J. C., Yoo, Y. B., ... Lee, T. S. (2010): Antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of different extracts from *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. Mycobiology 38(4):295-301.
5. Allan, C. B., Lacourciere, G. M., Stadtman, T. C. (1999): Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium 1, 2. Annual review of nutrition 19(1):1-16.
6. Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002): Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of experimental botany 53(372):1331-1341.
7. Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012): A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. Planta Medica 78(16):1707-1718.
8. Alves, M. J., Ferreira, I. C., Froufe, H. J., Abreu, R. M. V., Martins, A., Pintado, M. (2013): Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. Journal of applied microbiology 115(2):346-357.
9. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Starkov, A. A. (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry (Moscow) 70(2):200-214.
10. Anke, T., Kupka, J., Schramm, G., Steglich, W. (1980): Antibiotics from Basidiomycetes. X. Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius Scorodonius* (Fr.) Fr. The Journal of antibiotics 33(5):463-467.

11. Anke, T., Watson, W. H., Giannetti, B. M., Steglich, W. (1981): Antibiotics from Basidiomycetes. XIII. The alliacols A and B from *Marasmius alliaceus* (Jacq. ex Fr.) Fr. *The Journal of antibiotics* 34(10):1271-1277.
12. Arenas, F. A., Díaz, W. A., Leal, C. A., Pérez-Donoso, J. M., Imlay, J. A., Vásquez, C. C. (2010): The *Escherichia coli* *btuE* gene, encodes a glutathione peroxidase that is induced under oxidative stress conditions. *Biochemical and biophysical research communications* 398(4):690-694.
13. Arumuganathan, T., Manikantan, M. R., Indurani, C., Rai, R. D., Kamal, S. (2010): Texture and quality parameters of oyster mushroom as influenced by drying methods. *Int Agrophys* 24:339-42.
14. Arvy, M. P. (1989): Some factors influencing the uptake and distribution of selenite in the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). *Plant and soil* 117(1):129-133.
15. Backović, D. (2005): Selen u očuvanju zdravlja i nastanku bolesti. *Vojnosanitetski pregled* 62(3):227-234.
16. Bánfalvi, G. (2011): Heavy metals, trace elements and their cellular effects. In: Bánfalvi, G. (Ed.), *Cellular effects of heavy metals*. Springer Netherlands, pp. 3-28.
17. Barbolina, I., Woods, C. R., Lozano, N., Kostarelos, K., Novoselov, K. S., Roberts, I. S. (2016): Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2D Materials* 3(2):025025.
18. Barron, G. L., Thorn, R. G. (1987): Destruction of nematodes by species of *Pleurotus*. *Canadian Journal of Botany* 65(4):774-778.
19. Barros, L., Baptista, P., Ferreira, I. C. (2007): Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology* 45(9):1731-1737.
20. Barycki, J. J. (2008): Glutathione. In: Banerjee, R., Becker, D., Dickman, M., Gladyshev, V., Ragsdale, S. (Eds.), *Redox biochemistry*. Jon Wiley & Sons, Inc., New Jersey, pp. 11-21.
21. Battin, E. E., Perron, N. R., Brumaghim, J. L. (2006): The central role of metal coordination in selenium antioxidant activity. *Inorganic chemistry* 45(2):499-501.
22. Battin, E. E., Brumaghim, J. L. (2009): Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics* 55(1):1-23.

23. Baum, M. K., Shor-Posner, G., Lai, S., Zhang, G., Lai, H., Fletcher, M. A., Sauberlich, H., Page, J. B. (1997): High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 15(5):370-374.
24. Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44(1):276–287.
25. Belinky, P. A., Goldberg, D., Krinfeld, B., Burger, M., Rothschild, N., Cogan, U., Dosoretz, C. G. (2002): Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure. *Enzyme and microbial technology* 31(6):754-764.
26. Bhatia, P., Aureli, F., D'Amato, M., Prakash, R., Cameotra, S. S., Nagaraja, T. P., Cubadda, F. (2013): Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food chemistry* 140(1):225–230.
27. Bhatia, P., Prakash, R., Prakash, N. T. (2014): Enhanced antioxidant properties as a function of selenium uptake by edible mushrooms cultivated on selenium-accumulated waste post-harvest wheat and paddy residues. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture* 3(4):127-132.
28. Bilos, M.S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. *Science* 131:1199–1200.
29. Borchers, A. T., Keen, C. L., Gershwin, M. E. (2004): Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Experimental Biology and Medicine* 229(5):393-406.
30. Böse, S. R. (1946): Antibiotics in a polyporus (*Polystictus sanguineus*). *Nature* 292-296.
31. Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1-2):248–254.
32. Breck, D. W. (1974): Zeolite molecular sieves: structure, chemistry and use. Wiley, New York.
33. Breene, W. M. (1990): Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *Journal of Food Protection* 53(10):883-894.

34. Brigelius-Flohé, R. (1999): Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 27(9):951-965.
35. Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O., Hogg, T. A. (2009a): Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology* 135(2):144-151.
36. Campos, J. A., Tejera, N. A., Sánchez, C. J. (2009b): Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals* 22(5):835-841.
37. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., Queipo-Ortuño, M. I. (2013): Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of nutritional biochemistry* 24(8):1415-1422.
38. Carey, P. R. (1992): *Biochemical application of Raman and resonance Raman spectroscopies*. Academic Press, New York.
39. Carson, C. F., Mee, B. J., Riley, T. V. (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46(6):1914-1920.
40. Carocho, M., Ferreira, I. C. (2013): A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51:15-25.
41. CDC (2011): Burden of Foodborne Illness: Findings. Available at: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>
42. Chambers, H. F., DeLeo, F. R. (2009): Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 7(9):629-641.
43. Cheng, G. Y., Liu, J., Tao, M. X., Lu, C. M., Wu, G. R. (2012): Activity, thermostability and isozymes of superoxide dismutase in 17 edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 26(1):136–143.
44. Cheung, L. M., Cheung, P. C., Ooi, V. E. (2003): Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81(2):249-255.
45. Cheung, L. M., Cheung, P. C. (2005): Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89(3):403-409.

46. Cho, N. S., Malarczyk, E., Nowak, G., Nowak, M., Kochmanska-Rdest, J., Leonowicz, A., Ohga, S. (2002): Changes in phenol oxidases and superoxide dismutase during fruit-body formation of *Pleurotus* on sawdust culture. *Mycoscience* 43(3):0267-0270.
47. Chu, K. K., Ho, S. S., Chow, A. H. (2002): *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *The Journal of Clinical Pharmacology* 42(9):976-984.
48. Claiborne, A. (1984): Catalase activity. In: Greenwald, R. A. (Ed.), *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 283–284.
49. Collins, R. A., Ng, T. B. (1997): Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences* 60(25):PL383-PL387.
50. Cowan, M. M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4):564-582.
51. Cui, J., Chisti, Y. (2003): Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology advances* 21(2):109-122.
52. Cummings, J. H., Stephen, A. M. (1980): The role of dietary fibre in the human colon. *Canadian Medical Association Journal* 123(11):1109.
53. da Silva, M. C., Naozuka, J., da Luz, J. M. R., de Assunção, L. S., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C., ... Kasuya, M. C. (2012): Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food chemistry* 131(2):558-563.
54. Das, N. P., Pereira, T. A. (1990): Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67(4):255-258.
55. Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., Almeida, L. M. (1994): Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315:161–169.
56. Dong, J. Z., Lei, C., Ai, X. R., Wang, Y. (2012): Selenium enrichment on *Cordyceps militaris* link and analysis on its main active components. *Applied biochemistry and biotechnology* 166(5):1215-1224.

57. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamitton, J. K., Reders, P. A., Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350–356.
58. Egressy-Molnár, O., Ouerdane, L., Gyórfi, J., Dernovics, M. (2016): Analogy in selenium enrichment and selenium speciation between selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Hericium erinaceus* (lion's mane mushroom). *LWT-Food Science and Technology* 68:306-312.
59. El-Demerdash, F. M. (2004): Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18(1):113-121.
60. El-Fakharany, E. M., Haroun, B. M., Ng, T., Redwan, E. R. M. (2010): Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein and peptide letters* 17(8):1031-1039.
61. El-Kamash, A. M. (2008): Evaluation of zeolite A for the sorptive removal of Cs⁺ and Sr²⁺ ions from aqueous solutions using batch and fixed bed column operations. *Journal of hazardous materials* 151(2):432-445.
62. Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I., Temur, N. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 20(3):337-345.
63. Falandysz, J. (2008): Selenium in edible mushrooms. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 26(3):256-299.
64. Farías, T., De Menorval, L. C., Zajac, J., Rivera, A. (2011): Benzalkonium chloride and sulfamethoxazole adsorption onto natural clinoptilolite: Effect of time, ionic strength, pH and temperature. *Journal of colloid and interface science* 363(2):465-475.
65. Farkaš, A., Rožić, M., Barbarić-Mikočević, Ž. (2005): Ammonium exchange in leakage waters of waste dumps using natural zeolite from the Krapina region, Croatia. *Journal of Hazardous Materials* 117(1):25-33.
66. Fernández, A., Sinanoğlu, O. (1985): Denaturation of proteins in methanol/water mixtures. *Biophysical chemistry* 21(3):163-166.
67. Flanigen, E. M. (1980): Molecular sieve zeolite technology-the first twenty-five years. *Pure and applied chemistry* 52(9):2191-2211.

68. Fordyce, F. M. (2013): Selenium deficiency and toxicity in the environment. In: Selinus, O. (Ed.), *Essentials of medical geology*. Springer, Netherlands, pp. 375-416.
69. French, G. L. (2006): Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections—the potential role of daptomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(6):1107-1117.
70. Fu, H. Y., Shieh, D. E., Ho, C. T. (2002): Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of food lipids* 9(1):35-43.
71. Ga, J., Kaviyarasana, V. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. *Journal of Pharmacy Research* 4:3939-3942.
72. Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P., Kozak, L. (2015): The effect of selenium on phenolics and flavonoids in selected edible white rot fungi. *LWT-Food Science and Technology* 63(1):726-731.
73. Gąsecka, M., Mleczek, M., Siwulski, M., Niedzielski, P. (2016): Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. *European Food Research and Technology* 242(5):723-732.
74. Georgescu, A. A., Danet, A. F., Radulescu, C., Stihi, C., Dulama, I. D., Elena, D. (2016): Determination of several elements in edible mushrooms using ICP-MS. *Romanian Journal of Physics* 61(5-6):1087-1097.
75. Gergely, V., Kubachka, K. M., Mounicou, S., Fodor, P., Caruso, J. A. (2006): Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1101(1):94-102.
76. Ghisalberti, E. L. (1993): Detection and isolation of bioactive natural products. In: Colegate, S. M., Molyneux, R. J. (Eds.), *Bioactive natural products – Detection, Isolation and Structural Determination*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 9-57
77. Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M., de Souza, J. R. R., Ricardo, N. M., Soares, S. D. A. (2013): Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2(2):152-156.

78. Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., Rostagno, M. A., Villares, A., Martínez, J. A. (2010): Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81(7):715-723.
79. Gunde-Cimerman, N., Cimerman, A. (1995): *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase—lovastatin. *Experimental mycology* 19(1):1-6.
80. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1990): Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology* 186:1-85.
81. Halliwell, B. (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2):312-322.
82. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015): *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed. Oxford University Press, USA.
83. Halušková, L. U., Valentovičová, K., Huttová, J., Mistrík, I., Tamás, L. (2009): Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(11):1069-1074.
84. Hamann, K. F. (1994): Therapy of isolated acute laryngitis with fusafungin. A phase IV study. *HNO* 42(2):113-118.
85. Hammel, K. E., Kapich, A. N., Jensen, K. A., Ryan, Z. C. (2002): Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and microbial technology* 30(4):445-453.
86. Han, M., Choi, H., Song, H. (2005): Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology-Seoul* 43(6):555-560.
87. Han, S. R., Noh, M. Y., Lee, J. H., Oh, T. J. (2015): Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Solvent Extracts from *Coriolus versicolor*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 44(12):1793-1798.
88. Hancock, R. E. (2007): The end of an era?. *Nature Reviews Drug Discovery* 6(1):28-28.
89. Harhaji, L. J., Mijatović, S., Maksimović-Ivanić, D., Stojanović, I., Momčilović, M., Maksimović, V., ... Stošić-Grujičić, S. (2008): Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *in vitro* and *in vivo* study. *Food and chemical toxicology* 46(5):1825-1833.

90. Harman, D. (1955). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontology* 11:298–300.
91. Harris, L. K., Theriot, J. A. (2016): Relative rates of surface and volume synthesis set bacterial cell size. *Cell* 165(6):1479-1492.
92. Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M. F., Gerthsen, D., Ulrich, A. S. (2010): Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 54(8):3132-3142.
93. Hearst, R., Nelson, D., McCollum, G., Millar, B. C., Maeda, Y., Goldsmith, C. E., ... Moore, J. E. (2009). An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 15(1):5-7.
94. Heck, D. E., Vetrano, A. M., Mariano, T. M., Laskin, J. D. (2003): UVB light stimulates production of reactive oxygen species unexpected role for catalase. *Journal of Biological Chemistry* 278(25):22432-22436.
95. Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... von Wright, A. (1998): Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(9):3590-3595.
96. Henderson, J., Eastwood, D., Bains, N., Burton, K. (2005): Superoxide dismutase – mushroom under stress. In: Tan, Q., Chen, Z. M., Cao, H., Buswell, J. A. (Eds.), *Proceedings of the 5th international conference on mushroom biology and mushroom products*. *Acta Edulis Fungi* 12sup, pp 61-65.
97. <http://bio1151.nicerweb.com/Locked/media/lab/diversity/fungi/key1151.html>
98. <http://easycalculation.com/statistics/regression.php>
99. http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor
100. <http://socscistatistics.com/tests/pearson/Default2.aspx>
101. <http://www.cram.com/flashcards/microbiology-antimicrobial-drugs-chapter-20>
102. http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_ostreatus.html
103. http://www.mykoweb.com/CAF/species/Pleurotus_ostreatus.html
104. <http://www.rogersmushrooms.com/gallery>
105. http://www.rysch.com/pilze/Pleurotus_ostreatus.htm

106. Huang, K. X., Xu, H. B. Z. (1994): Selenium: its chemistry, biochemistry and application in life science. Huazhong Science and Technology University Press, Wuhan
107. Inglezakis, V. J. (2005): The concept of “capacity” in zeolite ion-exchange systems. *Journal of Colloid and Interface Science* 281(1):68-79.
108. IOM, Institute of Medicine, Food, Nutrition Board. (2000): Dietary references intakes: Vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. National Academy Press, Washington.
109. Ismail, A., Marjan, Z. M., Foong, C. W. (2004): Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87:581–586.
110. Jayakumar, T., Thomas, P. A., Geraldine, P. (2007): Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology* 42(3):183-191.
111. Jevtić, S., Arčon, I., Rečnik, A., Babić, B., Mazaj, M., Pavlović, J., ... Rajić, N. (2014): The iron (III)-modified natural zeolitic tuff as an adsorbent and carrier for selenium oxyanions. *Microporous and Mesoporous Materials* 197:92-100.
112. Jevtić, S. (2015): Sinteza i karakterizacija materijala nastalih modifikacijom prirodnih zeolita (klinoptilolita) i mikroporoznih fosfata sa strukturom zeolita. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.
113. Jia, Z., Tang, M., Wu, J.(1999): The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64:555–559.
114. Johansson, M., Sterner, O., Labischinski, H., Anke, T. (2001): Coprinol, a new antibiotic cuparane from a *Coprinus* species. *Zeitschrift für Naturforschung C* 56(1-2):31-34.
115. Johnson, C. C., Ge, X., Green, K. A., Liu, X. (2000): Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People's Republic of China. *Applied Geochemistry* 15(3):385–401.
116. Jovanović, Z. (2011): Oksidativni stres u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja. *Medicinski časopis* 45(1):16-23.

117. Kalač, P., Svoboda, L. (2000): A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food chemistry* 69(3):273-281.
118. Kalač, P. (2009): Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry* 113(1):9-16.
119. Kalam, S., Gul, M. Z., Singh, R., Ankati, S. (2015): Free radicals: Implications in etiology of chronic diseases and their amelioration through nutraceuticals. *Pharmacologia* 6:11-20.
120. Kalló, D. (2001): Applications of natural zeolites in water and wastewater treatment. *Reviews in mineralogy and geochemistry* 45(1):519-550.
121. Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M., Popović, M. (2010): Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy research* 24(10):1473-1481.
122. Kavanagh, F., Hervey, A., Robbins, W. J. (1949): Antibiotic substances from Basidiomycetes IV. *Marasmius conigenus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 35(7):343-349.
123. Khalid, A. Q., AlJohny, B. O., Wainwright, M. (2014): Antibacterial effects of pure metals on clinically important bacteria growing in planktonic cultures and biofilms. *African Journal of Microbiology Research* 8(10):1080-1088.
124. Khokhar, S., Apenten, R. K. O. (2003): Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chemistry* 81(1):133-140.
125. Kim, J. H., Kim, S. J., Park, H. R., Choi, J. I., Ju, Y. C., Nam, K. C., Kim, S. J., Lee, S. C. (2009): The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(12):1016-1020.
126. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S. S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods* 81(2):121-126.
127. Klaus, A., Grubišić, M., Nikšić, M. (2005): Influence of some zeolites on the growth of mycelia of industrial fungi *Agaricus biosporus*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. 1st South East European Congress of Chemical Engineering, Belgrade, Serbia and Montenegro.

128. Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Zizak, Z., ... Van Griensven, L. J. (2015): Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. *Food Research International* 67:272-283.
129. Kojo, M. R., Lodenius, M. (1989): Cadmium and mercury in macrofungi—mechanisms of transport and accumulation. *Angew Botanik* 63:279-292.
130. Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L. J. (2012): Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of food composition and analysis* 26(1):144-153.
131. Kruidenier, L. A., Verspaget, H. W. (2002): Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease—radicals or ridiculous?. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16(12):1997-2015.
132. Kumar, B. S., Tiwari, S. K., Manoj, G., Kunwar, A., Amrita, N., Sivaram, G., ... Priyadarsini, K. I. (2010): Anti-ulcer and antimicrobial activities of sodium selenite against *Helicobacter pylori*: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Scandinavian journal of infectious diseases* 42(4):266-274.
133. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
134. Lee, H. Y., Eum, W. S., Kim, D. W., Lee, B. R., Yoon, C. S., Jang, S. H., ... Choi, S. Y. (2003): Isolation and identification of an antioxidant enzyme catalase stimulatory compound from *Ganoderma lucidum*. *Journal of biochemistry and molecular biology* 36(5):450-455.
135. Lee, Y. T., Kim, Y. S. (2005): Water solubility of β -glucans in various edible mushrooms. *Journal of Food Science and Nutrition* 10:294-297.
136. Lei, C., Ma, Q., Tang, Q. Y., Ai, X. R., Zhou, Z., Yao, L., Wang, Y., Wang, Q., Dong, J. Z. (2014). Sodium selenite regulates phenolics accumulation and tuber development of purple potatoes. *Scientia Horticulturae* 165:142-147.
137. Levander, O. A. (1986): Selenium. In: Mertz, W. (Ed.), *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, London, pp. 139–197.

138. Li, L., Ng, T. B., Song, M., Yuan, F., Liu, Z. K., Wang, C. L., Jiang, Y., Fu, M., Liu, F. (2007): A polysaccharide–peptide complex from abalone mushroom (*Pleurotus abalonus*) fruiting bodies increases activities and gene expression of antioxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice. *Applied microbiology and biotechnology* 75(4):863-869.
139. Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., You-Sheng, O. Y., Chen, Y. B. (2010): Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 85(4):1115-1122.
140. Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., Jülich, W. D. (2005): The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2(3):285-299.
141. Lingnert, H., Vallentin, K., Eriksson, C. E. (1979): Measurement of antioxidative effect in model system. *Journal of Food Processing and Preservation* 3:87–103.
142. Liu, K., Chen, F., Zhao, Y., Gu, Z., Yang, H. (2011): Selenium accumulation in protein fractions during germination of Se-enriched brown rice and molecular weights distribution of Se-containing proteins. *Food Chemistry* 127(4):1526-1531.
143. Lo, T. C. T., Chang, C. A., Chiu, K. H., Tsay, P. K., Jen, J. F. (2011): Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate polymers* 86(1):320-327.
144. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* 4(8):118.
145. Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., Chen, C. (2010): Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine* 14(4):840-860.
146. Ma, L., Chen, H., Zhang, Y., Zhang, N., Fu, L. (2012): Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus*. *Carbohydrate polymers* 89(2):371-378.
147. Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Łapienis, G., Ślusarczyk, J., Suchocki, P., ... Turło, J. (2009): Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme and Microbial Technology* 44(5):334-343.

148. Margeta, K., Farkas, A., Šiljeg, M., Logar, N. Z. (2013): Natural Zeolites in Water Treatment-How Effective is Their Use. INTECH Open Access Publisher.
149. Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M. (2008): Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *Febs Journal* 275(15):3959-3970.
150. 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.
151. Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2002): Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry* 50(21):6072-6077.
152. Mazzafera, P. (1998): Growth and biochemical alterations in coffee due to selenite toxicity. *Plant and Soil* 201(2):189-196.
153. Milovanović, I., Brčeski, I., Stajić, M., Korać, A., Vukojević, J., Knežević, A. (2014): Potential of *Pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. *The Scientific World Journal*, Article ID 681834, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/681834>
154. Mittal, C. K., Murad, F. (1977): Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3', 5'-monophosphate formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(10):4360-4364.
155. Mohaček-Grošev, V., Božac, R., Puppels, G. J. (2001): Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57(14):2815-2829.
156. Mondal, S. R., Rehana, J., Noman, M. S., Adhikary, S. K. (2010): Comparative study on growth and yield performance of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) on different substrates. *Journal of the Bangladesh Agricultural University* 8(2):213-220.
157. Moon, J. K., Shibamoto, T. (2009): Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(5):1655-1666.
158. Moore, K., Roberts, L. J., II (1998): Measurement of lipid peroxidation. *Free radical research* 28(6):659-671.

159. Mothana, R. A., Jansen, R., Jülich, W. D., Lindequist, U. (2000): Ganomycins A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. *Journal of natural products* 63(3):416-418.
160. Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... Kristensen, H. H. (2005): Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 437(7061):975-980.
161. Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tsugukuni, T., Tomiyama, D., Kurahachi, M., Nonaka, A., Miyamoto, T. (2013): A study of the antibacterial mechanism of catechins: Isolation and identification of *Escherichia coli* cell surface proteins that interact with epigallocatechin gallate. *Food control* 33(2):433-439.
162. Navarro-Alarcon, M., López-Martinez, M. C. (2000): Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Science of the Total Environment* 249(1):347-371.
163. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013): Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6(12):1451-1474.
164. Nohl, H., Kozlov, A. V., Gille, L., Staniek, K. (2003): Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochemical Society Transactions* 31(6):1308-1311.
165. Novak, R., Shlaes, D. M. (2010): The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000) 11(2):182-191.
166. Ogawa-Wong, A. N., Berry, M. J., Seale, L. A. (2016): Selenium and metabolic disorders: An emphasis on type 2 diabetes risk. *Nutrients* 8(2):80.
167. Ouzouni, P. K., Petridis, D., Koller, W. D., Riganakos, K. A. (2009): Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115(4):1575-1580.
168. Oyaizu, M. (1986): Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44:307-315.

169. Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 70(1):158–169.
170. Pal, J., Ganguly, S., Tahsin, K. S., Acharya, K. (2010): In vitro free radical scavenging activity of wild edible mushroom, *Pleurotus squarrosulus* (Mont.) Singer. *Indian Journal of Experimental Biology* 47:1210-1218.
171. Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'arrigo, M., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128(3):674-678.
172. Paśławski, P., Migaszewski, Z. M. (2006): The quality of element determinations in plant materials by instrumental methods. *Pol. J. Environ. Stud* 15(2a):154-164.
173. Patel, Y., Naraiian, R., Singh, V. K. (2012): Medicinal properties of *Pleurotus* species (oyster mushroom): a review. *World Journal of Fungal and Plant Biology* 3(1):1-12.
174. Pavelić, K., Hadžija, M., Bedrica, L., Pavelić, J., Đikić, I., Katić, M., ... Križanac, Š. (2001): Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Journal of Molecular Medicine* 78(12):708-720.
175. Perera, P. K., Li, Y. (2011): Mushrooms as a functional food mediator in preventing and ameliorating diabetes. *Functional Foods in Health and Disease* 1(4):161-171.
176. Perić, J., Trgo, M., Medvidović, N. V. (2004): Removal of zinc, copper and lead by natural zeolite—a comparison of adsorption isotherms. *Water research* 38(7):1893-1899.
177. Perron, N. R., Hodges, J. N., Jenkins, M., Brumaghim, J. L. (2008): Predicting how polyphenol antioxidants prevent DNA damage by binding to iron. *Inorganic Chemistry* 47(14):6153-6161.
178. Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D. S., Ćirić, A., Nikolić, M., Bukvički, D., Guerzoni, M. E., Soković, M. D. (2013): *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, in vitro antimicrobial activity and in situ control of *Aspergillus flavus* in tomato paste. *Food and chemical toxicology* 59:297-302.

179. Pietta, P. G. (2000): Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 63(7):1035-1042.
180. Polat, E., Karaca, M., Demir, H., Naci-Onus, A. (2004): Use of natural zeolite (clinoptilolite) in agriculture. *Journal of fruit and ornamental plant research* 12(1):183-189.
181. Radomski, M. W., Palmer, R. M. J., Moncada, S. (1987): The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British journal of pharmacology* 92(3):639-646.
182. Rayman, M. P. (2000): The importance of selenium to human health. *The lancet* 356(9225):233-241.
183. Rayman, M. P. (2008): Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British journal of nutrition* 100(02):254-268.
184. Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., Aranha, C. (2004): Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents* 24(6):536-547.
185. Reilly, C. (2006): *Selenium in Food and Health*, 2nd ed. Springer, New York.
186. Reis, F. S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I. C. (2012a): Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food and Chemical Toxicology* 50(5):1201-1207.
187. Reis, F. S., Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Barros, L., Ferreira, I. C. (2012b): Chemical characterization of *Agaricus bohusii*, antioxidant potential and antifungal preserving properties when incorporated in cream cheese. *Food Research International* 48(2):620-626.
188. Renaud, S. D., de Lorgeril, M. (1992): Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339(8808):1523-1526.
189. Richardson, J., Thomas, K. A., Rubin, B. H., Richardson, D. C. (1975): Crystal structure of bovine Cu, Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72(4):1349-1353.
190. Říha, M., Karlíčková, J., Filipický, T., Macáková, K., Hrdina, R., Mladěnka, P. (2013): Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 123:80-87.

191. Rimbach, G., Höhler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J., Packer, L. (1999): Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archives of Animal Nutrition* 52(3):203-222.
192. Romantsov, T., Guan, Z., Wood, J. M. (2009): Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1788(10):2092-2100.
193. Rop, O., Mlcek, J., Jurikova, T. (2009): Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition reviews* 67(11):624-631.
194. Rosa, L. H., Machado, K. M. G., Jacob, C. C., Capelari, M., Rosa, C. A., Zani, C. L. (2003): Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98(7):967-974.
195. Roth, S., Dröge, W. (1987): Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide. *Cellular immunology* 108(2):417-424.
196. Rovira, M., Giménez, J., Martínez, M., Martínez-Lladó, X., de Pablo, J., Martí, V., Duro, L. (2008): Sorption of selenium (IV) and selenium (VI) onto natural iron oxides: goethite and hematite. *Journal of hazardous materials* 150(2):279-284.
197. Sakagami, H., Takeda, M. (1993): Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quel.. In: Chang, S.T., Buswell, J.A., Chiu, S.W. (Eds.), *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Chinese University Press, Hong Kong, pp. 237-245.
198. Sano, M., Yoshino, K., Matsuzawa, T., Ikekawa, T. (2002): Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4(1).
199. Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S. K., Mallick, S. K., Maiti, T. K. (2006): Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. *International immunopharmacology* 6(8):1287-1297.
200. Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42:321–324.
201. Savić, M. (2014): Akumulacija i transformacija selena u industrijskim gljivama. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Srbija.

202. Savoie, J. M., Minvielle, N., Largeteau, M. L. (2008): Radical-scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(6):970-975.
203. Scandalios, J. G. (2005): Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38(7):995-1014.
204. Shearer, J. (2014): Insight into the Structure and Mechanism of Nickel-Containing Superoxide Dismutase Derived from Peptide-Based Mimics. *Accounts of chemical research* 47(8):2332-2341.
205. Shin, K. S., Youn, H. D., Han, Y. H., Kang, S. O., Hah, Y. C. (1993): Purification and characterisation of d-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *European journal of biochemistry* 215(3):747-752.
206. Soares, A. A., de Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, A., da Costa, S. M. G., Koehnlein, E. A., de Souza, C. G. M., Peralta, R. M. (2013): Hepatoprotective effects of mushrooms. *Molecules* 18(7):7609-7630.
207. Sprynskyy, M., Lebedynets, M., Terzyk, A. P., Kowalczyk, P., Namieśnik, J., Buszewski, B. (2005): Ammonium sorption from aqueous solutions by the natural zeolite Transcarpathian clinoptilolite studied under dynamic conditions. *Journal of Colloid and Interface Science* 284(2):408-415.
208. Stamets, P. (2000): *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3th ed. Ten Speed Press, Berkeley, CA.
209. Stefanović, Š. C., Logar, N. Z., Margeta, K., Tušar, N. N., Arčon, I., Maver, K., ... Kaučič, V. (2007): Structural investigation of Zn²⁺ sorption on clinoptilolite tuff from the Vranjska Banja deposit in Serbia. *Microporous and Mesoporous Materials* 105(3):251-259.
210. Stijve, T., Besson, R. (1976): Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere* 5(2):151-158.
211. Stojanović, M., Nikšić, M. (2003): *Laboratorijska uputstva za vežbe iz tehnološke mikrobiologije*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.

212. Stojković, D., Reis, F. S., Ferreira, I. C., Barros, L., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Stević, T., Giveli, A., Soković, M. (2013): *Tirmania pinoyi*: Chemical composition, in vitro antioxidant and antibacterial activities and in situ control of *Staphylococcus aureus* in chicken soup. *Food research international* 53(1):56-62.
213. Stojković, D., Reis, F. S., Glamočlija, J., Ćirić, A., Barros, L., Van Griensven, L. J., Ferreira, I.C., Soković, M. (2014): Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product–natural preservatives in yoghurt. *Food & function* 5(7):1602-1612.
214. Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Angeles Cabello, M., Teresa Díez, M., García, J. B., González del Val, A., Gorrochategui, J., Hernández, P., Peláez, F., Vincente, F. (2000): Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek* 78(2):129-140.
215. Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate polymers* 76(4):548-556.
216. Synytsya, A., Novak, M. (2014): Structural analysis of glucans. *Annals of translational medicine* 2(2):17-17.
217. Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999): Microbial (1→3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers* 38(3):247-253.
218. Šiljeg, M., Stefanović, Š. C., Mazaj, M., Tušar, N. N., Arčon, I., Kovač, J., ... Logar, N. Z. (2009). Structure investigation of As (III)-and As (V)-species bound to Fe-modified clinoptilolite tuffs. *Microporous and Mesoporous Materials* 118(1):408-415.
219. Štajn, A. Š., Žikić, R. V., Saičić, Z. S. (2007): *Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja*. Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac.
220. Tandogan, B., Ulusu, N. N. (2006): Kinetic mechanism and molecular properties of glutathione reductase. *FABAD J pharm sci* 31:230-237.
221. Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2003). The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & pharmacotherapy* 57(3):134-144.

222. Tham, L.X., Matsushashi, S., Kume, T. (1999): Growth and fruitbody formation of *Ganoderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. *Mycoscience* 40:87–92.
223. Tran, P. L., Hammond, A. A., Mosley, T., Cortez, J., Gray, T., Colmer-Hamood, J. A., Shashtri, M., Spallholz, J. E., Hamood, A. N., Reid, T. W. (2009): Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* 75(11):3586-3592.
224. Tsai, S. Y., Tsai, H. L., Mau, J. L. (2007): Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT-Food Science and Technology* 40(8):1392-1402.
225. Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., Browder, I. W., Williams, D. L. (2001): Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology and Medicine* 30(4):393-402.
226. Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M. (1996): Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology* 50(1):27-34.
227. Turakainen, M., Hartikainen, H., Seppänen, M. M. (2004): Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(17):5378-5382.
228. Turło, J., Gutkowska, B., Herold, F. (2010): Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food and Chemical Toxicology* 48:1085–1091.
229. Tyagi, K. A., Bukvicki, D., Gottardi, D., Veljic, M., Guerzoni, M. E., Malik, A., Marin, P. D. (2013): Antimicrobial potential and chemical characterization of serbian liverwort (*Porella arboris-vitae*): SEM and TEM observations. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Article ID 382927, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/382927>.
230. Ulmanu, M. (2012): Mineralogy of Natural Zeolites. In: Inglezakis, V. J., Zorpas, A. A. (Eds.), *Handbook of Natural Zeolites*. Bentham Science Publishers, pp. 52-69.

231. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(1):44-84.
232. Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13(2):57-149.
233. Van Elteren, J. T., Woroniecka, U. D., Kroon, K. J. (1998): Accumulation and distribution of selenium and cesium in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*—A radiotracer-aided study. *Chemosphere* 36(8):1787-1798.
234. Vasić, S., Radojević, I., Pešić, N., Čomić, L. (2011). Influence of sodium selenite on the growth of selected bacteria species and their sensitivity to antibiotics. *Kragujevac Journal of Science* 33:55-61.
235. Vaskovsky, V. E., Khotimchenko, S. V., Boolugh, E. M. (1998): Distribution of diacylglycerotrimethylhomoserine and phosphatidylcholine in mushrooms. *Phytochemistry* 47(5):755-760.
236. Venturini, M. E., Rivera, C. S., Gonzalez, C., Blanco, D. (2008): Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection*® 71(8):1701-1706.
237. Vetchinkina, E., Loshchinina, E., Kursky, V., Nikitina, V. (2013): Reduction of organic and inorganic selenium compounds by the edible medicinal basidiomycete *Lentinula edodes* and the accumulation of elemental selenium nanoparticles in its mycelium. *Journal of Microbiology* 51(6):829-835.
238. Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Đorđević, R., Jovanović, L., & Nikšić, M. (2014): Zeolites as possible biofortifiers in Maitake cultivation. *Archives of Biological Sciences* 66(1):123-129.
239. Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Dordevic, R., Miladinovic, Z., Jovanovic, L., Niksic, M., Van Griensven, L. J. L. D. (2016): Addition of Zeolites to Improve the Functional Characteristics of the Hen of the Wood or Maitake Medicinal Mushroom, *Grifola frondosa* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 18(9):781-792.
240. Waksman, S. A. (1950): Streptomycin and Neomycin, an antibiotic approach to tuberculosis. *British medical journal* 2(4679):595.

241. Wang, C., Wang, J., Huang, Y., Chen, H., Li, Y., Zhong, L., Chen, Y., Chen, S., Wang, J., Kang, J., Peng, Y., Yang, B., Lin, Y., She, Z., Lai, X. (2013): Anti-mycobacterial activity of marine fungus-derived 4-deoxybostrycin and nigrosporin. *Molecules* 18(2):1728-1740.
242. Wang, H., Gao, J., Ng, T. B. (2000): A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical and biophysical research communications* 275(3):810-816.
243. Wang, L. F., Zhang, H. Y. (2003): A theoretical investigation on DPPH radical-scavenging mechanism of edaravone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13(21):3789-3792.
244. Wang, Z. S., Gu, Y. X., Yuan, Q. S. (2006): Effect of nutrition factors on the synthesis of superoxide dismutase, catalase, and membrane lipid peroxide levels in *Cordyceps militaris* mycelium. *Current microbiology* 52(1):74.
245. Wasser, S. P., Weis, A. L. (1999): Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of medicinal mushrooms* 1(1).
246. Wasser, S. P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology* 60(3):258-274.
247. Wasser, S. P. (2010): Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12(1).
248. Weihua, Z., Lei, Z., Runping, H. (2009): Removal of uranium (VI) by fixed bed ion-exchange column using natural zeolite coated with manganese oxide. *Chinese Journal of Chemical Engineering* 17(4):585-593.
249. Whanger, P., Vendeland, S., Park, Y. C., Xia, Y. (1996): Metabolism of subtoxic levels of selenium in animals and humans. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 26(2):99-113.
250. White, J. C., Dutta, P. K., Shqau, K., Verweij, H. (2010): Synthesis of ultrathin zeolite Y membranes and their application for separation of carbon dioxide and nitrogen gases. *Langmuir* 26(12):10287-10293.

251. Wong, J. Y., Chye, F. Y. (2009): Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 22(4):269-277.
252. World Health Organization. (2014): Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance. World Health Organization.
253. World Health Organization (2015): WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost third of deaths. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>
254. Wright, G. D. (2000): Resisting resistance: new chemical strategies for battling superbugs. *Chemistry & biology* 7(6):R127-R132.
255. Xiong, C., Xia, Y., Zheng, P., Wang, C. (2013): Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene. *Applied microbiology and biotechnology* 97(5):2009-2015.
256. Xu, L.Z. (1999): The antitumor and anti-virus activity of polysaccharopeptide (PSP). In: Yang, Q.Y. (Ed.), *Advanced Research in PSP*. Hong Kong Association for Health Care, Hong Kong, pp. 62-67.
257. Yamaç, M., Bilgili, F. (2006): Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical biology* 44(9):660-667.
258. Yan, H., Chang, H. (2012): Antioxidant and antitumor activities of selenium-and zinc-enriched oyster mushroom in mice. *Biological trace element research* 150(1-3):236-241.
259. Yang, M. M. P., Chen, Z., Kwok, J. S. L. (1992): The anti-tumor effect of a small polypeptide from *Coriolus versicolor* (SPCV). *The American journal of Chinese medicine* 20:221-232.
260. Yang, J. H., Lin, H. C., Mau, J. L. (2002): Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food chemistry* 77(2):229-235.
261. Yi, S. M., Zhu, J. L., Fu, L. L., Li, J. R. (2010): Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. *International journal of food microbiology* 144(1):111-117.

262. Yilmaz, B., Müller, U. (2009). Catalytic applications of zeolites in chemical industry. *Topics in Catalysis* 52(6-7):888-895.
263. Zeng, H., Combs, G. F. (2008): Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *The Journal of nutritional biochemistry* 19(1):1-7.
264. Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., Metz, T. O. (2008): A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Journal of proteome research* 8(2):754-769.
265. Zhao, L., Zhao, G., Hui, B., Zhao, Z., Tong, J., Hu, X. (2004a): Effect of Selenium on Increasing the Antioxidant Activity of Protein Extracts from a Selenium-enriched Mushroom Species of the *Ganoderma* Genus. *Journal of food science* 69(3):184-188.
266. Zhao, L., Zhao, G., Zhao, Z., Chen, P., Tong, J., Hu, X. (2004b): Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *Journal of agricultural and food chemistry* 52(12):3954-3959.
267. Zhao, L., Zhao, G., Du, M., Zhao, Z., Xiao, L., Hu, X. (2008): Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *European Food Research and Technology* 226(3):499-505.
268. Zheng, Z., Huang, C., Cao, L., Xie, C., Han, R. (2011): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Fungal biology* 115(3):265-274.
269. Zonaro, E., Lampis, S., Turner, R. J., Qazi, S. J. S., Vallini, G. (2015): Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. *Frontiers in microbiology* 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00584

BIOGRAFIJA AUTORA

Danka M. Matijašević je rođena 14.12.1984. godine u Beogradu, Republika Srbija. Zemunsku gimnaziju, u Beogradu, završila je 2003. godine, i iste godine je upisala Poljoprivredni fakultet – Univerzitet u Beogradu, smer prehrambena tehnologija biljnih proizvoda. Diplomirala je 13. novembra 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,72 (osam sedamdeset dva), u toku studija i ocenom 10 (deset), na diplomskom ispitu. Diplomski rad „Antimikrobna svojstva piva sa dodatkom ekstrakta timijana na odabrane Gram negativne bakterije“, odbranila je na Katedri za Tehnologiju konzervisanja i vrenja, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije, na istom fakultetu, je upisala 2010. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. Zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na kome je 2013. godine izabrana u zvanje istraživač saradnik. Učesnik je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja republike Srbije: „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“.

Autor je i koautor pet naučnih radova sa ISI liste objavljenih u vrhunskim međunarodnim i međunarodnim časopisima i preko 15 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Član je udruženja mikrobiologa Srbije i Američkog udruženja mikrobiologa.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Данка Матијашевић

Број индекса 10/6

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и
антимикробно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Данка Матијашевић

Број индекса 10/6

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада „Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикубно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*“

Ментор Проф. др Миомир Никшић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај Se(IV)- и Se(VI)-модификованог зеолита на антиоксидативно и антимикубно дејство гљива *Pleurotus ostreatus* и *Coriolus versicolor*“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.