

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Predrag M. Petrović

**KARAKTERIZACIJA I INKAPSULACIJA BIOLOŠKI
AKTIVNIH KOMPONENTI IZ GLJIVA *Handkea
utriformis* (BULL.) KREISEL, *Handkea
excipuliformis* (BULL.) KREISEL i *Vascellum
pratense* (PERS.) KREISEL**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Predrag M. Petrović

**CHARACTERISATION AND INCAPSULATION OF
BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM
FUNGI *Handkea utriiformis* (BULL.) KREISEL,
Handkea excipuliformis (BULL.) KREISEL AND
Vascellum pratense (PERS.) KREISEL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

Članovi komisije:

Mentor 1: dr Branko Bugarski, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Mentor 2: dr Anita Klaus, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

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

dr Željko Žižak, naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u okviru projekta integralnih i interdisciplinarnih istraživanja (III 46010): „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Eksperimentalni deo rada ove doktorske disertacije je izveden na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije, Univerziteta u Beogradu, Institutu za primenu nuklearne energije, Univerziteta u Beogradu, Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, Međunarodnom institutu za istraživanje biljaka, Univerzitet u Wageningenu (PRI, Wageningen) i Gradskom zavodu za javno zdravlje Beograd.

Zahvalnica

Veliko hvala dr Aniti Klaus na velikoj pomoći i prijateljstvu tokom svih ovih godina.

Hvala dr Branku Bugarskom na ukazanoj prilici i poverenju.

Zahvaljujem dr Milošu Petkoviću, docentu na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na svesrdnoj pomoći u realizaciji NMR analize.

Zahvaljujem dr Sergeju Tomiću, naučnom saradniku na Institutu za primenu nuklearne energije, Univerziteta u Beogradu na omogućavanju izvođenja in vitro imunomodulatorne analize i velikoj pomoći u tumačenju rezultata

Zahvaljujem dr Željku Žišku, naučnom saradniku, Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, na omogućavanju izvođenja in vitro citotoksične analize

Zahvaljujem dr Milici Carević, naučnom saradniku na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerzitet u beogradu, na pomoći u izvođenju tečno-hromatografskih analiza.

Zahvaljujem Nebojši Vukoviću, Gradski zavod za javno zdravlje Beograd, na pomoći u izvođenju gasno-hromatografskih analiza.

Zahvaljujem Jovani Vunduk, istraživaču saradniku na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitet u beogradu i Violeti Milutinović, istraživaču saradniku na Farmaceutskom fakultetu, Univerzitet u beogradu, na velikoj podršci i pomoći tokom izrade teze.

Zahvaljujem prof. dr Leo van Grinsvenu, Međunarodni institut za istraživanje biljaka Univerzitet u Wageningenu, na pomoći u realizaciji gel-eksluzione hromatografije

Veliko hvala svim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene.

Zahvaljujem porodici, a posebno majci Svetlani na ogromnoj podršci koju mi je pružala tokom svih ovih godina.

KARAKTERIZACIJA I INKAPSULACIJA BIOLOŠKI AKTIVNIH KOMPONENTI IZ GLJIVA *Handkea utriformis* (BULL.) KREISEL, *Handkea excipuliformis* (BULL.) KREISEL i *Vascellum pratense* (PERS.) KREISEL

Rezime

Gljive su izvor raznih farmakološki aktivnih komponenti zahvaljujući čemu su postale predmet ospežnih istraživanja u poslednjih nekoliko decenija. Lekovite gljive korsitili su mnogi narodi širom sveta, a naročito dalekog istoka, hiljadama godina, ali je tek s razvojem analitike bilo moguće okarakterisati njihovo dejstvo. Ipak, mnoge gljive i dalje su ostale relativno nepoznate u pogledu svog farmakološkog potencijala.

Takva grupa gljiva su puhare, koje prolaze kroz jedinstveni ciklus sazrevanja plodonosnih tela. Puhare predstavljaju grupu gljiva u okviru reda Agaricales koje proizvode zatvorena, loptasta plodonosna tela koja, dok su mlada imaju čvrstu belu unutrašnjost – glebu – koja se tokom sazrevanja pretvara u praškastu, smeđu sporonosnu masu. Ova sporonosna masa koristila se u narodnoj medicini širom sveta, pre svega za zaustavljanje krvarenja ali i tretman nekih drugih poremećaja.

Istraživanja u okviru ove disertaciji bila su usmerena na hemijsku karakterizaciju i skrining bioloških aktivnosti 3 vrste puhara – *Handkea utriformis*, *H. excipuliformis* i *Vascellum pratense*. Poređen je hemijski sastav i aktivnost mladih i zrelih plodonosnih tela navedenih vrsta, kao i micelijuma, na primeru vrste *Handkea utriformis*. U tu svrhu korišćeni su metanolni ekstrakti sve tri vrste i polisaharidni ekstrakti vrste *Handkea utriformis*.

Utvrđeno je da su metanolni ekstrakti zrelih plodonosnih tela aktivniji od mladih u pogledu antioksidativne aktivnosti, kao i inhibitorne aktivnosti na većinu ispitivanih enzima (tirozinazu, acetilholinesterazu, butirilhoinesterazu, α -glukozidazu, α -amilazu) i da su bogatiji nekim farmakološki aktivnim jedinjenjima, kao što su ergosterol, α -tokoferol, *N*-acetilglukozamin, kao i ukupnim fenolnim jedinjenjima. Ekstrakti mladih plodonosnih tela bili su aktivniji u inhibiciji HMG-CoA reduktaze, pokazali su bolju antimikrobnu aktivnost, dok je citotoksična/antitumorska aktivnost uzoraka bila slična, ali je u slučaju ekstrakata *H.*

utriformis, i naročito *H. excipuliformis* bila selektivnija prema tumorskim ćelijskim linijama. Ekstrakt micelijuma je pokazao slabiju aktivnost u biološkim odgovorima, osim u antimikrobnoj analizi, pa nije adekvatna zamena za plodonosna tela, iako može relativno lako da se uzgaja u laboratorijskim uslovima. Hemijski sastav i biološka aktivnost ekstrakata zrelih plodonosnih tela puhara ukazuju da puhare mogu da nađu primenu i nakon sazrevanja, kao aktivni sastojci farmaceutskih proizvoda, naročito onih namenjenih nezi ili tretmanu kože, ali i da su puhare uopšte izvor potencijalnih aktivnih metabolita koji mogu da nađu medicinsku primenu.

Polisahardini ekstrakti micelijuma i plodonosnih tela *H. utriformis* hemijski su se razlikovali, uz drugačiji šećerni sastav. Micelijum je sadržao uglavnom α -glukane, koji su okarakterisani kao glikogenu-slični (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -D-glukani, dok su plodonosna tela sadržala isključivo β -glukane, okarakterisane kao razgranate (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- β -D-glukane kao i parcijalno metilovani (1 \rightarrow 6)- α -D-galaktan, za koji je utvrđeno da pored jedinica galaktoze sadrži i, u prirodi retku 3-O-metilgalaktozu. Od zrelih plodonosnih tela dobijen je manji prinos, a ekstrakt je sadržao i manje ukupnih šećera, a više β (1 \rightarrow 3) veza u glukanskoj frakciji; takođe, bio je bogatiji proteinsko-melaninskim strukturama. Polisaharidne komponente nije bilo moguće razdvojiti od proteinsko-melaninske, što ukazuje na prisustvo polisaharidno-proteinskih kompleksa u mladim i zrelim plodonosnim telima. Polisaharidni ekstrakti plodonosnih tela su pokazali značajno bolju imunomodulatornu aktivnost od ekstrakta micelijuma, što se koreliše sa sadržajem β -glukana. Ekstrakti su uspešno inkapsulirani u liposome, uz zadovoljavajući stepen inkapsulacije od 40-60%, uz omogućavanje produženog oslobađanje što otvara potencijalnu upotrebu proizvoda na bazi ovih gljiva u farmaceutskim proizvodima, dijetetskim suplementima i kozmetičkim preparatima.

Ključne reči: *gljive, puhare, biološka aktivnost, polisaharidi, lipozomi*

Naučna oblast: *Tehnološko inženjerstvo*

Uža naučna oblast: *Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija*

UDK broj:

CHARACTERISATION AND INCAPSULATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPONENTS FROM FUNGI *Handkea utriformis* (BULL.) KREISEL, *Handkea excipuliformis* (BULL.) KREISEL AND *Vascellum pratense* (PERS.) KREISEL

Summary

Fungi are source of various pharmacologically active compounds and they have been a subject of extensive study in a past few decades. Medicinal mushrooms were used in traditional medicine in many parts of the world, especially in the far east, and such use goes back to few thousand years. Modern analytical technologies allowed the characterisation of the medicinal properties of mushrooms. Still, many fungi species remain insufficiently studied.

Such a group of mushrooms are puffballs, which go through a unique cycle of maturation of the fruiting bodies. Puffballs represent a group of fungi within the order of Agaricales which produce enclosed, globose fruit bodies which, while young, have a solid white interior - gleba - which turns into a powdery, brown spore bearing mass upon maturation. This spore mass has been used in folk medicine around the world, primarily for stopping bleeding but also for treating other disorders.

The research in this dissertation focused on the chemical characterization and screening of biological activities of 3 species of puffballs - *Handkea utriformis*, *H. excipuliformis* and *Vascellum pratense*. The chemical composition and biological activity of young and mature fruiting bodies, as well as the mycelium of *Handkea utriformis*, had been compared. Methanol extracts of all three species were used, as well as polysaccharide extracts of *Handkea utriformis*.

It was found that methanol extracts of mature fruiting bodies were more active than young ones in terms of antioxidant activity and inhibitory activity against most of the enzymes tested (tyrosinase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, α -glucosidase, α -amylase) and that they are richer in some pharmacologically active compounds, which are ergosterol, α -tocopherol, N-acetylglucosamine, and total phenolic compounds. The extracts of young

fruiting bodies were more active in inhibiting HMG-CoA reductase, showed better antimicrobial activity, while cytotoxic activity was similar for all the samples, although *H. utriformis*, and particularly *H. escipuliformis* extracts showed selectivity towards cancer cell lines. Mycelium showed the weakest activity in all methods, except for relatively good antimicrobial activity, and, although it can be easily grown in the laboratory conditions, it cannot be considered as adequate replacement for the fruiting bodies. Chemical and biological properties of the mature fruiting bodies extracts indicate that puffballs are a great source of the active ingredients even though they go through the autolysis and that they may find use in the pharmaceutical products, especially those that are skin-care related.

Polysaccharide extracts of mycelium and fruiting bodies differed chemically, with a different sugar composition. The mycelium consisted mainly of α -glucans, which were characterized as glycogen-like (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -D-glucans, while the fruiting bodies contained exclusively β -glucans, which were characterized as branched (1 \rightarrow 6)(1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, as well as partially methylated (1 \rightarrow 6)- α -D-galactans, for which it was determined to contain a rare sugar 3-*O*-methylgalactose. The extraction yield was lower in the case of the mature fruiting bodies and the extract contained less total sugars, with more β (1 \rightarrow 3) linkages, and more protein-melanin structures. Separation of proteins/melanins and polysaccharides could not be achieved which suggests presence of polysaccharide-protein complexes in the fruiting bodies. Polysaccharide extracts of the fruiting bodies have shown far more significant immunomodulatory activity than those obtained from mycelium, which was in correlation with total β -glucan content. The extracts were successfully encapsulated in liposomes with a satisfactory degree of encapsulation of 40-60 %, with prolonged release achieved, which opens the potential use of preparations based on these mushrooms in pharmaceutical products, dietary supplements and cosmetic preparations.

Key words: *fungi, puffballs, biological activity, polysaccharides, liposomes*

Scientific field: *Technological engineering*

Scientific subfield: *Biochemical engineering and biotechnology*

UDC number:

Sadržaj

Uvod.....	1
1. Pregled literaturnih podataka.....	4
1.1. Značaj gljiva za čoveka.....	4
1.2. Značaj gljiva u medicini	5
1.3. Lekovita svojstva gljiva	7
1.4. Puhare	16
1.4.1. <i>Handkea utriformis</i>	21
1.4.2. <i>Handkea excipuliformis</i>	23
1.4.3. <i>Vascellum pratense</i>	25
1.5. Puhare u folkloru i narodnoj medicini	26
1.6. Moderna nutritivna, medicinska i biotehnoška istraživanja na puharama.....	28
2. Ciljevi rada.....	43
3. Eksperimentalna ispitivanja.....	44
3.1. Materijali.....	44
3.2. Gljivlji materijal – poreklo	45
3.3. Proizvodnja micelijuma <i>H. utriformis</i>	46
3.4. Priprema ekstrakata.....	47
3.4.1. Priprema droge za ekstrakciju i metanolna ekstrakcija	47
3.4.2. Priprema polisaharidnih ekstrakata	47
3.5. Fizička i hemijska karakterizacija ekstrakata	50
3.5.1. Ukupni proteini.....	50
3.5.1.1. Određivanje ukupnih proteina po Bradford-u	50
3.5.1.2. Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju.....	50
3.5.2. Analiza šećera.....	50
3.5.2.1. Ukupni šećeri.....	50
3.5.2.2. GC-FID-MS analiza alditol acetata i parcijalno metilovanih alditol acetata (PMAA).....	51
3.5.2.3. Analiza mono- i disaharida tečnom hromatografijom.....	52
3.5.2.4. Određivanje ukupnih, α - i β -glukani	53

3.5.3.	Ukupni fenoli.....	53
3.5.4.	HPLC-MS analiza fenolnih kiselina.....	53
3.5.5.	Određivanje α -tokoferola.....	54
3.5.6.	Određivanje ergosterola i slobodnih masnih kiselina.....	54
3.5.7.	Određivanje lovastatina	55
3.5.8.	Određivanje kojične kiseline	56
3.5.9.	UV-VIS spektroskopija	56
3.5.10.	ATR - FTIR spektroskopija.....	56
3.5.11.	NMR spektroskopija.....	56
3.5.12.	Gel-ekskluziona hromatografija	57
3.5.13.	Elementalna analiza.....	57
3.6.	Biološka karakterizacija ekstrakata.....	57
3.6.1.	Antioksidativna aktivnost.....	57
3.6.1.1.	ABTS antiradikalna aktivnost	57
3.6.1.2.	CUPRAC redukciona moć	58
3.6.1.3.	Test inhibicijeoksidativne degradacije β -karotena.....	58
3.6.2.	Inhibicija tirozinaze	59
3.6.3.	Inhibicija acetilholinesteraze i butirilholinesteraze	60
3.6.4.	Inhibicija HMG-CoA reduktaze	60
3.6.5.	Inhibicija α -glukozidaze	61
3.6.6.	Inhibicija α -amilaze	62
3.6.7.	Antimikrobna aktivnost	62
3.6.8.	Citotoksična/antitumorska aktivnost	63
3.6.8.1.	Priprema uzoraka.....	63
3.6.8.2.	Priprema tumorskih ćelijskih linija	64
3.6.8.3.	Priprema mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC).....	64
3.6.8.4.	Tretman tumorskih ćelijskih linija	64
3.6.8.5.	Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC).....	64
3.6.9.	Imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata.....	64
3.7.	Inkapsulacija polisaharidnih ekstrakata u liposome	65

3.7.1.	Priprema lipozoma.....	65
3.7.2.	Karakterizacija lipozoma.....	65
3.7.2.1.	Merenje veličine i Zeta-potencijala lipozoma.....	65
3.7.2.2.	Određivanje stepena inkapsulacije.....	66
3.7.3.	Studija otpuštanja aktivnih komponenti iz lipozoma.....	66
3.8.	Statistička analiza.....	67
4.	Rezultati i diskusija.....	68
4.1.	Analiza metanolnih ekstrakata.....	68
4.1.1.	Prinos ekstrakcije.....	68
4.1.2.	Hemijska karakterizacija ekstrakata.....	69
4.1.3.	Biološka aktivnost ekstrakata.....	79
4.1.3.1.	Antioksidativna aktivnost.....	79
4.1.3.2.	Inhibicija enzimske aktivnosti.....	84
4.1.3.3.	In vitro antimikrobna aktivnost.....	94
4.1.3.4.	In vitro citotoksična/antitumorska aktivnost.....	97
4.2.	Analiza polisaharidnih ekstrakata.....	102
4.2.1.	Prinosi ekstrakcije.....	102
4.2.2.	Fizičko - hemijska analiza polisaharidnih ekstrakata.....	104
4.2.2.1.	Veličina makromolekulske frakcije.....	104
4.2.2.2.	Ugljeni hidrati.....	107
4.2.2.3.	Nešećerne komponente.....	132
4.2.3.	Biološka karakterizacija polisaharidnih ekstrakata.....	142
4.2.3.1.	Antioksidativna analiza.....	142
4.2.3.2.	Antimikrobna aktivnost.....	144
4.2.3.3.	Imunomodulatorna aktivnost.....	146
4.2.4.	Inkapsulacija i karakterizacija lipozoma.....	155
4.2.4.1.	Karakterizacija lipozoma.....	155
4.2.4.2.	Studija stabilnosti lipozoma.....	159
4.2.4.3.	Kinetika otpuštanja aktivnih komponenata.....	162
5.	Zaključci.....	166

Literatura	169
Sadržaj slika	203
Sadržaj tabela	208
Spisak skraćenica	210

Uvod

Hronične bolesti, tj. kardiovaskularne bolesti, dijabetes, hronične bolesti disajnih puteva i rak su vodeći uzrok smrti u svetu (Grover & Joshi, 2014). Nutraceutici, odnosno funkcionalna hrana i biološki aktivne komponente iz hrane, kao što su vitamini, ω -3 masne kiseline, antioksidanti, steroli, dijetetska vlakna itd. označeni su kao važni faktori u prevenciji, ali i tretmanu hroničnih bolesti (Padmavathi, 2013). Rezistencija patogenih mikroorganizama na antibiotike je u porastu, a sa njom i životno ugrožavajućih infekcija (Zaman i saradnici, 2017). Zbog toga postoji konstantna potreba za traganjem za novim antibioticima. Prirodni proizvodi označeni su kao fundamentalni izvor novih aktivnih principa sa antimikrobnim delovanjem (Saleem i saradnici, 2010). Prirodni proizvodi su i dalje među najvažnijim izvorima terapijskih agenasa u medicini i naročito su važni u razvoju efikasne terapije raka, bakterijskih i gljivičnih infekcija, neuroloških, kardiovaskularnih i autoimunih oboljenja (Bills & Gloer, 2016).

Gljive su izvor različitih primarnih i sekundarnih metabolita sa bioaktivnim delovanjem ali je i dalje relativno malo aktivnih supstanci poreklom iz gljiva koje su našle upotrebu u zvaničnoj medicini. Bills & Gloer (2016) dali su prikaz sekundarnih metabolita gljiva od kojih su razvijeni farmaceutici, agrohemikalije i kozmetički proizvodi a među njima su uglavnom jedinjenja poreklom iz askomiceta, odnosno gljivica iz rodova *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monascus* i drugih. Ipak, brojna istraživanja koja su poslednjih godina intenzivirana na bazidiomicetama pokazala su da i one imaju izrazit potencijal kao nosioci farmakološki aktivnih jedinjenja (Schüffler & Anke, 2008; Schüffler, 2018). I same gljive, a ne samo izolovana jedinjenja mogu da dovedu do željenih efekata i kao funkcionalna hrana odnosno dijetetski suplementi, ako se redovno unose. Ove gljive se nazivaju “medicinske gljive”, predstavljaju mahom bazidiomicete sa tradicionalnom upotrebom i mogu da se definišu kao makroskopske gljive, koje se koriste u formi ekstrakata ili kao sprašene, u prevenciji, otklanjanju simptoma ili lečenja bolesti. Osušeni micelijum, plodonosna tela gljiva i spore iz kojih se dobijaju lekoviti proizvodi mogu se

tako smatrati “gljivljom drogom”. Oko 80% medicinskih gljivljih proizvoda dobija se iz plodonosnih tela, bilo sakupljenih u prirodi, ili dobijenih gajenjem. Ovakvi proizvodi su obično nedovoljno standardizovani zbog čega se prednost često daje submerznom gajenju i dobijanju proizvoda iz odgovarajućeg micelijuma. Skrining ekstrakata gljiva na biološke aktivnosti je od presudnog značaja za njihovu dalju karakterizaciju (Wasser, 2017). Za mnoge makromicete utvrđeno je da poseduju antimikrobnu, antivirusnu, citotoksičnu/antitumorsku, imunomodulatornu, anti-inflamatornu, antiaterogenu, antioksidativnu, antihiperholesterolemijsku, antihiperглиkemijsku kao i aktivnost na centralni nervni sistem. Od posebnog značaja je njihova imunomodulatorna aktivnost, za koju su zaslužni β -glukani koji čine sastavni deo ćelijskog zida gljiva (Lindequist i saradnici, 2005). S obzirom na to da je imuni sistem od presudnog značaja u borbi organizma protiv raka, proizvodi na bazi gljiva dobijaju na sve većem značaju u određenim delovima sveta (Wasser, 2017). Ipak, najveći broj istraživanja bazira se na relativno malom broju vrsta a pokazano je da je raznovrsnost glukana velika i da oni imaju različitu aktivnost u zavisnosti od strukture (Lindequist i saradnici, 2005). Zbog toga je od velikog značaja proširenje ispitivanja lekovitih svojstava gljiva i na manje poznate vrste.

Puhare su relativno malo ispitivana grupa gljiva s aspekta hemijskog sastava i biomedicinskog potencijala. S druge strane, njihova upotreba u tradicionalnoj medicini je dobro poznata i široko rasprostranjena. Ove jestive gljive proizvode plodonosna tela loptastog oblika čija unutrašnjost – gleba – tokom sazrevanja prolazi kroz proces autolize pri čemu od nje nastaje suva, praškasta sporonosna masa. Upravo zrela gleba puhara našla je primenu u narodnoj medicini kao efikasni hemostiptik, odnosno sredstvo za zaustavljanje krvarenja, mada je primenu našla i kod nekih drugih patoloških stanja. Hemijske promene kroz koje plodonosna tela puhara prolaze tokom sazrevanja relativno su malo poznate (Læssøe & Spooner, 1994; Larsson & Jeppson, 2008; Coetzee and van Wyk, 2009). Nije poznato ni kako autoliza utiče na potencijalne biološke aktivnosti ovih gljiva. Iako je u tradicionalnoj medicini zastupljena upotreba zrelih plodonosnih tela puhara, mali broj istraživanja se bavio upravo njima. Do sada iz puhara nisu okarakterisani polisaharidi, niti njihova potencijalna aktivnost. S obzirom na široku rasprostranjenost njihove upotrebe u

tradicionalnoj medicini, puhare su odlični kandidati za ispitivanje potencijalnih fizioloških dejstava i inkorporiranje proizvoda na njihovoj bazi u farmaceutske, dijetetske i kozmetičke proizvode.

Ulazimo u novo doba otkrića lekova na bazi prirodnih proizvoda, sa razvojem novih tehnologija za njihovo dobijanje i karakterizaciju. Priroda je bila darežljiva prema čoveku jer mu je ponudila lekove za životno ugrožavajuće bolesti, samo je potrebno do njih i doći (Shen, 2015).

1. Pregled literaturnih podataka

1.1. Značaj gljiva za čoveka

Gljive, carstvo živih bića raznovrsno kao i carstvo biljaka i životinja, imaju jasno definisano mesto u ekosistemima – one su, uz bakterije, glavni razlagači organskih jedinjenja, prvenstveno lignina i celuloze, što omogućava nesmetano odigravanje životnog ciklusa ekosistema (Mueller i saradnici, 2011; Kubicek, 2013).

Za ljude, one su od višestrukog značaja; pre svega, koriste se u ishrani; više od 2000 vrsta smatra se bezbednim za jelo, a oko 20 se proizvodi na industrijskom nivou. Kao namirnica gljive su niskokalorične; energetska vrednost gljiva kreće se od 350–450 kcal/kg sveže mase. Ovo je posledica visokog sadržaja vode u gljivama a niskog sadržaja masti. Suva masa gljiva je mala i čini oko 10% mase. Proteini čine oko 20-25 % (od kojih esencijalne aminokiseline čine oko 40%), lipidi 2-3 %, a minerali 5-12 % suve mase gljiva. Najveći deo suve mase gljiva čine ugljeni hidrati, najčešće oko 70%. Prosti šećeri i šećerni alkoholi (trehaloza i manitol), kao i glikogen, čine manji deo ove frakcije, dok su nesvarljivi polisaharidi, hitin i β -glukani dominantni, čineći gljive odličnim izvorom rastvornih i nerastvornih vlakana. Gljive su i izvor vitamina, pre svega provitamina D₂ (ergosterola) i u manjoj meri karotenoida (provitamini A) i tokoferola (uključujući i vitamin E), kao i vitamina C i vitamina B kompleksa. Usled slabe svarljivosti gljiva međutim nije dovoljno poznato kolika je iskoristljivost ovih nutrijenata (Kalač, 2012; Kalač, 2016).

Od davnina su neke vrste poznate kao delikatesi. Najcenjeniji su tartufi (*Tuber spp.*), koji se nalaze uz pomoć dresiranih pasa jer plodonose pod zemljom. Kao važne komercijalne gljive izdvajaju se i vrganji (*Boletus spp.*), lisičarka (*Cantharellus cibarius*), smrčkovi (*Morchella spp.*), koje sve predstavljaju mikorizne vrste i koje se, kao takve, ne mogu uzgajati (Iwase, 1997; Boa, 2004). Od onih koje se uzgajaju treba izdvojiti šampinjon (*Agaricus bisporus*), bukovaču (*Pleurotus ostreatus*), šitake (*Lentinula edodes*) i zimsku panjevčicu (*Flammulina velutipes*) (Kalač, 2016; Zied & Pardo-Giménez, 2017)

Mnoge mikromicete koriste se u ishrani posredno, u procesima dobijanja namirnica. Pekarski, odnosno pivski kavasac (*Saccharomyces cerevisiae*) koriste se u proizvodnji hleba i drugih pekarskih proizvoda, ali i u proizvodnji alkoholnih pića, piva i vina. *Penicillium roqueforti* i *Penicillium camemberti* su pak, zaduženi za dobijanje nekih vrsta sireva. (Struyf i saradnici, 2017; Walker & Stewart, 2016; Hymery i saradnici, 2014;).

Gljive se koriste i za industrijsku proizvodnju nekih hemijskih supstanci kao što su, formaldehid, organske kiseline (limunske, glukonske, fumarne, piruvinske), enzimi (lipaze, celulaze, amilaze, invertaze, proteaze, ksilanaze, pektinaze) (Sanchez & Demain, 2017) itd.

Neke gljive mogu da razlože insekticide, herbicide i sastojke teških goriva. Gljive su takođe bioakumulatori teških metala; one imaju sposobnost solubilizacije i imobilizacije metala, metaloida i radionuklida, što ih čini pogodnim za procese bioremedijacije (Gadd & Gadd, 2001).

Značaj gljiva u medicini je mnogostruk; gljive su uzročnici bolesti i trovanja, ali i izvor farmakološki aktivnih supstanci.

1.2. Značaj gljiva u medicini

Opasnost od trovanja koju nosi konzumiranje nekih vrsta gljiva poznata je od davnina. I danas je trovanje gljivama aktuelna tema, jer među njima ima onih koje su i smrtno otrovne. Po tipu toksina koji sadrže, mehanizmu toksičnog delovanja i kliničke slike trovanja, gljive mogu da se podele na one koje sadrže amatoksine i dovode do hepatotoksičnosti (zelena pupavka - *Amanita phalloides*, koja je uzročnik preko 90% smrtnih trovanja gljivama, spada u ovu grupu), na one koje sadrže neurotoksine, zatim gastrointestinalne iritanse (najveći broj otrovnih gljiva izaziva gastrointestinalni sindrom) i druge (Köppel, 1993; Jo i saradnici, 2014). Pored ovoga, gljive mogu da izazovu trovanja i posredno, kao kontaminanti namirnica koje čovek konzumira. Ražena glavica (*Claviceps purpurea*), je parazit na žitaricama i brašno dobijeno od krupe zaraženog žita sadrži ergot-alkaloide, toksine koji dovode do ergotizma. Neke vrste iz roda *Aspergillus* koje se nalaze

na žitaricama produkuju aflatoksine, toksine jetre koji su ujedno potentni kancerogeni (Adeyeye, 2016).

Gljive su i alergeni za predisponirane ljude; poznate su alergije na kvasac, kao i razne vrste buđi, ali i na gljive koje produkuju plodonošna tela, tj. pečurke (Horner i saradnici, 1995).

Gljive, pre svega one iz razdela Ascomycota, uzročnici su mnogih bolesti kod ljudi. Vrste iz rodova *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* i drugih uzročnici su oportunističkih infekcija koje su povezane sa slabljenjem funkcije imunog sistema. Sistemske gljivične infekcije sve su veći klinički problem zbog neracionalne upotrebe antibiotika i i imunosupresiva, a povećana incidenca sistemskih gljivičnih infekcija prisutna je kod osoba zaraženih HIV-om (Karkowska-Kuleta, 2009; De Pauw, 2011; Kauri saradnici, 2016). S druge strane, vrsta kvasca *Saccharomyces boulardi* koristi se kao probiotik u tretmanu akutne dijareje (Feizizadeh i saradnici, 2014).

Saccharomyces cerevisiae, odnosno pivski/pekarski kvasac koristi se kao dijetetski suplement (Jach & Serefko, 2018). *S. cerevisiae* koristi se i za proizvodnju oko 20% biofarmaceutika, što uključuje preko 40 rekombinantnih proteina (Sanchez & Demain, 2017).

Gljive poseduju i lekovita svojstva ali njihov medicinski potencijal nije dovoljno iskorišćen; tradicija korišćenja lekovitih svojstava gljiva u svrhu lečenja u nekim delovima sveta duga je par hiljada godina. To se pre svega odnosi na daleki istok, Kinu i Japan, gde je i danas upotreba gljiva u različite svrhe mnogo veća nego bilo gde drugde u svetu (Wasser, 2010). Relativno skori pronalazak ledene mumije, Ecija, u ledu italijanskih Alpa, i istraživanja koja su usledila, pokazala su da su drevni narodi Evrope takođe koristili gljive u lekovite svrhe (Vunduk i saradnici, 2015). Moradali i saradnici (2007) navode da su i slovenski narodi imali tradiciju upotrebe gljiva u svrhu lečenja, a tome svedoči i Hilendarski kodeks. U ovom svojevrsnom prvom medicinskom kodeksu Balkana lekovita sredstva koja se pripremaju na bazi gljiva navode se čak 8 puta, mada nije jasno koje su sve vrste bile korišćene pošto se sve javljaju pod zajedničkim nazivom "Agaricus" (Jarić i saradnici, 2011). Naš narod koristio je gljive kod lečenja tumora i otvorenih rana,

glavobolje, stomačnih bolova, kamena i peska u bubregu, za iskašljavanje i snižavanje temperature. Poslednjih decenija i Zapadna nauka i medicina poklanjaju sve više pažnje lekovitim svojstvima gljiva; gljive produkuju različite polisaharide, proteine i sekundarne metabolite, od kojih mnogi pokazuju farmakološko delovanje i potencijalni su lekovi. Rezultati masovnog skrininga na lekovita svojstva gljiva koji se vrši poslednjih godina daleko opravdavaju uloženo vreme i resurse. Gljive pokazuju najrazličitija povoljna dejstva na ljudski organizam; Wasser (2010) navodi da gljive ispoljavaju čak 126 medicinskih funkcija, a među značajnijima su: antitumorno, imunomodulatorno, antioksidativno, kardiovaskularno, antibakterijsko, antivirusno, antiparazitsko, antifungalno, antidijabetsko, hepatoprotektivno, antihiperholesterolemijsko.

1.3. Lekovita svojstva gljiva

Iako su se gljive koristile u medicinske svrhe od davnina smatraju se nedovoljno istraženim a bogatim izvorom farmakološki aktivnih komponenata. Do sada je istražen veliki broj efekata u *in vitro* uslovima dok su klinička ispitivanja još nedovoljno realizovana. Relativno mali broj lekova gljivljeg porekla našao je primenu u zvaničnoj medicini.

Kao najznačajnija medicinska svojstva gljiva izdvajaju se:

Antimikrobno dejstvo gljiva je verovatno i najviše ispitivano. Otkriće da gljivice iz roda *Penicillium* proizvode potentne antibiotike – nazvane penicilini jedno je od najvećih medicinskih otkrića u 20. veku. Srodna grupa β -laktamskih antibiotika – cefalosporina izolovana je iz gljivica iz roda *Cephalosporium*. Iz gljivica su takođe izolovani i drugi antibiotic sa antibakterijskim dejstvom, fuzidinska kiselina (*Acremonium fusidioides*), kao i antifungalni antibiotici grizeofulvin (*Penicillium griseofulvum*), ehinokandin B (*Aspergillus* spp.) itd. Sredinom 20. veka ispitivanje antimikrobne aktivnosti je, osim na mikromicete, prošireno i na makromicete. Za mnoge makromicete utvrđeno je *in vitro* antimikrobno delovanje, a iz nekih su izolovani i okarakterisani antimikrobni agensi. S otkrićem da su bakterije streptomicete izvor velikog broja različitih antibiotika i zbog činjenice da mogu lakše da se uzgajaju, sistematski skrining bazidiomiceta na antibiotike je okončan na neko vreme. Međutim, do sada su samo polusintetski derivati pleuromutilina, izolovanog iz

bazidiomicete *Clitopilus passeckerianus* našli primenu, pre svega u veterinarskoj praksi, a od skoro i kod ljudi (Bills & Gloer, 2016; Sanchez & Demain, 2017, Schöffler, 2018). Ipak, sve veći problem rezistencije mikroorganizama na konvencionalne antibiotike, posebno meticilin-rezistetne i vankomicin-rezistetne stafilokoke, doveo je do neophodnosti potragu za novim izvorima antimikrobnih jedinjenja. Olakšavajuća činjenica je svakako razvoj tehnologije i metoda za proizvodnju i izolovanje željenih metabolita. Početkom XXI veka se tako intenzivira skrining bazidiomiceta na njihovo potencijalno antibakterijsko dejstvo; najviše istraživanja bavilo se antimikrobnom aktivnošću ekstrakata gljiva, a malo je okarakterisanih aktivnih agenasa. Gljive generalno pokazuju bolju aktivnost prema G+ bakterijama, a među njima su gljive iz roda *Lentinus*, *Boletus*, *Ganoderma*, *Lepista* i druge (Suay i saradnici, 2000; Alves i saradnici, 2012).

Osim antimikrobnog, gljive mogu da imaju i **prebiotski efekat**, tj. da pospešuju/moduliraju sastav crevne flore in a taj način dovedu do povoljnih efekata. Za gradivne polisaharide gljiva, koji su nesvarljivi u gornjem delu digestivnog trakta smatra se da bi mogli da budu potentni prebiotici. Šampinjon (*Agaricus bisporus*), hrastova sjajnica (*Ganoderma lucidum*), Judino uvo (*Auricularia auricula-judae*), šitake (*Lentinus edodes*), čaga (*Innonotus obliquus*), razne vrste bukovače (*Pleurotus* spp.) i druge vrste gljiva pokazale su povoljno dejstvo na rast/preživljavanje određenih bakterija u ljudskom kolonu. Klinička studija sprovedena na ljudima pokazala je da polisaharidno-peptidni kompleks ("polisaharopeptid", PSP) dobijen iz gljive ćuranov rep (*Trametes versicolor*) reguliše sastav crevne flore posredno, regulacijom humanog imunog odgovora prema ovim mikroorganizmima (Jayachandran i saradnici, 2017; Sawangwan i saradnici, 2018).

Pored antibiotika, metaboliti gljiva koji su našli mesto u zvaničnoj medicini su i statini – grupa lekova koja se koristi u terapiji **hiperholesterolemije**. Utvrđeno je da su visoki nivoi ukupnog i LDL holesterola jedan od glavnih faktora rizika za razvoj bolesti kardiovaskularnog sistema i posledičnog mortaliteta. Statini inhibiraju enzim HMG-CoA reduktazu koji je ključan u sintezi holesterola, tj. koji diktira brzinu njegovog stvaranja. Lovastatin, prirodni statin, produkuju gljivice iz roda *Aspergillus* i *Monascus purpureus* koja se koristi u fermentaciji crvenog pirinča, tradicionalne azijske namirnice. Statini su

međutim detektovani i u makromicetama, najpre u bukovači (*Pleurotus ostreatus*) a zatim i u nekim drugim jestivim i medicinskim gljivama (*Boletus edulis*, *Agaricus blazei*, *Cordyceps sinensis* itd). Lovastatin je identifikovan i u micelijumu i u plodonosnim telima gljiva i njegov sadržaj varira. Sa starenjem plodonosnih tela bukovače (*Pleurotus ostreatus*) dolazi do smanjenja koncentracije lovastatina jer deo migrira u bazidiospore. Studije na ljudima i životinjama pokazale su da konzumiranje nekih jestivih gljiva (*Agaricus bisporus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa*, *Flammulina velutipes* i druge) dovodi do poboljšanja lipidnog statusa i smanjenja nivoa holesterola u krvi. Veruje se da je više mehanizama uključeno u ostvarivanje ovih efekata, kako inhibicija sinteze endogenog holesterola, tako i sprečavanje apsorpcije holesterola iz digestivnog trakta, usled prisustva vlakana, tj. β -glukana i hitina. Studije su pokazale da gljive sadrže i druge metabolite sem lovastatina koji inhibiraju HMG-CoA reduktazu. (Wasser i Weis, 1999; Chen i saradnici, 2012; Seenivasan i saradnici, 2018; Gil-Ramirez i saradnici, 2013).

In vitro studije pokazale su da ekstrakti nekih gljiva imaju **inhibitornu aktivnost na angiotenzin-konvertujući enzim (ACE)**, koji je ključan u nastanku angiotenzina, koji dovodi do povećanja krvnog pritiska. Lekovi – ACE inhibitori su inače u širokoj upotrebi u terapiji hipertenzije. Ipak, registrovani su različiti neželjeni efekti sintetskih lekova, poput kašlja, gubitka/promene čula ukusa i svrab i crvenilo kože. Jedna od prvih gljiva testiranih na ACE-inhibirajuću aktivnost bila je *Grifola frondosa* (“maitake”). Utvrđeno je da ova gljiva ima izraženu sposobnost inhibicije ACE a kao aktivno jedinjenje izolovan je peptid koji je aktivnost zadržavao i nakon digestije intestinalnim proteazama (Choi i saradnici, 2001).

Desjstvo na metabolizam šećera takođe je jedno od potencijalnih primena gljiva. Studije na životinjama pokazale su **antihiperglikemijsko delovanje** vanadijumom obogaćenog micelijuma velike gnojištarke (*Coprinus comatus*). Iz iste vrste okarakterisani su i polisaharidi koji su takođe ispoljili isti efekat *in vivo*, na pacovima. Studije na drugim gljivama čiji su polisaharidni ekstrakti ostvarili *in vivo* hipoglikemijsku aktivnost na miševima, pokazale su i da oni dovode do povećanja indeksa insulinske osetljivosti. Pokazano je i da neke vrste u različitom stepenu inhibiraju enzim uključen u metabolizam

šećera, α -glukozidazu. (Han i saradnici, 2006; Liu i saradnici, 2013; Xiao i saradnici, 2011);

Anti-inflamatorno delovanje

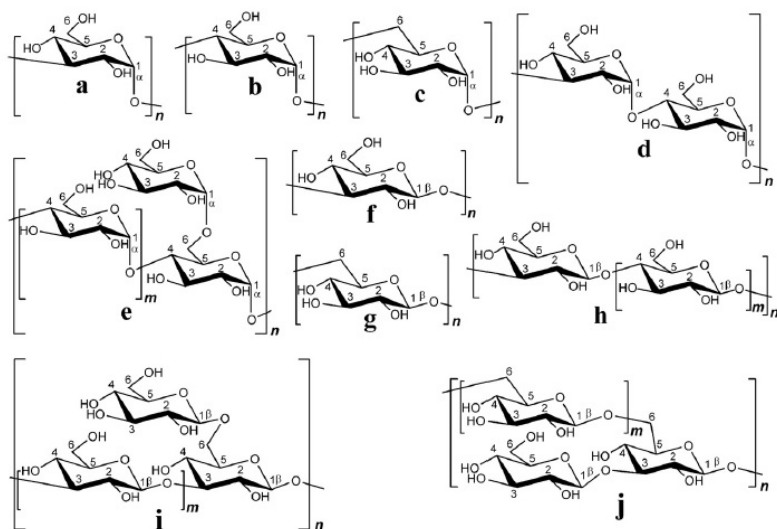
Inflamacija je kompleksan biološki odgovor organizma na različite agense iz spoljne okoline, a praćena je fizičkim simptomima poput bola, povišene temperature, oticanja. U savremenoj medicinskoj praksi za smanjenje inflamacije koriste se nesteroidni antiinflamatorni lekovi čija se dugotrajna upotreba negativno odražava na digestivni trakt. Neki od problema su mukozne lezije, krvarenje, čirevi i perforacije. Navedeni problemi naveli su istraživačku zajednicu da aktivno traga za novim prirodnim izvorima antiinflamatornih jedinjenja, a gljive su se pokazale kao jedan od njih. Utvrđeno je da različite vrste sadrže brojna strukturno različita jedinjenja koja ispoljavaju antiinflamatorno dejstvo: polisaharidi (kod gljiva *Agaricus blazei*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus pulmonarius* i druge vrste), terpenska jedinjenja (*Cyathus africans*, *Ganoderma lucidum*), peptide (*Cordyceps sinensis* i *C. militaris*), fenolna jedinjenja (*Agaricus bisporus*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus*), niskomolekularna jedinjenja poput siringaldehida i siringinske kiseline (*Elaphomyces granulatus*) (Elsayed i saradnici, 2014). Ova jedinjenja deluju tako što smanjuju aktivnost inflamacijskih medijatora citokina, prostaglandina i azot monoksida (NO), čime se inhibira funkcija makrofaga i smanjuje upala.

Antioksidativno delovanje

Tokom metaboličkih procesa u organizmu dolazi do nastanka nestabilnih i kao takvih hemijski veoma reaktivnih vrsta kiseonika/azota koje dovode do štećenja makromolekula. Ova jedinjenja nazivaju se slobodni radikali. Posledice ovog procesa su starenje, mutacije i pojava tumora, neurodegenerativne bolesti itd. Živi organizmi kao i hrana sadrže supstance koje se ponašaju kao stabilizatori slobodnih radikala. Kada stvaranje slobodnih radikalskih formi prevaziđe odbrambeni mehanizam organizma javlja se oksidativni stress a makromolekuli trpe oksidativna oštećenja. Jedinjenja koja imaju sposobnost da umanje štetu nastalu usled oksidacije ili da je spreči nazivaju se antioksidanti. Mehanizam

delovanja može biti inhibicija lančane radikalske reakcije ili potpuno zaustavljanje formiranja slobodnih radikala. Antioksidanti mogu biti i metal helatori, inhibitori oksidativnih enzima ili kofaktori antioksidativnih enzima. Antioksidanti se mogu i naknadno unositi, preko hrane ili suplemenata, a neretko se dodaju i samoj hrani. Sintetski antioksidanti ispoljavaju neželjene efekte te mogu oštetiti jetru ili indukovati karcinogenezu. Zato se preporučuje upotreba prirodnih antioksidanata. Najčešće su to vitamin A i karotenoidi, vitamin E i drugi tokoferoli, vitamin C, flavonoidi i druga fenolna jedinjenja. Gljive su izvor nekih od navedenih antioksidanata, kao i drugih jedinjenja sa antioksidativnim delovanjem i za mnoge gljive pokazano je da imaju veliki antioksidativni kapacitet, koji se može uporediti s povrćem. Intenzivna istraživanja na antioksidativnom delovanju gljiva sporevedena su tokom poslednjih godina i fenolne komponente se navode kao glavni nosioci ove aktivnosti gljiva, ali u sinergizmu sa drugim antioksidantima (Kalač, 2012; Kozarski i saradnici, 2015).

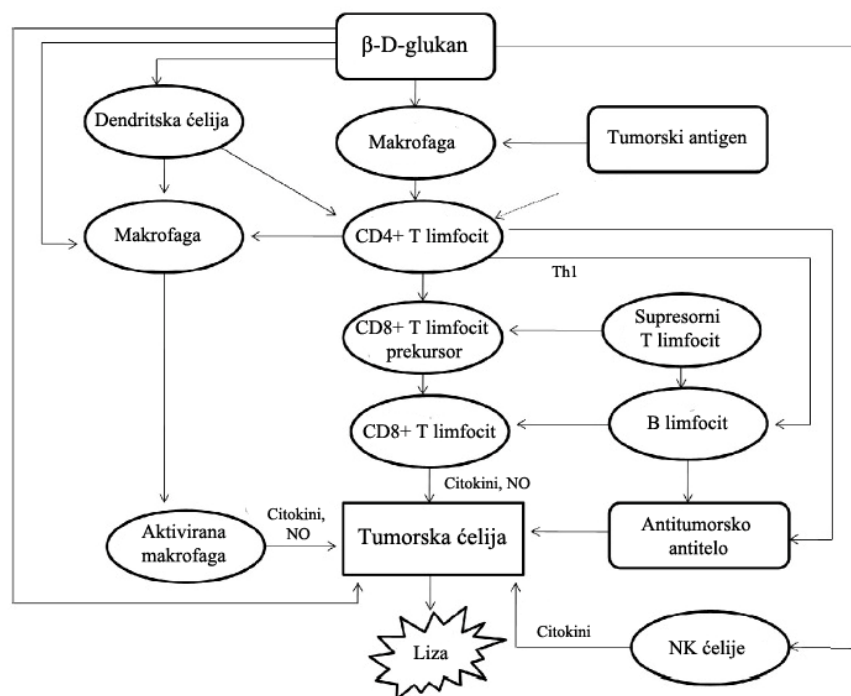
Verovatno najznačajnije svojstvo makromiceta je njihova **imunomodulatorna aktivnost**. Pečurke pokazuju kako imunostimulišuće, tako i imunosupresivno dejstvo. Kako je imuni sistem od presudnog značaja u borbi organizma protiv ćelija raka, sve više pažnje se posvećuje njihovom posrednom antitumorskom delovanju, koje je potvrđeno i u kliničkim studijama. Imunomodulatorna aktivnost se vezuje pre svega za njihove polisaharide, prvenstveno β -glukane. β -glukani su, iako sastavljeni od jedinica glukoze, raznovrsna grupa polisaharida, a razlikuju se po veličini, stepenu razgranatosti, mestu grananja, prisustvu određenog tipa β -veza, prisustvu drugih šećera u lancima, kao i drugih vezanih jedinjenja. Oni su, pored manana (manoproteina) i hitina, gradivni polisaharidi ćelijskog zida gljiva. Mehanizam njihovog dejstva nije u potpunosti razjašnjen. Pouzdano je utvrđeno da glukani stimulišu imuni sistem domaćina; ovaj process podrazumeva aktivaciju dendritičnih ćelija, makrofaga, NK ćelija (*“natural killer cells”*, odnosno *“ćelije rođene ubice”*), T i B limfocita koja se ogleda u modulaciji produkcije određenih citokina. Citokini su mali, signalni proteini koji predstavljaju intercelularne glasnike imunog sistema; oni integrišu funkciju više tipova ćelija u različitim delovima organizma u jedinstveni imuni odgovor. Prilikom imunostimulacije, glukani dovode do stimulacije produkcije inflamatornih citokina kao što



Slika 1.1. Raznovrsnost β-glukana; linearni (1→3)-α- (a), (1→4)-α- (b), (1→6)-α- (c) i (1→3),(1→4)-α- (d) D-glukani, razgranati (1→4),(1→6)-α-D-glukan (e), linearni (1→3)-β- (f), (1→6)-β- (g) i (1→3),(1→4)-β- (h) glukani, razgranati (1→3),(1→6)-β- (i) i (1→6),(1→3)-β- (j) D-glukani (Synytsya & Novák, 2013)

su IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α, INF-γ i drugih. Smatra se da glukani ostvaruju imunomodulatorne efekte vezivanjem za određene receptore koje ove ćelije ispoljavaju; to su TLR (“*Toll like receptor*”), CR3 (“*complement receptor 3*”), NLR (“*NOD like receptor*”), RLR (“*RIG-I-like receptor*”) i posebno dektinski receptor, koji pripada familiji receptora nalik lektinu C-tipa. Ovi receptori iniciraju imuni odgovor tokom infekcije gljivljeg porekla, što nije slučajnost, s obzirom da su glukani univerzalne gradivne jedinice ćelijskih zidova gljiva (Dalonso, 2015; Gulati i saradnici, 2016; Wasser, 2017). Iako predstavljaju makromolekule, bar neki mogu da se apsorbuju iz lumena creva, ali mehanizam apsorpcije nije u potpunosti razjašnjeno. Postoje naznake da se ova apsorpcija odvija rano u gornjem delu digestivnog trakta i da veličina glukana nije od značaja. Utvrđeno je i da odgovor na β-glukane nije isti kod različitih individua (Rowan i Smith, 2002; Dalonso, 2015; Wasser, 2017). Postoje razlike u aktivnosti glukana u zavisnosti od njihovih fizičko-hemijskih osobina, iako su neophodna detaljnija istraživanja za rasvetljavanje njihove aktivnosti i strukture. Nađeno je da se antitumorska i imunostimulišuća aktivnost (1→3)-β-D-glukana razlikuje od one koje pokazuju (1→4)-β-

D-glukani i (1→6)-β-D-glukani. Neke studije su pokazale da primarna struktura glukana (način vezivanja glukoze u osnovnom nizu), molekulska masa, stepen grananja, rastvorljivost u vodi, kao i kvaternerna struktura su važni za njihovu biološku aktivnost. Glukani bolje rastvorljivosti u vodi pokazali su se kao aktivniji; takođe, neke studije su pokazale da glukani veće molekulske mase, ali manjeg stepena grananja, tj. izražene linearne strukture imaju bolju imunomodulatornu aktivnost; tako je pokazano da glukani sa stepenom grananja od 0.2-0.33 mnogo efektivniji antitumorski homopolisaharidi od onih sa stepenom grananja od 0.67-0.75. Lentinan, (1→3),(1→6)-β-D-glukan, izolovan iz šitake (*Lentinula edodes*), inhibira rast tumora (sarkoma-180) samo u konformaciji trostrukog heliksa, dok je jednostruki heliks neaktivan. Mnogo je istraživanja koja su se bavila dejstvom glukana gljiva, međutim, u velikom broju slučajeva radi se o ekstraktima koji pored β-glukana sadrže i druge metabolite pa su studije na prečišćenim polisaharidima i dalje neophodne za potpuno razumevanje njihove aktivnosti (Ruthes i saradnici, 2014; Wasser i Weis, 1999; Wasser, 2002; Dalonso, 2015; Wasser, 2017).



Slika 1.2. Mehanizam imunomodulatorog dejstva β-glukana (Meng i saradnici, 2016)

Osim glukana, u gljivama su prisutni i drugi gradivni polisaharidi, pre svega hitin, koji zajedno sa glukanima čini unutrašnje slojeve ćelijskog zida gljiva. Spoljašnji delovi zidova su sastavljeni od različitih razgranatih polisaharida koji su karakteristika vrsta; to su D-manani i D-galaktani, kao i heteroglikani, tj. polisaharidi sastavljeni od više različitih šećera, D-ksiloze, D-manoze, D-glakatoze, L-fukoze i drugih. Takvi su npr. fukogalaktan izolovan iz šampinjona (*Agaricus bisporus*) i kozjeg papka (*Albatrellus ovinus*), fukomanogalaktan izolovan iz muhare (*Amanita muscaria*) ili heterogalakatan koji u bočnim nizovima sadrži D-glukozu, D-manozu i L-fukozu izolovan iz zimske panjevčice (*Flammulina velutipes*), kao i brojni β -D-glukani sa različitim bočno vezanim šećerima - glukuronoglukani, arabinoksiloglukani, ksiloglukani, manoglukani i ksilomanoglukani (Samuelson i saradnici, 2019; Meng i saradnici, 2016). Potencijalna biološka dejstva ovakvih heteropolisaharida nisu dovoljno istražena.

Iz gljiva su izolovani i kompleksi polisaharida sa proteinima i jedan od najbolje proučenih polisaharidnih imunomodulatornih proizvoda izolovanih iz gljiva je upravo jedan takav kompleks, nazvan polisaharid krestin (PSK), izolovan iz medicinske gljive ćuranov rep (*Trametes versicolor*). Brojne *in vivo* studije, kako na životinjama, tako i na ljudima pokazale su da je PSK potentni imunomodulatorni i antitumorski agens i da značajno ublažava štetne efekte radio- i hemoterapije kod pacijenata. Iz iste gljive izolovan je i podjednako potentni peptidno-polisaharidni kompleks, "polisaharidopeptid" (PSP). Ovi proizvodi koriste se kao adjuvanti, odnosno pomoćna sredstva u terapiji raka u nekim delovima sveta, za sada bez prijavljenih neželjenih efekata. (Ng, 1998; Wasser i Weis, 1999; Man-Fan Wan, 2013).

Ekstrakcija β -glukana može se vršiti na više načina. Najpre se vrši pretretman spraćenog materijala nekim organskim rastvaračem (metanolom, etanolom, acetonom ili smešom) da bi se eliminisale nepolarne komponente kao što su lipidi i terpeni. Vodorastvorni glukani se, mogu ekstrahovati vodom, bilo na sobnoj temperturi (maceracijom) ili kuvanjem. Proces ekstrakcije može se ponavljati više puta da bi se obezbedio maksimalni prinos. Novije tehnike uključuju i korišćenje ultrazvuka ili mikrotalasa za poboljšavanje ekstrakcije kao i ekstrakciju pod povišenim pritiskom; za razbijanje debelih i otpornih gljivljih zidova

koriste se i vodeni rastvori jakih kiselina (HCl) i baza (NaOH). Često se nakon vodene ekstrakcije vrši i bazna ekstrakcija ostatka za dobijanje maksimalnog prinosa. Ovako dobijeni ekstrakti pored polisaharida sadrže i druge molekule, pa je često neophodno njihovo prečišćavanje. Odvajanje frakcije malih molekula iz vodenog ekstrakta često se vrši precipitacijom makromolekulske frakcije etanolom koji se dodaje u dvostruko ili trostruko većoj zapremini. Prečišćavanje od malih molekula može se vršiti i dijalizom u membranskim tubama, što je manje korišćena ali visoko efikasna tehnika koja može da smanji gubitke polisaharidne frakcije tokom prečišćavanja. Međutim, kako je veličina pora komercijalnih membrana za dijalizu dizajnirana za prečišćavanje proteina, tek treba ustaliti koju veličinu pora je potrebno koristiti za prečišćavanja polisaharida određene veličine. Zbog različite strukturne organizacije, polisaharidi iste molekulske mase kao proteini mogu da budu zadržani, ali i eluirani kroz pore iste veličin. Ukoliko ekstrakt sadrži značajan udeo proteina, podvrgava se i deproteinizaciji, koja se može izvršiti reagensima koji talože protein (trihlorsirćetna kiselina, Sevagov reagens – smeša n-heksana i hloroforma) ili pak enzimima proteazama. Najefikasnija tehnika, koja omogućava, ne samo odvajanje polisaharidne frakcije od frakcije male molekulske mase, već i razdvajanje same polisaharidne frakcije po veličini je gel-ekskluziona hromatografija (Szwengiel & Stachowiak, 2016; Wasser, 2017; Ruthes i saardnici, 2014, Rowan i Smith, 2002).

Pored nativnih polisaharida gljiva postoji i izražen interes za polu-sintetskim polisaharidima odnosno hemijski modifikovanim, a u tu svrhu se najčešće koriste karboksimetilovanje, sulfonovanje ili fosforilacija (Synytsya i Novak, 2013). Ispitivanja su pokazala da premda su glukani važni za ljudsko zdravlje imaju nisku biološku dostupnost, tj. nisku rastvorljivost. Zbog toga su β -glukani ponekad nepogodni za medicinsku upotrebu. Hemijske modifikacije imaju za cilj upravo promenu rastvorljivosti (Zhu i saradnici, 2016). Ova osobina navodi se kao ključna za imunomodulatorsku aktivnost polisaharida gljiva. U literaturi se mogu naći podaci o pozitivnom efektu hemijskih modifikacija na biološku aktivnost osnovnih polisaharida. U ogleđima sa polisaharidom izolovanim iz gljive *Ganoderma atrum* primećeno je da se promena konfiguracije i orijentacije hemijskih grupa

molekula odražava na rastvorljivost a time i na interakciju sa specifičnim receptorima što kao posledicu ima stimulaciju imunih ćelija (Chen i saradnici, 2014).

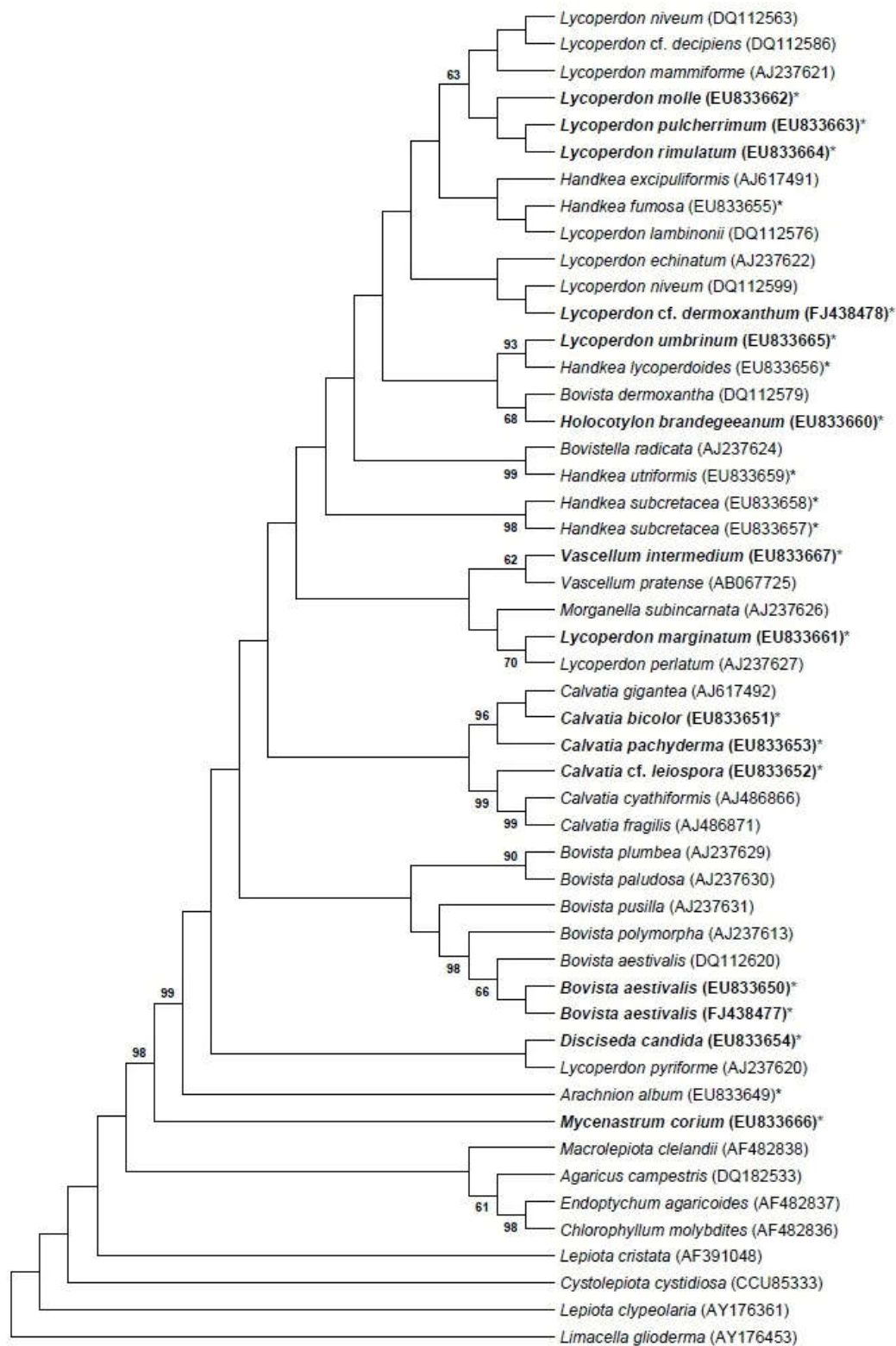
Do sada je nekoliko proizvoda medicinskih gljiva na bazi glukana razvijeno za kliničke i komercijalne svrhe, pre svega u adjuvantnoj terapiji raka; to su polisahardi krestin (PSK), polisaharidopeptid (PSP), izolovani iz ćuranovog repa (*Trametes versicolor*), lentinan, izolovan iz šitake (*Lentinula edodes*), šizofilan, izolovan iz *Schizophyllum commune*, befungin, izolovan iz čage (*Inonotus obliquus*), “D-frakcija” iz maitake (*Grifola frondosa*), GLPS polisaharidna frakcija iz hrastove sjajnice (*Ganoderma lucidum*) i drugi (Wasser, 2017).

Neposredno **antivirusno dejstvo**, nezavisno od imunostimulišuće aktivnosti, ispoljavaju brojne vrste gljiva, što su potvrdila i istraživanja Teplyakova i saradnika (2012). Među 11 ispitanih vrsta prema virusima ptičijeg gripa (H5N1) kao i humanog ptičijeg gripa (H5N2) identifikovano je nekoliko veoma perspektivnih vrsta, poput *Lenzites betulina*, *Trametes versicolor*, *Trametes gibbosa* i druge. Ekstrakti micelijuma lignikolnih vrsta poput *Fomes fomentarius*, *Pleurotus ostreatus*, *Auriporia aurea* i *Trametes versicolor*, u *in vitro* uslovima, efikasni su kako prema H5N1 virusu tako i prema herpes virusu tipa 2 (Krupodorova i saradnici, 2014).

1.4. Puhare

Puhare su grupa gljiva u okviru reda Agaricales koje proizvode zatvorena, loptasta plodonosna tela koja, dok su mlada imaju čvrstu belu unutrašnjost – glebu – koja se tokom sazrevanja pretvara u praškastu, smeđu sponoznu masu. Nakon sazrevanja, glebin omotač – endoperidium – puca i omogućava oslobađanje spora (Larsson & Jeppson, 2008). Ovo je osobina zajednička za više filogenetski udaljenih grupa gljiva koje se objedinjeno zovu gasteromicete – u njih se tradicionalno ubrajaju i tulostome (koje su najbliži srodnici puhara), zvezdače (sada red Geastrales), kao i krompirače i srodnici (Sclerodermataceae) itd. (Demoulin, 1968; Bates & saradnici, 2009)

Puhare imaju kosmopolitsko rasprostranjenje i do sada je opisano oko 150 vrsta (Larsson & Jeppson, 2008). Klasifikacija puhara je međutim dugo bila, a i dalje je, predmet rasprava.

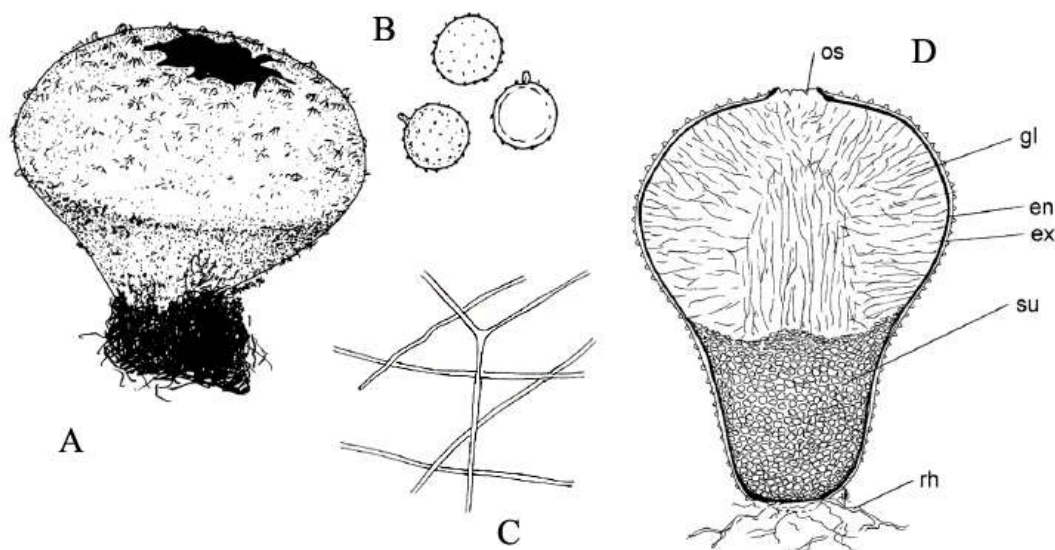


Slika 1.3. Filogenetsko stablo puhara i najbližih srodnika (Bates i saradnici, 2009)

Tradicionalno su svrstavane, kao familija Lycoperdaceae u klasu Gasteromycetes, zajedno sa drugim gasteroidnim gljivama, kao što je već pomenuto. Međutim, već sredinom 20. veka uočena je sličnost između nekih pripadnika gasteroidnih gljiva i gljiva pripadnika redova Agaricales, Boletales i Russulales, koje proizvode tipične pečurke. Krajem veka je s razvojem molekularnih filogenetskih analiza, korišćenjem sekvenci nuklearnih gena koji kodiraju ribozomalnu DNK bilo omogućeno da se nedvosmisleno i dokaže da gasteromicete predstavljaju polifiletsku grupu gljiva sa sličnim morfološkim odlikama. Filogenetske analize su takođe pokazale da su puhare evoluirale od lepiotoidnih gljiva i da zauzimaju mesto u redu Agaricales, te da su im najbliži srodnici rodovi *Lepiota*, *Macrolepiota* (prstenke) i *Agaricus* (šampinjoni) (Bates & saradnici, 2009). Početkom 21. veka neki autori ukidaju familiju Lycoperdaceae i svrstavaju puhare u familiju Agaricaceae, zajedno sa pomenutim srodnim rodovima (Vellinga, 2004). Puhare međutim i dalje ostaju zasebna, monofiletska grupa (Larsson & Jeppson, 2008) sa nedefinisanim taksonomskim statusom. Klasifikacija vrsta unutar grupe takođe doživljava velike promene s razvojem molekularne genetike i taksonomije. Dolazi do premeštanja vrsta unutar rodova zbog čega je često prisutno i više sinonima za jednu istu vrstu. Za mnoge vrste još uvek ne postoji konsenzus oko tačnog položaja u okviru grupe, kao ni oko tačnog razgraničavanja rodova. Zbog toga su u disertaciji korišćena imena za vrste pod kojima su one bile poznate pre genetičkih studija, odnosno pre 2008 godine.

Puhare su pretežno epigeični saprotrofi – razlagači neživog biljnog materijala, koji se razvijaju na zemlji, u šumskim ili travnatim ekosistemima. Neke vrste su i lignikolne – tj. razvijaju se i plodonose direktno na mrtvom drvetu (Larsson & Jeppson, 2008). Ipak, postoje dokazi o mikorizi nekih vrsta puhara; postoje navodi da *Handkea utriformis* i *H. excipuliformis* grade ektotrofnu mikorizu sa nekim vrstama borova i smreka. Takođe, nađeno je da *Calvatia craniiformis* stupa u endotrofnu mikorizu sa biljkom *Liquidambar styraciflua*. I neke druge vrste nalaze se na listi mogućih biljnih simbionata, kao što su *Calvatia subcretacea* i *Calvatia gigantea* – džinovska puhara. (Coetzee and van Wyk, 2009).

Vasellum pratense, *Lycoperdon dermoxanthum*, *Calvatia gigantea*, *C. cyathiformis*, *C. fragilis*, *C. polygonia* su neke od vrsta koje formiraju “vilina kola”, a za poslednje tri je primećen stimulatorni efekat na vegetaciju unutar prstena koji formiraju plodonosna tela. Primećeno je i da neke vrste dovode do umiranja nekih vrsta biljaka unutar zone rasta zbog čega se smatraju štetnim po npr. golf terene (*Vasellum pratense* i *Lycoperdon pusillum*) dok je za druge vrste, kao što su *Calvatia craniiformis* i *Lycoperdon hiemale*, pokazano da spečavaju razvoj tek proklijale zelene salate (Coetzee and van Wyk, 2009; Terashima i saradnici, 2002; Kamo i saradnici, 2006).



Slika 1.4. Morfologija plodonosnog tela puhara; A) Plodonosno telo; B) Spore; C) Kapilicijum; D) Poprečni presek plodonosnog tela; gl – gleba; su – subgleba; en – endoperidijum; ex – egzoperidijum; rh – rizomorfi; os – osteola (Larsson & Jeppson, 2009)

Plodonosna tela puhara su loptasta ali se u njima jasno izdvajaju određene celine. Gleba predstavlja unutrašnju masu plodonosnih tela, koju čine spore i kapilicijum – sterilne specijalizovane hifalne strukture. Glebu okružuje omotač, peridijum, koji se sastoji od unutrašnjeg dela – endoperidijuma i spoljašnjeg – egzoperidijuma. Neke vrste poseduju i subglebu – sterilno, šupljikavo tkivo koje je lokalizovano u dnu plodonosnog tela, koje je odvojeno od glebe tkivom nalik na membranu koje se naziva dijafragma. Plodonosna tela

nekih vrsta poseduju i rizomorfe, splet hifa kojima plodnosno telo naleže na površinu (Breitenbach & Kränzlin, 1986; Bates & saradnici, 2009).



Slika 1.5. Životni ciklus puhara (*Handkea utriformis*); micelijum (1), mlado (2) i zrelo plodonosno telo (3). Foto: P. Petrović

U disertaciji su obrađene tri vrste puhara, *Handkea utriformis*, *Handkea excipuliformis* i *Vascellum pratense*.

1.4.1. *Handkea utriformis*

Trbušasta puhara, kako je kod nas neki autori nazivaju, jedna je od puhara sa još uvek nedefinisanim filogenetskim položajem. Na osnovu genetičkih istraživanja, Larsson & Jeppson (2008) su ovu vrstu svrstali u rod *Lycoperdon* u širem smislu, kao *Lycoperdon utriforme*, kako je gljiva i originalno opisana (*Lycoperdon utriforme* (Bull.) (1790)), dok su Demoulin & Rebriev (2017) ovu vrstu svrstali u rod *Bovistella*, zajedno sa vrstom *B. radicata*. Dugo je bila svrstavana i u rod *Calvatia* (Demoulin & Rebriev (2017)), a poznati su i sinonimi *C. caelata* i *C. bovista*.

Raste na suvim proplancima i livadama, češće na višim nadmorskim visinama, a plodonosi od ranog leta do kasne jeseni. Važi za vrstu koja nije česta, uprkos kosmopolitskoj distribuciji. Plodonosna tela su loptasta dok su mlada, kasnije široko-kapitatna, prečnika i visine 50-150 mm. Površina plodonosnog tela (egzoperidijum) je bele boje, čine je piramidalne, bradavičave izrasline koje podsećaju na mozaik, zbog čega je vrsta u engleskom govornom području poznata kao mozaična puhara ("*mosaic puffball*"). Egzoperidijum se sazrevanjem gubi i otkriva glatki, smeđe-sivi endoperidijum koji je nalik na hartiju i koji puca na apeksu i otkriva zrele glebu. Gleba je najpre bela, zatim žuto-zelena i na kraju maslinasto-smeđa. Suva ljuštura ima karakterističan oblik pehara, sa izraženom pseudodijafragmom i subglebom. Prošlogodišnji ostaci plodonosnih tela ostaju očuvani tokom zime i mogu se naći i narednog proleća.

Spore su globusne, glatke pod svetlosnim mikroskopom, debelih zidova, smeđe boje, veličine 4-5 μm , sa vidljivom uljanom kapi.

Bazidije su klavatne, 9-20 μm X 5-7 μm , sa 1-4 sterigmata, bez bazalnih klema.

Kapilicium, odnosno sterilne hife zrele glebe su svetlo-smeđe, debelih zidova i nije septiran, debljine do 15 μm , sa karakterističnim porama nalik na useke ili zareze.



Slika 1.6. *Handkea utriformis*; odozgo nadole: mlado plodonosno telo, plodonosno telo u fazi autolize i zrelo, otvoreno plodonosno telo iz koga vetar raznosi spore. Foto: P. Petrović, 2013.

Veliki primerci mogu se pomešati sa džinovskom puharom (*Calvatia gigantea*) koja ima glatku površinu i nema izraženu subglebu. Takođe, izduženi primerci se mogu pomešati sa *H. excipuliformis*, koja je občno manja i ima bradavičave spore (Breitenbach & Kränzlin, 1986).



Slika 1.7. *Handkea utriformis*, mlado (levo) i zrelo plodonosno telo (desno). Foto: P. Petrović, 2014

1.4.2. *Handkea excipuliformis*

Raste u šumama, na rubovima šuma, kao i parkovima, a plodonosi leti i u jesen. Rasprostranjena je u Evropi, Aziji i Africi ali nije česta.

Plodonosna tela se sastoje od glave i drške i mogu biti 80-150 mm visoka i 50-120 mm široka, obično su oblika tučka, ali nekada i obrnuto-kruškasta. Egzoperidijum se sastoji od finih, mekih, igličastih i granuloznih izraslina, koje su najpre bele ali ubrzo dobijaju smeđu boju. Endoperidijum kao i kod *H. utriformis* nalik hartiji, puca pri sazrevanju da bi došlo do oslobađanja spora. Drška je valjkasta, visina $\frac{1}{2}$ do $\frac{3}{4}$ ukupne visine plodonosnog tela,

naborane površine, prekrivene finim granulozim izraslinama, najpre bela, kasnije smeđe boje. Gleba i subgleba su bele dok je pečurka mlada, po sazrevanju su maslinasto-smeđe. Po dezintegraciji glave, drška sa sterilnom subglebom ostaje dugo vremena nerazložena.

Spore su globusne, izraženo verukozne, smeđe, 4.5-5.5 μm (bez ornamentacije), sa ostacima sterigmi koji mogu da budu i do 2.5 μm dugi.

Bazidije klavatne, 12-15 X 6-8 μm , sa 4 sterigmate, bez bazalnih klema. Kapilicijum smeđe boje, debelih zidova, bez septi, 3-4 μm u prečniku, sa karakterističnim porama nalik usecima, kao i *H. utriformis*.

Zamena je nekada moguća sa vrstom *Lycoperdon perlatum*, čiji egzoperidijum čine karakteristične kupaste izrasline i čiji apeks po sazrevanju formira poru i nikada ne dezintegriše, kao i sa već pomenutom *H. utriformis*. (Breitenbach & Kränzlin, 1986).



Slika 1.8. *Handkea excipuliformis*; izdužena (gore) i kruškasta (dole) forma plodonosnih tela. Foto: P. Petrović, 2014

1.4.3. *Vascellum pratense*

Raste na livadama i pašnjacima, tokom leta i jeseni. Ne pojavljuje se često.

Plodonosna tela loptasta do obrnuto-kruškasta, relativno mala, 20-50 mm u dijimetru, često šira nego viša. Bela su dok su mlada, zatim žućkasta i na kraju maslinasto-smeđa. Endopiridijum najpre puca na apeksu, formirajući otvor a zatim potpuno dezintegriše. Površina glave prekrivena granularnim i/ili finim igličastim strukturama, koje lako otpadaju, pa nakon kiše npr. plodonosna tela izgledaju potpuno glatko. Na uzdužnom preseku, vidljiva je "dijafragma" koja odvaja glebu od subglebe. Gleba i subgleba bele kada je plodonosno telo mlado; po sazrevanju tamno maslinasto-smeđe, sa dijafragmom nalik na hartiju koja ih deli.

Spore su subglobusne, smeđe, fino verukozne, debelih zidova, s uljanim kapima, veličine 3.5-4.5 X 3.5-4 μm .

Bazidije klavatne, 8-18 X 5-7 μm , bez bazalnih klema.

Kapilicijum smeđe boje, hife tankih zidova, sa mnogo septi, bez klema, okružene amorfnom supstancom, 3-5 μm u prečniku. Hife kapilicijuma su bez pora. (Breitenbach & Kränzlin, 1986).



Slika 1.9.. *Vascellum pratense*; plodonosna tela. Foto: P. Petrović, 2014

1.5. Puhare u folkloru i narodnoj medicini

Puhare su pre svega mesto našle u ljudskoj ishrani. Mnoge vrste su jestive dok su mlade i kao takve su bile dobro poznate još u antičkom svetu, starim Greima i Rimljanima (Læssøe & Spooner, 1994). Džinovska i trbušasta puhara (*Calvatia gigantea* i *Handkea utrifomis*, redom) su posebno cenjene zbog svojih organoleptičkih osobina (Coetzee and van Wyk, 2009). I druge vrste iz rodova *Calvatia*, *Lycoperdon* i *Vascellum* se spominju kao vrste koje se upotrebljavaju u ishrani u nekim krajevima sveta. Osim u Evropi, puhare imaju tradicionalnu upotrebu u kulinarstvu i u Aziji, Africi i Severnoj Americi. Ipak, iako su među starosedeocima Severne Amerike igrale važnu ulogu u ishrani, Irokezi su ih npr. nazivali “đavoljim hlebom”. Zaista, neke vrste iz rodova *Lycoperdon* i *Calvatia* bile su dovedene u vezu sa gastrointestinalnim poremećajima nakon njihove ingestije, ali je do toga verovatno došlo usled konzumacije plodonosnih tela koja su u fazi sazrevanja (autolize) (Læssøe & Spooner, 1994).

Puhare su, međutim, zbog jedinstvenog ciklusa karpofora imale i druge namene, koje su u potpunosti vezane za zrela plodonosna tela. Neka Severno-američka plemena smatrala su ih „palim zvezdama“ i one su imale važno mesto u religioznim obredima, a korišćene su i za „teranje zlih duhova“. Njihovi šatori („tipiji“) oslikavani su prikazima plodonosnih tela puhara koje su imale za cilj da „daju snagu“ onima koji tu obitavaju. Praktična primena puhara bila je kao sredstvo za potpalu i prenošenje vatre. Takođe, zapaljene puhare su se koristile od strane pčelara, jer je njihov dim umirivao pčele i omogućavao lakše uzimanje meda. Umirujući efekat se pre dovodi u vezu s povećanim nastankom ugljen-dioksida nego anestetičkim delovanjem dima zapaljene gljive, mada postoje tvrdnje da su se puhare koristile i kao anestetici prilikom operacija na ljudima. U Nemačkoj su dimom koji nastaje paljenjem puhara „čišćeni“ sanduci za odlaganje žitarica. Severno-američki starosedeoci su glebu zrelih puhara koristili i kao talk, a Danci su plodonosna tela koristili kao jastučice za igle (Spooner & Læssøe, 1994).

Ipak puhare su našle daleko veću upotrebu u narodnoj medicini, pre svega kao vrlo efikasna obloga za rane, tj. hemostiptik, zbog svog adstringentnog delovanja. Ovakva

upotreba bila je široko rasprostranjena u različitim kulturama širom sveta. Narodi Evrope, Afrike, Azije i Severne Amerike su u svojoj tradicionalnoj medicini koristili puhare (Læssøe & Spooner, 1994; Coetzee and van Wyk, 2009). Najraniji dokazi za ovakvu upotrebu datiraju iz Škotske, gde su u drevnim naseljima nađena plodonosna tela puhara *Bovista nigricans* i *Handkea utriformis* stara verovatno preko 2000 godina (Baker, 1989). Ovakva praksa je negde zadržana i tokom 20. veka. Zapisi engleskih herbalista iz prve polovine 17. veka opisuju da seljaci upotrebljavaju puhare za zaustavljanje krvarenja prilikom povreda kao i zarašćivanje ispucalih peta ili lečenje iziritirane kože na bilo kom delu tela (Baker, 1989). Osim kao stiptici, puhare su u Kini upotrebljavane za smanjivanje otoka i “detoksikaciju”. Postoje navodi da su neke vrste korišćene i za lečenje bolova u grlu, groznice i kašlja, bola u stomaku i kao sredstva protiv bolova uopšte. U Nigeriji je *Calvatia cyathiformis* korišćena za tretman leukoreje i pneumaturije. Narodi Severne Amerike koristili su puhare za prevenciju infekcija prilikom presecanja pupčane vrpce. Sporonosna masa je korišćena i za tretman ušnih infekcija. Na Himalajima su korišćene i za ublažavanje tegoba kod povreda ligamenata. Zapaljena, tinjuća plodonosna tela bi bila nanošena direktno na kožu. Laponci su na sličan način tretirali povrede, s tim što su puhare koristili zajedno s trudem (*Fomes fomentarius*) (Læssøe & Spooner, 1994; Baker, 1989; Burk, 1983). Rasprostranjena upotreba zrele glebe puhara za zaustavljanje krvarenja iz nosa je međutim nekada dovodila do potencijalno ozbiljnog poremećaja; ukoliko bi osoba udahnula veliku količinu spora mogla je da razvije alergijsku reakciju, nazvanu likoperdoza, koja se manifestuje simptomima sličnim zapaljenju pluća koji mogu da potraju i nekoliko nedelja (Burk, 1983; Strand, 1967) Gljivlji stiptici ušli su u medicinsku praksu krajem 18. veka, bar u Engleskoj, tako da se 1883. u medicinskim knjigama pominju puhare kao “najmoćniji hemostiptici”. Zanimljiv je i dopis jednim novinama tokom francusko-pruskog rata 1877. gde se poziva na sakupljanje puhara i njihovo korišćenje na bojnopolju, za saniranje rana povređenih vojnika (Baker, 1989).

Puhare su korišćene i u veterinarskoj praksi. Zapisi kažu da su seljaci čuvali velike primerke puhara u štalama i da su ih koristili u slučaju povreda konja ili druge stoke. I sami

veterinari su ih koristili za hemostazu kod konja. U Finskoj i Nemačkoj su puhare korišćene i za lečenje dijareje kod teladi (Læssøe & Spooner, 1994; Baker, 1989).

1.6. Moderna nutritivna, medicinska i biotehnoška istraživanja na puharama

Puhare su generalno malo istraživane, uprkos dobro dokumentovanoj upotrebi u narodnoj medicini. Limitirano je znanje o njihovom hemijskom sastavu, nutritivnoj vrednosti i biološki aktivnim supstancama, kao i potencijalnim medicinski značajnim aktivnostima. Hemijski je verovatno najbolje okarakterisana upravo najznačajnija konzumna vrsta – džinovska puhara (*Calvatia gigantea*), kao i relativno česta vrsta *Lycoperdon perlatum*.

Sadržaj proteina u puharama kreće se između 13.2 i 27.3 % suve mase u najvećem broju studija koje su se bavile nutritivnom vrednošću ovih gljiva; Tako je ukupan sadržaj proteina u *C. cyathiformis* određen na 13.2% (Coetzee and van Wyk, 2009), dok je za *H. utriformis* (kao *C. utriformis*) utvrđeno da sadrži 20.4% proteina u suvoj masi (Grangeia i saradnici, 2011). Za iste vrste drugi autori su međutim dobili daleko veće vrednosti sadržaja proteina, 52% (*Handkea utriformis*) i više od 65% (*Calvatia cyathiformis*) suve mase. Ipak, ovakvi rezultati su kritikovani zbog korišćenja neadekvatnog faktora za preračunavanje proteina preko ukupnog azota, obzirom da se u gljivama azot nalazi u velikoj količini i u hitinu (Coetzee and van Wyk, 2009). Za puhare iz roda *Lycoperdon* Grangeia i saradnici (2011) i Barros i saradnici (2008) dobili su slične vrednosti, 17.1% za *L. perlatum* i 25.5% za *L. echinatum*. Najviše podataka o proteinima, kako kvantitativnih, tako i kvalitativnih, postoji za džinovsku puharu (*C. gigantea*); u različitim studijama ukupni sadržaj proteina u ovoj gljivi određen je na 13.69 i 17.5, 27.3 i 34.37% i predloženo je da sadržaj proteina može da ima veze sa supstratom na kom gljiva raste (Coetzee and van Wyk, 2009; Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005; Kivrak i saradnici, 2016). Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi (2005) su određivali i sastav esencijalnih amino kiselina u 7 različitih vrsta pečuraka i u proteinima *C. gigantea* detektovali su svega dve esencijalne amino kiseline, i to u malim količinama, valin (4.7µg/100g), i lizin (0.27µg/100g). Kivrak i saradnici (2014) određivali su sastav slobodnih amino kiselina u *C. gigantea* i detektovali su sve amino

kiseline osim cisteina. Triptofan i izoleucin bili su dominantni (30 mg/100g i 28 mg/100g). Najmanje je bilo asparaginske kiseline, asparagina, glutaminkse kiseline i metionina (0-2 mg/100g). Sadržaj slobodnih aminokiselina u gljivama je generalno mali (oko 1% suve mase), pa imaju mali značaj s nutritivne tačke gledišta ali doprinose aromi. (Kalač, 2009).

Iz *L. perlatum* izolovana je i neproteinogena, polikarboksilna aminokiselina nazvana likoperdonska kiselina, koja se može smatrati derivatom alanina (Rhugenda-Banga i saradnici, 1979).

Najviše nutritivnih studija na puharama bavilo se sadržajem lipida, tačnije sastavom masnih kiselina i sterola.

Nedelcheva i saradnici (2007) određivali su ukupne lipide u 4 vrste puhara, *Bovista plumbea*, *Handkea utriformis* (kao *Calvtaia utriformis*), *Lycoperdon pyriforme* i *Lycoperdon perlatum* i dobili 3.1, 1.8, 4.8 i 3.4 % u suvoj masi, redom. (Barros i saradnici, 2008 dobili su manju vrednost ukupnih lipida za *L. perlatum*, svega 0.4%, i 0.7% za *L. molle*, dok su Grangeia i saradnici (2011) dobili gotovo identičan sadržaj ukupnih lipida u *H. utriformis* (ponovo kao *C. utriformis*), od 1.9%, a za *L. echinatum* 1.2%. Nizak sadržaj lipida karakteristika je svih gljiva (Kalač, 2009).

Yokokawa (1992) je određivao kompoziciju masnih kiselina i sterola u plodonosnim telima 39 vrsta gljiva Švajcarske i među njima obuhvatio i 2 vrste puhara, *Lycoperdon perlatum* i *L. pyriforme*. Utvrdio je prisustvo 8 (*L. perlatum*), odnosno 9 (*L. pyriforme*) od 10 određivanih masnih kiselina u ovim gljivama. Najzastupljenija masna kiselina je bila linoleinska, oko 50% u oba uzorka, a odmah posle nje oleinska, oko 20%. Palmitinska kiselina je takođe bila zastupljena (oko 10%), dok je u *L. pyriforme* nađen i nešto veći udeo laurinske (oko 10%) i eikozanske kiseline (8.6%). *L. perlatum* imao je najveći udeo miristinske kiseline od svih testiranih uzoraka (1.8%). Autor je takođe uporedio kompoziciju masnih kiselina uzoraka *L. peratum* iz Švajcarske sa onim sakupljenim u Japanu, pri čemu su nađene velike razlike; sadržaj linoleinske kiseline u japanskim uzorcima bio je preko 70%, dok je oleinske bilo svega ispod 5%. Nedelcheva i saradnici (2007) i Barros i saradnici (2008) takođe su određivali sastav masnih kiselina u ukupnim

lipidima ove gljive i, iako su linoleinska, oleinska i palmitinska kiselina bile dominantne u obe studije, ponovo je postojala velika razlika u odnosu linoleinske i oleinske kiseline; u ovim studijama je određeno, redom, 37.6, odnosno 70.7% linoleinske i 24.1, odnosno 12.9% oleinske kiseline. Ovako velike razlike ukazuju na činjenicu da više faktora utiče na kompoziciju masnih kiselina u gljivama i da ona nije striktno karakteristika vrste. Takođe, mogao bi da postoji ekvilibrijum između linoleinske i oleinske kiseline, ali za to je potrebno više dokaza. Almendros i saradnici (1987) su na istoj vrsti dobili slične rezultate, tj. C16 i C18 kao najzastupljenije masne kiseline (nezasićene C18 kiseline činile su više od 50% lipidne frakcije). U navedenim studijama u masno-kiselinskom sastavu lipida ove gljive detektovano je prisustvo i drugih masnih kiselina - palmitoleinske, miristinske, kao i masnih kiselina neparnog broja C-atoma i masnih kiselina izrazito dugih lanaca (>20 C atoma), ali u daleko manjoj količini. Almendros i saradnici (1987) su u lipidnoj frakciji *L. perlatum* takođe detektovali i alkane homolognog niza, iako u relativno maloj količini.

Nedelcheva i saradnici (2007) i Barros i saradnici (2008) su pored ukupnih lipida takođe određivali i sastav masnih kiselina u puharama *H. utriformis*, *B. plumbea* i *L. pyriforme* i *L. molle*; kao najzastupljenije ponovo su nađene linoleinska, palmitinska i oleinska kiselina. Bentley i saradnici (1964) su dobili slične rezultate i u slučaju džinovske puhare (*Calvatia gigantea*); Oni su našli da su najzastupljenije masne kiseline u lipidima ove pečurke takođe linoleinska (75%), oleinska i palmitinska. Kivrak i saradnici (2016) su dobili vrlo slične rezultate i pokazali da je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (pretežno linoleinska) u istoj vrsti 67.93%.

Steroidne komponente su takođe među bolje proučenim jedinjenjima puharama. Yokokawa (1992) pokazao je da je ergosterol glavni steroid u *L. perlatum* i *L. pyriforme* (36.9 i 51.5%, redom), dok je ergostenol manje zastupljen (21.5 i 15.1%, redom). Ostatak steroidne frakcije nije identifikovan. Bentley i saradnici (1964) su ukupan sadržaj sterola u *C. gigantea* odredili na 0.5 mg/g svežih gljiva, a takođe su identifikovali ergosterol kao dominantnu steroidnu komponentu u ovoj vrsti.

Iz vrste *Calvatia cyathiformis* izolovano je i okarakterisano nekoliko novih gljivljih steroida, ciatisterol, ciatisteron, kalvasterol A i B, kao i dimerni steroid, nazvan kalvasteron.

U gljivi su identifikovani i ranije poznati derivati ergosterola, ergosta-4,7,22-trien-3,6-dion i ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on (Kawahara i saradnici, 1993; Kawahara i saradnici, 1994; Kawahara i saradnici, 1995). Iz drugih puhaba izolovani su i drugi steroidi ergostanskog tipa; ergosta-7,22-dien-3-on iz *C. gigantea* i *Lasiosphaera fenzlii*, ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on iz *C. craniformis*, a iz *Bovistella radicata*, pored dva prethodno pomenuta steroida izolovani su i 25 α -hidroksiergosta-7,22-dien-3-on, ergosta-7,22-dien-3,6-dion, 3 β -hidroksi-5 α , 8 α -epidioksiergosta-6,22-dien, 9 α ,14 α -diidroksiergosta-4,7,22-trien-3,6-dion, kao i steroidni estar ergosta-7,22-dien-3 β -il pentadekanoat (Deng i saradnici, 2007).

Od ostalih jedinjenja lipidnog karaktera Bentley i saradnici (1964) su u *C. gigantea* odredili sadržaj koenzima Q9, kao jedinog identifikovanog ubihinona u *C. gigantea*, lipidnog antioksidansa (75 μ g/g svežih pečuraka). Barros i saradnici (2008) određivali su sadržaj tokoferola u više vrsta portugalskih samoniklih gljiva i u puhabama *L. perlatum* i *L. molle* detektovali α -tokoferol u tragovima, 25.23 i 27.13 ng/g svežih gljiva, redom; za razliku od ostalih ispitivanih vrsta, u ovim puhabama nisu detektovali druge tokoferole (β - i γ -tokoferol) Dulger (2005) je detektovao triterpenoidna jedinjenja u vrstama *Lycoperdon perlatum*, *L. molle*, *L. echinatum*, *L. pyriforme*, *Handkea utrififormis* (kao *Calvatia utrififormis*), *Bovista plumbea* i *B. dermoxantha* (kao *B. pusilla*).

Vlakna i ukupni šećeri određivani su u svega par vrsta puhaba; Barros i saradnici (2008) našli su da je sadržaj ukupnih šećera u suvoj masi *L. perlatum* 50.4%, a *L. molle* 61.8%. Najzastupljeniji prosti šećer bio je disaharid trehaloza, dok se šećerni alkohol manitol nalazio u mnogo manjoj količini, za razliku od ostalih ispitivanih gljiva. Ista studija pokazala je relativno visok sadržaj suvog ostatka nakon termodegradacije za ove gljive od čak 32 i 20 %, redom, što je bilo značajno više nego kod drugih ispitivanih gljiva. Grangeia i saradnici (2011) utvrdili su sličan, mada nešto veći sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u *H. utrififormis* i *L. echinatum*, 59.9 i 65.8% i nešto manji suvi ostatak, 17.8 i 9.4%, redom. Kivrak i saradnici (2016) odredili su ukupan sadržaj šećera u *C. gigantea* od 51.97%, od kojih je najzastupljeniji prosti šećer bila takođe trehaloza (9.78%) dok su Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi (2005) sadržaj vlakana u istoj vrsti odredili na 22%, dok je suvi

ostatak nakon žarenja bio samo 6.3%. Od 7 ispitivanih vrsta u studiji, *C. gigantea* imala je najveći sadržaj vode, odnosno najmanji procenat suve mase, svega 4.37%. Ovo možda ukazuje na to da je materijal bio u fazi autolize kada se aktiviraju hidrolitički enzimi gljive koji razlažu određene makromolekule i stvaraju veliku količinu vode.

Agrahar-Murugkar i Subbulakshmi (2005) određivali su i metale i neke nemetale u *C. gigantea*, koja je među 7 ispitivanih vrsta imala značajnu količinu magnezijuma i selen.

Još nekoliko studija bavilo se i sadržajem određenih elemenata u puharama, s akcentom na teške metale. Tako je nađeno da je *L. perlatum*, u poređenju s drugim gljivama, slabiji akumulator gvožđa, umereni akumulator selen, a da značajno akumulira cink, bakar i zlato u nezagađenim sredinama. Za vrstu *Handkea utrififormis* nađeno je pak da slabo do umereno akumulira mangan a umereno kadmijum i olovo (Kalač, 2010). Dve studije bavile su se sadržajem cinka i bakra u ovoj gljivi i rezultati su veoma različiti što ukazuje na to da sastav zemljišta može da ima veliku ulogu na sadržaj ovih metala u plodnosnim telima gljive. Alonso i saradnici (2003) stavili su je na vodeće mesto po stepenu akumulacije ovih metala, dok Turkekul i saradnici (2004) nisu zabeležili veću količinu ovih metala u plodnosnim telima ove vrste, u odnosu na druge analizirane gljive.

Što se tiče akumulacije radioaktivnih elemenata, za *L. perlatum* i *C. craniiformis* je utvrđeno da su slabi akumulatori radioaktivnih izotopa cezijuma (137 i 134) kao i relativno slabi akumulatori kalijuma (40), u poređenju s drugim ispitivanim vrstama. (Muramatsu i saradnici, 1991; Yoshida i saradnici, 1994)

Almendros i saradnici (1987) bavili su se melaninskim strukturama koje *L. perlatum* proizvodi pri sazrevanju. Ova polimerna frakcija često predstavlja glavnu komponentu biomase tokom poslednjeg stadijuma razvoja plodnosnog tela. Oni su pokazali da su ovi melanini kompleksne građe i da sadrže aromatične kiseline (fenolne i benzenkarboksilne), ali da su alifatične strukture predominantne i da uključuju i proteine i masne kiseline. Melanizacija ćelijskih zidova zemljišnih gljiva je poznat fenomen, ali uloga melanina nije potpuno razjašnjena. Melanini gljiva mogli bi da imaju višestruku ulogu; zaštitu od mikroorganizama, sušenja i jonizujućeg zračenja, transport katjona, detoksifikaciju ili čak

da predstavljaju akumulaciju nepotrebnih produkata. Melanini su relativno otporni na biološku razgradnju i imaju tendenciju akumuliranja u humusu. Možda je to upravo razlog zbog koga plodonosna tela puhara dugo ostaju neraspadnuta.

Barros i saradnici (2008) određivali su ukupne fenolne komponente u metanolnim ekstraktima *L. perlatum* (10.6 mg/g ekstrakta) i *L. molle* (11.5 mg/g ekstrakta). Barros i saradnici (2009) su dalje u ovim gljivama određivali pojedinačne fenolne kiseline i dok su u *L. molle* detektovali *p*-hidroksibenzojevu i vanilinsku kiselinu (41.66 i 39.99 mg/kg suve mase), u *L. perlatum* nisu detektovali ni jednu od isptivanih fenolnih kiselina. Kivrak i saradnici (2016) utvrdili su da je najzastupljenija (poznata) fenolna komponenta u *C. gigantea* gentizinska kiselina, prisutna u koncentraciji od svega $\sim 23 \mu\text{g/g}$.

Komponente koje doprinose aromi puhara takođe su bile predmet nekih studija; Dijkstra (1976) je našao da je 1-okten-3-ol, alkohol tipičnog mirisa “na pečurke” (odgovoran za aromu šampinjona) glavna isparljiva komponenta u *C. gigantea*, sa udelom od 89% isparljive frakcije. Glutaminska kiselina i 5'-GMP, dve druge komponente arome gljiva takođe su detektovane u dovoljno visokoj količini da doprinose aromi ove gljive. Drugi autori nisu detektovali 1-okten-3-ol u istoj vrsti, već metoksibenzen u veoma visokoj koncentraciji, ali ovi rezultati su kritikovani jer 1-okten-3-ol nije detektovan ni u šampinjonu (Coetzee and van Wyk, 2009). Kivrak i saradnici (2016) utvrdili su pak da je najzastupljenija komponenta aldehid heksanal (34.71%). Priprema uzorka verovatno ima bitan uticaj na analizu isparljivih komponenti.

Biotehnološki potencijal puhara takođe je bio predmet istraživanja, tačnije njihova sposobnost produkcije enzima od industrijskog značaja. Najviše ovakvih istraživanja rađeno je ponovo na džinovskoj puhari (*C. gigantea*). Pokazano je da kultivacijom pod određenim uslovima ona može da bude dobar izvor lipaza, i naročita amilaza, enzima bitnih u prehrambenoj industriji; činjenica da je u pitanju jestiva vrsta čini je odličnim izvorom ovih enzima (Kekos i saradnici, 1987; Christakopoulos i saradnici, 1992). Goud i saradnici (2009) ipitivali su aktivnost ekstracelularnih enzima 50 vrsta indijskih makromiceta i za puharu *Calvatia sculpta* takođe pokazao da je dobar izvor esteraza (lipaza i karboksil-esteraza). Međutim, pri datim uslovima kultivacije, nije detektovana značajna aktivnost

amilaza i proteaza u medijumu u kome je gljiva gajena. Iz plodonosnih tela *Lycoperdon pyriforme* izolovana je i biohemijski okarakterisana esteraza, kao i β -glukozidaza otporna na teške metale. Ovaj enzim učestvuje u razlaganju celuloze, kao i drugih tipova β -glukozida, zbog čega ima višestruku ulogu u prehrambenoj industriji, npr. za oslobađanje aroma (Akatin i saradnici, 2011; Akatin 2013). Nakon što je pokazano da *C. gigantea* može da raste koristeći jednostavna fenolna jedinjenja (galnu, protokatehuinsku i *p*-hidroksibenzojevu kiselinu), kao i hidrolizirajuće (pirogalne) i kondenzovane (katehinske) tanine, okarakterisan je i enzim koji ona produkuje a uključen je u razgradnju katehina. Time je otvorena mogućnost korišćenja ove gljive i u razgradnji toksičnih fenolnih jedinjenja, kao i eliminaciji taninskih struktura iz biljnih proizvoda, koji su inače otporni na razgradnju (Galiotou-Panayotou & Macris, 1986; Galiotou-Panayotou saradnici, 1988). *Calvatia cyathiformis* i *Lycoperdon perlatum* su bili među 85 vrsta makromiceta koje su Goud i saradnici (2011) ispitivali na aktivnost enzima uključenih u razgradnju lignina. Obe vrste pokazale su, pod datim uslovima, minimalnu aktivnost u testu oksidacije gvajakola, a po aktivnosti lakaze, mangan-peroksidaze i lignin-peroksidaze bile su među manje aktivnim vrstama.

Ekstrakti džinovske puhare u fazi sazrevanja (autolize) su izvor i hitinolitičkih enzima, hitinaze i hitobiazze. Slično, ekstrakti *C. cyathiformis* sa hitinolitičkom aktivnošću stabilni su i nakon smrzavanja. (Coetzee and van Wyk, 2009).

Li i Shetlar (1964) testirali su plodonosna tela gljiva na aktivnost α -galaktozidaze i našli da su puhare bile generalno aktivnije, a među njima najbolju aktivnost nađena je u plodonosnim teliam vrste *Calvatia lepidophora*; autori su takođe potvrdili da je i micelijum svih 7 vrsta ispitivanih puhara pokazivao enzimsku aktivnost i iz vrste *C. cyathiformis* izolovali i okarakterisali α -galaktozidazu koja je ima sposobnost hidrolize prirodnih galaktozida (galaktomanana, verbaskoze, rafinoze, stahioze), ali i sintetskih (metil-, fenil- i nitrofenil α -galaktozide).

Bovista plumbea je okarakterisana kao dobar izvor enzima penicilin V i penicilin G acilaze, enzima koji hidrolizuju prirodne peniciline do penicilinske kiseline, koja se onda dalje korsiti za dobijanje polusintetskih derivata. Iako je gljiva pokazala slabiju aktivnost od

hibridnog soja bakterije *Escherichia coli*, ona ima nekoliko prednosti; najpre, otporna je na visoke koncentracije supstrata (antibiotika), kao i proizvoda enzimske reakcije, a manji je i uticaj temperature na enzimsku aktivnost. Penicilin acilaza iz *B. plumbea* je izolovana i okarakterisana kao visoko specifična za fenoksimetilpenicilin (penicilin V), kao i njegov oksidacioni proizvod, *p*-hidroksifenoksimetilpenicilin. Benzilpenicilin hidrolizuje daleko sporije, a nema aktivnosti prema peptidima i N-acilamino kiselinama (Schneider & Roehr, 1976; Stoppok i saradnici, 1981).

Malo je ispitanih bioloških aktivnosti puhara, kao i njihovih proizvoda. Antimikrobno dejstvo puhara je jedno od bolje ispitanih. Dulger (2005) je ispitivao antimikrobno delovanje 7 vrsta puhara (*Lycoperdon perlatum*, *L. molle*, *L. echinatum*, *L. pyriforme*, *Handkea utriformis* (kao *Calvatia utriformis*), *Bovista plumbea* i *B. pusilla* agar difuzionom metodom, koristeći 60% metanolne ekstrakte. Ekstrakti su generalno pokazali aktivnost prema ispitivanim bakterijama i gljivicama, osim vrsta iz roda *Lycoperdon* koje su bile neaktivne prema bakterijama *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*, i *H. utriformis* koja nije pokazala značajno antifungalno dejstvo i bila neaktivna prema kandidi (*Candida albicans*). U istraživanju su korišćena plodonosna tela puhara, ali nije navedeno u kom stadijumu; obzirom da se navodi da su plodonosna tela sakupljana u periodu od aprila do juna, kao i zaključak da je antimikrobnim delovanjem delimično opravdana tradicionalna primena ovih gljiva, verovatno je da su u pitanju zrela plodonosna tela. Suay i saradnici (2000) pak nisu detektovali aktivnost ni *H. utriformis* ni vrste *Calvatia cyathiformis* prema 9 ispitivanih mikroorganizama, dok Barros i saradnici (2008) nisu detektovali aktivnost metanolnih ekstrakata *L. molle* i *L. perlatum*, protiv G⁺ ili G⁻ bakterija, pri najvećoj koncentraciji (500 µg/mL) koju su koristili u agar dilucionoj metodi. Jonathan i Fasidi (2010) su ispitivali antimikrobnu aktivnost vodenih, metanolnih i etanolnih ekstrakata plodonosnih tela džinovske puhare (*Calvatia gigantea*, kao *Lycoperdon giganteum*) i puhare *Bovista pusilla* (kao *Lycoperdon pusillum*), ponovo nepoznatog stadijuma razvoja. Osim što su pokazali da ekstrakti inhibiraju rast patogenih bakterija i gljivica i da je etanolna ekstrakcija dala najbolje rezultate, autori su ispitivali i uticaj termalnog tretmana ekstrakata na njihovu efikasnost i pokazali da ona najpre raste s

blagim porastom temperature (50 °C), a zatim opada s daljim porastom. Altuner i saradnici (2012) sprovedeli su skrining aktivnosti etanolnog ekstrakta puhare *Bovista nigrescens* na čak 17 sojeva bakterija i jednom soju kandidate, koristeći disk difuzionu metodu; ekstrakt je pokazao aktivnost i prema G+ i G- sojevima, a najbolju prema bakterijama *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* i *Staphylococcus carnosus*; aktivnost prema kandidi nije detektovana. Istraživanje sprovedeno u Jugoslaviji 1978. godine na više vrsta gljiva (vršeno direktnim postavljanjem komadića svežih plodonosnih tela na podlogu zasejanu bakterijama) pokazalo je da je među testiranim pečurkama jedino puhara *Handkea utriformis* (kao *Calvatia utriformis*) imala efekta na bakterije a najizraženije na *Alcaligenes faecalis*, pri čemu je ovaj efekat ostvaren na višestruki način, inhibicijom rasta bakterija, ali i uticajem na morfologiju i fiziologiju bakterija. Ovi efekti su bili reverzibilni, a samo jedan od 6 uzoraka gljive sakupljenih na različitim lokalitetima pokazao je antibakterijsku aktivnost, zbog čega su autori zaključili da aktivnost zavisi od staništa u kom gljiva raste (Brzin & Dežman, 1978). Jameel & Al-Ezzy (2017) utvrdili su da metanolni ekstrakt *Calvatia craniiformis* u kombinaciji sa antiparazitikom ivermektinom inhibiraju *in vitro* rast gljivice *Aspergillus niger* klinički izolovane iz dece obolele od zapaljenja srednjeg uha. Ye i saradnici (2017) ispitivali su antimikrobnu aktivnost različitih tipova ekstrakata zrelih karpofora puhare *Bovistella radicata*; hloroformski, etarski i heksanski ekstrakti nisu imali aktivnost, dok su vodeni, etanolni u butanolni imali izraženu aktivnost i prema bakterijama i prema gljivicama. Autori su izolovali, ali nisu i hemijski okarakterisali dva jedinjenja koja su pokazala dobru aktivnost prema patogenim gljivicama koje izazivaju bolesti kože, *Trichophyton rubrum* i *T. mentagrophytes*.

Gasco i saradnici (1974) i Umezawa i saradnici (1975) nezavisno su izolovali i okarakterisali potentni antibiotik iz medijuma u kom je gajen micelijum puhara *Calvatia fragilis* (kao *Calvatia lilacina*, Gasco i saradnici, 1974) i *Calvatia craniiformis* (Umezawa i saradnici, 1975), nazvan kalvatinska kiselina. Kasnije je utvrđeno da i druge vrste puhara proizvode ovo i slična jedinjenja, pre svega *Lycoperdon pyriforme*, *Calvatia gigantea*, *Handkea utriformis* (Coetzee and van Wyk, 2009). Kalvatinska kiselina, koja hemijski predstavlja *p*-karboksifenilazoksicijanid, jedinstveno je prirodno azo jedinjenje jer sadrži cijano grupu.

Umezawa i saradnici (1975) su utvrdili (agar dilucionom metodom) da molekul poseduje inhibitornu aktivnost prema G⁺ bakterijama (3.12-6.25 µg/mL) i prema nekim G⁻ bakterijama, ali nije pokazao aktivnost prema većini ispitivanih gljivica (uključujući kandidu) pri najvišoj korišćenoj koncentraciji (100 µg/mL). U kasnijem istraživanju antimikrobnog delovanja kalvatinske kiseline i nekoliko sintetskih analoga i Calvino i saradnici (1986), potvrdili su slabu aktivnost kalvatinske kiseline na gljivice i veoma izraženu aktivnost na G⁺ bakterije. Sintetski derivati kalvatinske kiseline, fenilazoksicijanid i njegovi derivati pokazali su širi spektar dejstva, uključujući i antifungalno dejstvo. Sorba i saradnici (2001) su sintetisali seriju molekula koji su predstavljali kombinaciju kalvatinske kiseline i farmakofornu grupu H₂-antagoniste lamtidina kao potencijalne lekove u terapiji želudačne patogene bakterije *Helicobacter pylori*, koji su uspešno inhibirali rast kliničkih izolata ove bakterije, neki čak bolje od referentnog metronidazola.

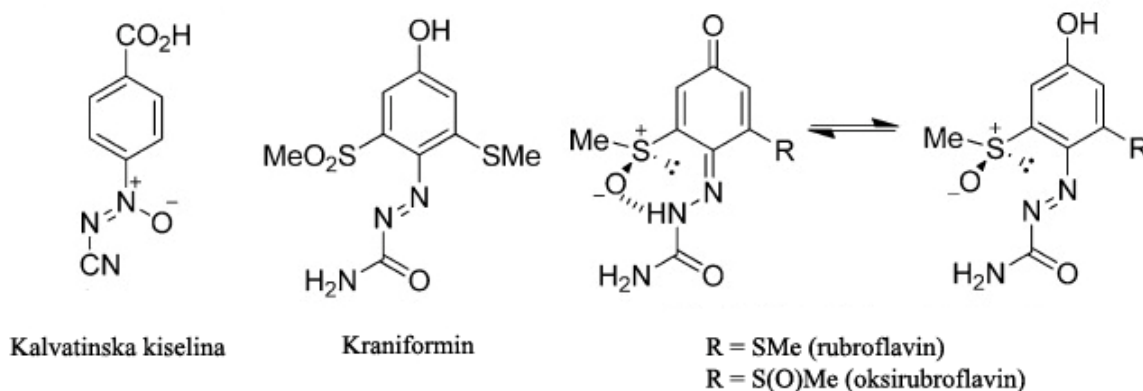
Pokazalo se da kalvatinska kiselina, zbog svojih oksidacionih sposobnosti, inhibira glutation transferazu, enzim koji katalizuje konjugaciju glutationa sa različitim elektrofilnim jedinjenjima čime vrši detoksifikaciju od istih. Ipak, ovaj enzim bi mogao da bude uključen u razvijanje tolerancije prema antikancerskim lekovima i specifičnim inhibitorima koji imaju terapeutsko dejstvo. Kalvatinska kiselina oksidiše ključnu cisteinsku reziduu (Cys47), čime se stvaraju novi intramolekulski disulfidni mostovi koji dovode do konformacione promene enzima i gubljenja aktivnosti. Tako je kalvatinska kiselina označena kao model za buduću generaciju inhibitora glutation transferaze, koji bi mogli da imaju primenu u terapiji (Antonini i saradnici, 1997).

Za kalvatinsku kiselinu se još u ranim istraživanjima pokazalo da poseduje i direktnu antitumorsku aktivnost, inhibirajući rast Jošida sarkoma u ćelijskog kulturi za 50%, a *in vivo* je produžila život miševa inokuliranih ćelijama mišje leukemije 1210. Za miševe je određena i letalna doza (LD₅₀) koja se kretala između 125-250 mg/kg (Umezawa i saradnici, 1975).

Otkriće da kalvatinska kiselina i njeni analozi imaju antitumorsku aktivnost dovela je do detaljnijih istraživanja citotoksičnosti nje i njenih analoga i otkriveno je da ona interaguje

sa tubulinom i poseduje antimikrotubularnu aktivnost. Pretpostavlja se da je azoksicijano grupa ključna za interakciju i da se, slično kao kod glutation transferaze vezuje za sulfhidrilne grupe cisteina i tako onemogućava funkciju tubulina. Ova akcija može biti modulirana supstumentima u *p*- položaju benzenovog prstena, koji dovode do promena u fizičko-hemijskim karakteristikama molekula, kao što su polarnost, particioni koeficijent, sterne i elektronkse karakteristike. Citotoksična aktivnost ovih jedinjenja tako može biti bar delimično povezana sa njihovim antimikrotubularnim dejstvom (Gadoni i saradnici, 1989; Gadoni i saradnici, 1995).

Kalvatinska kiselina i njeni sintetski analozi ispitivani su i kao potencijalni fungicidi u poljoprivredi. Iako su terenski eksperimenti pokazali da su ova jedinjenja aktivna prema komercijalno važnim gljivičnim patogenima, nisu uspeli da održe nivo aktivnosti potrebnu za komercijalnu upotrebu (Gray i saradnici, 2001).



Slika 1.10. Kalvatinska kiselina i njeni analozi (Blair & Sperry, 2013)

Pored kalvatinske kiseline, iz puhara *Calvatia craniiformis*, *Lycoperdon hiemale*, *L. pyriforme* itd. izolovano je još nekoliko sličnih jedinjenja, aromatičnih azo- i azoksiformamida, sa različitim supstumentima na benzenovom prstenu. Ova jedinjenja nađena su, ne samo u filtratu gajenog micelijuma već i u plodonosnim telima. *p*-hidroksi- i *p*-metoksibenzenazoksiformamid, izolovani iz *C. craniiformis* pokazali su značajnu aktivnost u inhibiciji rasta mladica zelene salate, dok su odgovarajući azoksiformamidi bili

daleko slabije aktivnosti, dok je trava *Echinochloa esculenta* (japansko proso) bila manje osetljivija na dejstvo ovih jedinjenja. p-metoskibenzenazofornamid i odgovarajući azoksi derivat, izolovani iz *L.pyriforme* pokazali su i dobru nematocidnu aktivnost prema biljnom parazitu koji napada koren biljaka, glisti *Meloidogyne incognita*, ali ne i prema korisnoj vrsti, *Caenorhabditis elegans* (Köpcke i saradnici, 1999; Kamo i saradnici, 2006). Iz američke vrste *Calvatia rubroflava* izolovan je i crveno obojeni sumporni derivat azoksiformamida, nazvan rubroflavin, za koji je pokazano da ima 2 tautomerna oblika, fenolni i hinonski (Fugmann i saradnici, 2001). Rubroflavin je kasnije pronađen i u *C. craniiformis*, zajedno sa još jednim sumpornim derivatom, nazvanim kraniformin. Oba jedinjenja pokazala su *in vitro* citotoksičnu aktivnost prema tumorskoj liniji ćelija leukemije K562 (Takaishi i saradnici, 1997). Iz *L. pyriforme* izolovan je pak hlorovani azoksiformamid, koji je pokazao bolju citotoksičnu aktivnost prema nekoliko linija tumorskih ćelija (L1210, HL-60, HeLa S3) od nehlorovanog derivata (Köpcke i saradnici, 1999).

Osim kalvatinske kiseline i njenih derivata, iz puhara su izolovane i druge komponente sa antitumorskom aktivnošću. *Calvatia gigantea* je prva puhara na kojoj su izvedena antitumorska ispitivanja, još sredinom 20. veka. Pošto je testirani vodeni ekstrakt ove vrste pokazao antitumorsku aktivnost, iz mladih plodonosnih tela izolovan je veoma potentni tumor-inhibitor, kasnije nazvan kalvacin i okarakterisan kao mukoprotein. Ekstrakti zrelih karpofora su pak pokazali veoma slabu aktivnost. Više stotina primeraka džinovske puhare su testirani na sadržaj kalvacina i nađeno je da se količina u njima razlikuje. Kalvacin se pokazao efikasnim protiv 13 od 24 testiranih tumorskih ćelijskih linija miševa, pacova i hrčkova, što je okarakterisano kao antitumorsko dejstvo širokog spectra. Submerzno je gajen micelijum za dobijanje kalvacina i kalvacin je ušao u toksikološke kliničke studije na životinjama, međutim, nakon kontinuirane upotrebe potencijalnog leka došlo je do razvoja alergijske reakcije kod testiranih pasa i rezus majmuna (Beneke i saradnici, 1963).

Isti istraživači su našli da i druge vrste puhara produkuju slične inhibitore tumora i pokazuju antitumorsku aktivnost, *in vitro* i *in vivo*, npr. *Calvatia bovista*, *C. craniiformis*, *C. cyathiformis*, (Beneke, 1963). Novije istraživanje na metanolnom ekstraktu svežih

karpofora džinovke puhare pokazalo je da ekstrakt inhibira proliferaciju ćelija humanog karcinoma pluća A549 (Eroğlu i saradnici, 2016). Proteinsko-polisaharidni kompleksi sa supresivnim efektom na rast sarkoma 180 kod miševa izolovani su iz submerzno gajenog micelijuma *C. craniiformis*; sadržaj šećera u 6 razvojenih frakcija kretao se od 61-88 %, a proteina 1.3-13 %. Polisaharidne frakcije sastojale su se od manoze, galaktoze, ksiloze i glukoze, s različitim udelom ovih šećera. Ovi kompleksi pokazali su i različitu antitumorsku aktivnost, a aktivnost bar jedne od izolovanih frakcija, nazvane kalvatan, pripisana je stimulaciji imunog sistema pre nego direktnim dejstvom na ćelije raka (Kim i saradnici, 1992, Coetzee and van Wyk, 2009). Iz svežih plodonosnih tela vrste *Handkea utrififormis* (kao *Calvatia caelata*) izolovan je peptid nalik ubikvitinu, veličine 8 kDa koji je pokazao snažnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijama raka dojke u nanomolarnim koncentracijama (Lam i saradnici, 2001). Takođe iz mladih primeraka iste vrste Ng i saradnici (2002) izolovali su i protein, nazvan kalcelin, veličine 39 kDa. Kalcelin je pokazao antimitogenu aktivnost prema ćelijama slezine i smanjio vijabilnost ćelija raka dojke. Autori su ispitali i antimikrobno delovanje proteina, međutim nije detektovana ni antibakterijska, ni antifungalna aktivnost. Proteinski ekstrakt svežih primeraka vrste *Calvatia lilacina* (Coetzee and van Wyk, 2009 navode kao sinonim za *C. cyathiformis*) pokazao je antitumorski efekat na ćelije raka kolona izazivajući apoptozu ćelija indukcijom stresnog odgovora endoplazmatskog retikuluma (Yeh i saradnici, 2011).

Pored onkostatske, ispitivana je i antivirusna aktivnost džinovske puhare; više studija je pokazalo da gljiva poseduje *in vitro* ili *in vivo* aktivnost protiv nekih tipova virusa influence, poliomijelitisa, ECHO enterovirusa. Kalvacin nije pokazao antivirusnu aktivnost, kao ni ekstrakti *H. utrififormis* (Coetzee and van Wyk, 2009). Etanolni precipitat vodenog ekstrakta *Lycoperdon pyriforme* pokazao je pak *in vivo* inhibitornu aktivnost na mozaički virus duvana; autori su prepostavili da su aktivne komponente polisaharidi kojima je ekstrakt bogat, a koji se sastoje od glukoze, manoze, arabinoze i verovatno fukoze (Gubański i Saniewski, 1967).

Lee i saradnici (2017) ispitivali su antiangiogeno delovanje 5 alkaloida i 2 polifenola izolovanih iz retke vrste *Calvatia nipponica*; 3 alkaloida pokazala su dobru antiangiogenu

aktivnost, a najbolju izoindolonski derivat, ranije otkriven iz srodne vrste *Lasiosphaera fenzlii*. Obzirom da je neoangiogeneza jedan od faktora rasta tumora, aktivne komponente iz *C. nipponica* bi mogle da nađu mesto u terapiji. Iste komponente, uz dodatak novoizolovanog metil-estra (7Z,10Z)-7,10-oktadekadienoinske kiseline testirane su i na potencijalno antiinflamatorno dejstvo, preko inhibicije stvaranja NO; jedno od fenolnih jedinjenja, 5-(hidroksimetil)-1,3-benzendiol pokazalo je blagu aktivnost, ali je zato estar masne kiseline imao značajnu aktivnost (Lee i saradnici, 2018).

Izoindolonski derivati izolovani su i iz vrste *Lasiosphaera fenzlii*, među kojima i klitocibin A, poznat iz drugih vrsta gljiva. Jedan od derivata, koji je sadržao ftalimidsku grupu takođe je pokazao dobru antiangiogenu aktivnost, inhibirajući lučenje vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) u kulturi A549 ćelija. Derivat je imao sličnu strukturu kao lek talidomid, za koji je utvrđeno da je ftalimidksa grupa koju sadrži ključna za njegovo dejstvo (Lü i saradnici, 2013).

Iz iste vrste izolovano je i nekoliko sterola, među kojima i peroksi derivati 5 α ,8 α -epidioksi-ergosta-6,22-dien-3 β -ol i 5 α ,8 α -epidioksi-ergosta-6,9(11),22-trien-3 β -ol pokazali značajnu *in vitro* citotoksičnu aktivnost prema HeLa i GES-1 ćelijama, a prvo jedinjenje bilo je selektivno prema kancerškoj ćelijskoj liniji. Takođe, pokazalo je sinergističku aktivnost pri primeni s paklitaksolom (Gao i saradnici, 2015). Meng i saradnici (2014) okarakterisali su još jednu citotoksičnu komponentu iz ove vrste kao lipodepsipeptid.

Pored ispitivanja antimikrobne, antitumorske i antivirusne aktivnosti, relativno malo studija se bavilo i drugim aktivnostima puharama; Singh i saradnici (2012) pokazali su da različiti tipovi ekstrakata vrste *Lycoperdon molle* imaju dobru *in vitro* antioksidativnu aktivnost, koja uključuje sposobnost neutralizacije radikala, kao i sprečavanje peroksidacije lipida i zaključili da bi ova gljiva mogla da bude dobar izvor antioksidanasa za potrebe farmaceutske industrije. Barros i saradnici (2008) su takođe ispitivali *in vitro* antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata *L. molle* i *L. perlatum*, koja je obuhvatala antiradikalnu aktivnost, sposobnost sprečavanja peroksidacije linoleinske kiseline i izbeljivanja β -karotena, kao i redukcionu moć, odnosno sposobnost redukcije teških metala. Ove gljive pokazale su bolju aktivnost od nekih drugih jestivih vrsta, npr. lisičarke

(*Cantharellus cibarius*) i modrikače (*Lepista nuda*), a *L. molle* nešto bolju aktivnost od *L. perlatum*. Akata i saradnici (2018) pokazali su da metanolni ekstrakt potpuno zrelih plodonosnih tela *H. utriformis* ima veći totalni antioksidativni kapacitet od drugih ispitivanih gljiva, među kojima su bile konzumne vrste velika gnojištarka (*Coprinus comatus*), rudnjača (*Agaricus campestris*), sunčanica (*Macrolepiota procera*) i druge, dok je u pojedinačnim antioksidativnim testovima (antiradikalska aktivnost, redukciona moć, sposobnost heliranja teških metala) aktivnost bila prosečna.

Akata i saradnici (2018) su takođe ispitivali i sposobnost nekih vrsta gljiva da inhibiraju aktivnost enzima uključenih u patološke promene kod Alchajmerove bolesti (acetil- i butirilholiesteraza), kao i enzima odgovornih za metabolizam šećera (α -amilaza i α -glukozidaza; oni su našli da je metanolni ekstrakt *H. utriformis* pokazao najbolju aktivnost prema α -amilazi i α -glukozidazi, i bio među najaktivnijim uzorcima prema holinesterazama.

2. Ciljevi rada

Cilj ove doktorske disertacije bio je hemijska i biološka karakterizacija metanolnih ekstrakata relativno slabo proučenih vrsta gljiva iz grupe puhara, *Handkea utrififormis*, *H. excipulliformis* i *Vascellum pratense*, kao i izolovanje, hemijska i biološka karakterizacija polisaharidne frakcije vrste *H. utrififormis* i pokušaj inkapsulacije ove frakcije u liposome, u cilju obezbeđivanja bolje bioraspoloživosti i modifikovanog oslobađanja za potencijalnu primenu, kako oralnim putem, tako i na koži. Ovo je obuhvatalo sledeće faze ispitivanja:

- Sakupljanje plodonosnih tela ispitivanih puhara i gajenje micelijuma *H. utrififormis*; dobijanje metanolnih ekstrakata i vodenih polisaharidnih ekstrakata
- Hemijsku karakterizaciju metanolnih ekstrakata mladih i zrelih plodonosnih tela puhara, kao i micelijuma vrste *H. utrififormis*, sa akcentom na nutraceutike i kozmeceutike i ispitivanje uticaja autolize na njihov hemijski sastav
- Biološku karakterizaciju ekstrakata, koja je obuhvatala *in vitro* antioksidativnu, antimikrobnu, citotoksičnu/antitumorsku analizu i inhibiciju više enzima od patološkog značaja da bi se utvrdio njihov biološki potencijal, ispitao uticaj autolize na aktivnost kao i mogućnost korišćenja gajenog micelijuma kao zamenu za plodonosna tela
- Dobijanje polisaharidnih ekstrakata iz micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela na primeru vrste *H. utrififormis*, njihovo prečišćavanje i fizičko-hemijska karakterizacija, kao i biološka karakterizacija ekstrakata koja je obuhvatala *in vitro* antioksidativnu, antimikrobnu i imunomodulatornu analizu, u cilju ispitivanja njihovog biološkog potencijala, utvrđivanje uticaja autolize na njihovu strukturu i aktivnost, kao i mogućnosti korišćenja gajenog micelijuma kao zamene za plodonosna tela
- Pokušaj inkapsulacije polisaharidnih ekstrakata u liposome kao nosače za omogućavanje modifikovanog oslobađanja i potencijalnu primenu *per os* i/ili na koži i karakterizaciju lipozoma, koja je obuhvatala fizičko-hemijsku karakterizaciju, studiju otpuštanja i studiju stabilnosti ovih sistema

3. Eksperimentalna ispitivanja

3.1. Materijali

U eksperimentalnom delu disertacije korišćene su sledeće hemikalije:

- Bakar (II) hlorid (CuCl_2), natrijum borohidrid (NaBH_4), linoleinska kiselina, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), acetilholin jodid (AChI), butirilholin jodid (BuChI), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), trifeniltetrazoliumhlorid (TTC), tirozinaza iz šampinjona (*Agaricus bisporus*), acetilholinesteraza iz električne jegulje *Electrophorus electricus* (AcHE), butirilholinesteraza iz konjskog seruma (BuChE), α -glukozidaza iz kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid, trifluorosrćetna kiselina (TFA), metil jodid (CH_3I), 1-metilimidazol, dinitrosalicilna kiselina (DNS), galna kiselina, o-kumarna kiselina, p-kumarna kiselina, kafena kiselina, hlorogenska kiselina, 1,3-dikafeoilhina kiselina (cinarin), 1,5-dikafeoilhina kiselina, 3,5-dikafeoilhina kiselina, ferula kiselina, protokatehinska kiselina, rozmarinska kiselina, sinapinska kiselina, siringinska kiselina fenol, anhidrid sirćetne kiseline (Ac_2O) galna kiselina, N-acetilglukozamin, β -karoten, α -tokoferol, ergosterol, kojična kiselina, lovastatin, L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), neokuproin, Coomassie Brilliant Blue R-250, Folin-Ciocalteu reagens, goveđi albumin (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA), L-glutamin, streptomycin, penicillin, fitohemaglutinin (PHA), forbol miristat acetat (PMA), HEPES, RPMI-1640 bez fenol-crvenog, fetalni goveđi serum (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS), Supelco® 37 Component FAME Mix, deuterisani dimetilsulfoksid (DMSO-d_6), deuterisana voda (D_2O) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD).
- Sumporna kiselina (H_2SO_4), perhlorna kiselina (HClO_4), orto-fosforna kiselina (H_3PO_4), mravlja kiselina (HCOOH), amonijum acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), amonijum hidroksid (NH_4OH), natrijum bikarbonat (NaHCO_3), magnezijum sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), bakar (II) sulfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), kalijum natrijum tartarat tetrahidrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4 \text{H}_2\text{O}$), kalijum persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (Centrohem, Stara Pazova, Srbija).

- D-Glukoza, metanol, etanol, etilacetat, n-heksan, aceton, acetonitril, dihlormetan (CH_2Cl_2), dimetilsulfoksid (DMSO) (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija).
- Hloroform (CHCl_3) (Carlo Erba Reagents, Barselona, Španija).
- Natrijum hidroksid (NaOH), kalijum dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), natrijum dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4), natrijum hidrogen phosphate (Na_2HPO_4), natrijum karbonat (Na_2CO_3) (Fagron B.V., Capelle aan den IJssel, Holandija).
- D-fruktoza, D-manoza, D-ksiloza, L-ramnoza, D-arabinoza, D-glukuronska kiselina, D-galakturonska kiselina, D-glukozamin, trehaloza, p-hidroksi benzojeva kiselina (Acros Organics, Geel, Belgija).
- Hlorovodonična kiselina (HCl), sirćetna kiselina (CH_3COOH) (Zorka Pharma, Šabac, Srbija).
- Haemaccel (Sanofi-Aventis, Pariz, Francuska).
- Pronaza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemačka).
- Tween 80 (Croda International, Snaith, Velika Britanija).
- β -glukan analitički kit (Megazyme Int., Wicklow, Ireland)
- Müller-Hinton bujon i Müller-Hinton agar (Biolife, Milan, Italy).
- Kalcijum hlorid (CaCl_2) (Analytika, Prag, Češka).
- Fosfolipon G (Lipoid, Ludwigshafen, Nemačka).
- Natrijum hlorid (NaCl) (Alkaloid, Skoplje, Severna Makedonija).

3.2. Gljivji materijal – poreklo

Plodonosna tela *H. utriformis* sakupljena su na Crnom vrhu kod Bora, istočna Srbija. Plodonosna tela *H. excipuliformis* sakupljena su u okolini Beograda, kao i bližoj okolini Bora, dok su plodonosna tela *V. pratense* sakupljena u Boru i bližoj okolini Bora. Materijal korišćen u eksperimentima sakupljen je u periodu od 2012.-2015. godine. Identifikaciju materijala izvršio je dr Boris Ivančević, viši muzejski kustos Prirodnjačkog muzeja u Beogradu. Micelijumske kulture dobijene iz referentnog materijala, po dve od svake vrste, čuvaju se na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu.

3.3. Proizvodnja micelijuma *H. utriformis*

Micelijumska kultura *H. utriformis* dobijena je iz mladog plodonosnog tela, koje je pripadalo istoj kolekciji plodonosnih tela sakupljenih za potrebe eksperimenata, sa istog mikrolokaliteta. Sterilno tkivo iz unutrašnjosti plodonosnog tela ja zasejano na sladni agar, razliven u sterilnim Petrijevim šoljama. Dobijena čista kultura je najpre umnožena na čvrstom hranljivom medijumu, tj. sladmom agaru a zatim je prebačena u tečni vodeni medijum, tj podvrgnuta je submeznom gajenju, po proceduri korišćenoj od strane Umezawa i saradnika (1975). Medijum se sastojao od glukoze (2 % m/V), peptona (0.5 % m/V), ekstrakta kvasca (0.3 % m/V), KH_2PO_4 (0.3 % m/V) i MgSO_4 (0.3 % m/V). Gajenje je vršeno u erlenmajerima, u tresilici (IKA[®] KS 4000 i control, Staufen, Nemačka) tokom 3 nedelje, uz usitnjavanje izraslog micelijuma mikserom nakon prve i druge nedelje gajenja radi povećanja površine rasta i samim tim ubrzanja dobijanja biomase. Dobijeni micelijum je odvojen od bujona ceđenjem i ispran vodom više puta.



Slika 3.1. Proizvodnja micelijuma *H. utriformis*; uzgajanje na čvrstom (levo) i u tečnom medijumu (desno)

3.4. Priprema ekstrakata

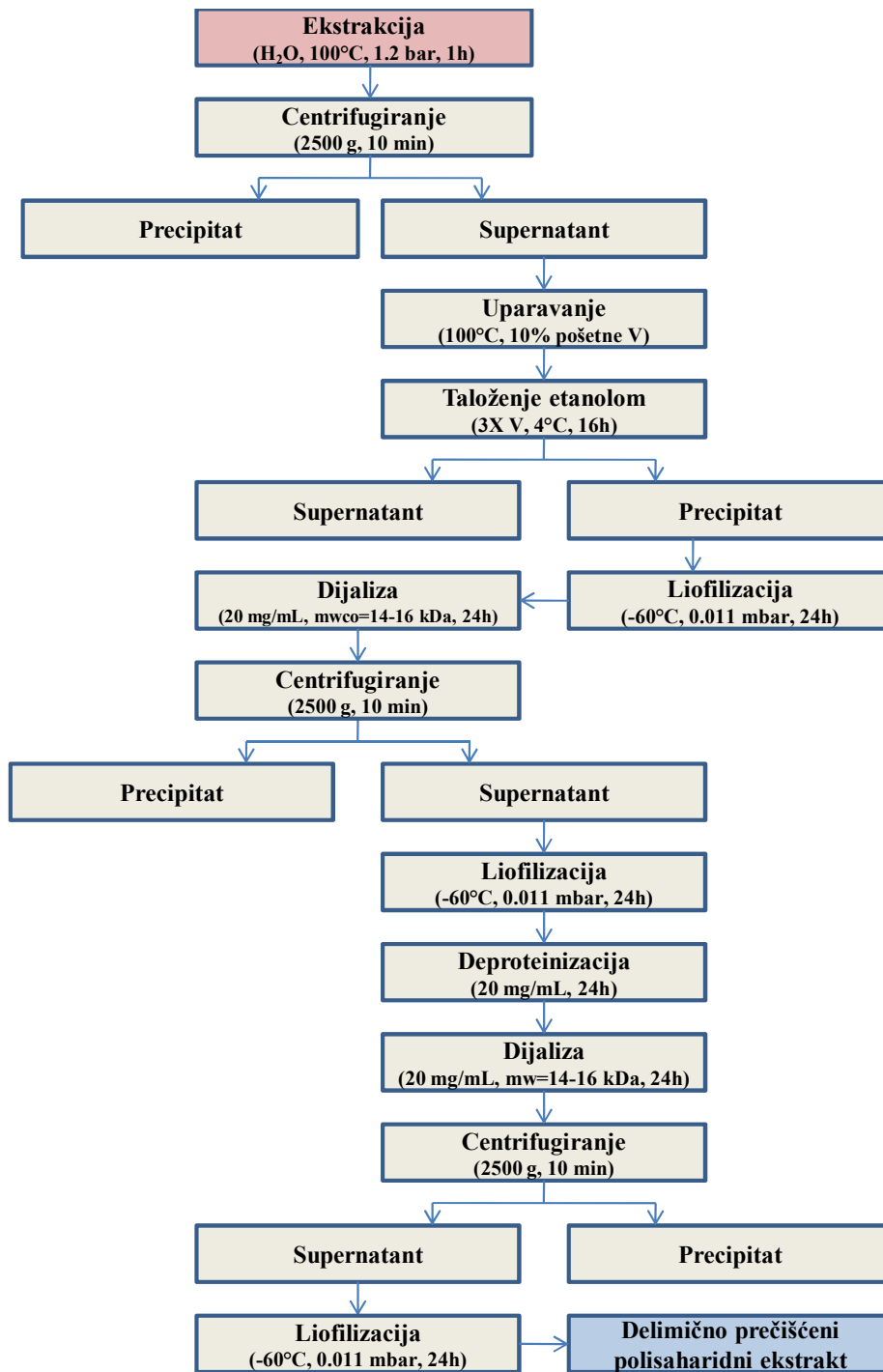
3.4.1. Priprema droge za ekstrakciju i metanolna ekstrakcija

Micelijum i mlada, plodonosna tela puhara, isečena na komade, podvrgnuta su liofilizaciji (24h, -60°C, 0.011 mbar, Christ BETA 2-8 LD plus liofilizator, Osterode, Nemačka). Osušeni materijal je sprашen, dok zrele plodonosne tela nisu zahtevala pretretman, jer je gleba, korišćena za ekstrakciju, potpuno suva i praškasta. Metanolni ekstrakti pripremljeni su maceracijom. Droga je pomešana s metanolom (0.05 g/mL) i ekstrakcija je vršena maceracijom, tj. na sobnoj temperature, tokom 72h, uz konstantno mešanje. Smeša je centrifugirana (10 min, 5000 rpm, Eppendorf 5430 R, Hamburg, Nemačka) i supernatant odvojen od precipitata. Supernatant je dodatno filtriran kroz filter-papir (Whatman[®] No. 5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i podvrgnut uparavanju do suva (Heidolph Hei-VAP Value rotacioni uprivač, Schwabach, Nemačka); dobijeni suvi metanolni ekstrakti dodatno su sušeni u eksikatoru 24h, nakon čega su čuvani u frižideru, zaštićeni od svetla i vlage.

3.4.2. Priprema polisaharidnih ekstrakata

Precipitat dobijen nakon metanolne ekstrakcije micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela trbušaste puhare sušen je u sušnici na 40 °C tokom 24h; materijal je pomešan s vodom (0.04 g/mL, računato na početnu masu, pre metanolne ekstrakcije) i podvrgnut vreloj vodenoj ekstrakciji, u autoklavu (1h, 120 °C, 1.2 bar). Smeše su ohlađene i centrifugirane, nakon čega je precipitat odbačen a supernatant profiltriran kroz filter papir. Zapremina vrelog vodenog ekstrakta smanjena je na 10% početne zapremine vode zagrevanjem na 250 °C, uz konstantno i intenzivno mešanje. U ohlađen, ukoncentrisan ekstrakt ulivena je 3X veća zapremina etanola da bi došlo do precipitacije polisaharida. Smeše ekstrakata i etanola ostavljene su u frižideru tokom 16h, nakon čega su centrifugirane. Supernatant je odbačen a precipitati prikupljeni i dva puta isprani manjom količinom etanola. Precipitat, tj. vreli vodeni ekstrakt je zatim resuspendovan u manjoj količini vode i liofilizovan. Nakon liofilizacije, ekstrakti su rastvoreni u vodi (~20 mg/mL) i podvrgnuti dijalizi u celuloznim membranskim crevima (SERVAPOR, MWCO 12-14 kDa, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) radi uklanjanja malih molekula. Nakon 24h, dijalizati su centrifugirani (6000 rpm, 10 min) i supernatanti prikupljeni i liofilizovani (Christ BETA 2-

8 LD plus liofilizator, Osterode, Nemačka). Osušeni dijalizovani ekstrakti su dalje podvrgnuti enzimskoj deproteinizaciji. Uzorci (10 mg/mL) su rastvoreni u Tris-HCl puferu (0.1 M, pH 8.2) sa dodatkom CaCl_2 (10 mM). Pronaza, rastvorena u istom puferu (10 mg/mL) dodata je rastvorima uzoraka (1 mg/100 mg uzorka). Deproteinizacija je vršena u tresilici (IKA[®] KS 4000 i control, Staufen, Nemačka), uz neprestano mešanje, na 30 °C, tokom 12 h, u dva navrata. Nakon reakcije, smeše su ponovo podvrgnute dijalizi u trajanju od 24h, centrifugirane su (6000 rpm, 10 min, Eppendorf, 5930 R, Hamburg, Nemačka) i supernatanti prikupljeni i liofilizovani. Na taj način dobijeni su delimično prečišćeni polisaharidni ekstrakti.



Slika 3.2. Šema dobijanja deproteinizovanog polisaharidnog ekstrakta

3.5. Fizička i hemijska karakterizacija ekstrakata

3.5.1. Ukupni proteini

Proteini u metanolnim uzorcima određivani su metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), dok su u polisahardnim ekstraktima određivani dvema metodama, po Bradfordu (Bradford, 1976) i po Lowry-ju (Lowry i saradnici, 1951).

3.5.1.1. Određivanje ukupnih proteina po Bradford-u

Bradford-ov reagens je pripremljen rastvaranjem Coomassie Brilliant Blue G-250 boje (100 mg) u etanolu (50 mL, 96%), a zatim je dodata ortofosforna kiselina (100 mL, 85%) i voda (do 1L) i rastvor filtriran kroz filter papir (Whatman[®] No. 5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Metoda je prilagođena izvođenju u mikro-pločama sa 96 bunara (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Nemačka). Uzorci su rastvoreni u metanolu (metanolni ekstrakti, 25 μ L, 10 mg/mL) ili vodi (polisaharidni ekstrakti, 25 μ L, 20 mg/mL) i pomešani s Bradford-ovim reagensom (230 μ L) i apsorbancu očitana nakon 10 min na spektrofotometru (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD), na 630 nm. Goveđi albumin (BSA) je korišćen za konstrukciju standardne krive. Rezultati su izraženi kao procenat proteina (%).

3.5.1.2. Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju

Rastvor uzorka (1 mL, 1mg/mL) pomešan je s rastvorom NaOH (2 mL, 0.1M) koji je sadržao Na₂CO₃ (2%), CuSO₄ (0.01%) i KNaC₄H₄O₆ (0.02%). Nakon 10 min, dodat je vodeni rastvor Folin-Ciocalteu-ovog reagensa (0.2 mL, 1:3) i smeša vorteksirana. Nakon 45 min, apsorbancu je merena na 750 nm na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan), naspram slepe probe, koja je umesto uzorka sadržala istu zapreminu vode. Goveđi albumin (BSA) je korišćen je za konstrukciju standardne krive (0.0625-1 mg/mL). rezultati su izraženi kao procenat proteina (%).

3.5.2. Analiza šećera

3.5.2.1. Ukupni šećeri

Ukupni šećeri određivani su fenol-sumpornom metodom (DuBois i saradnici, 1956). Vodeni rastvori uzoraka (200 μ L, 0.2 mg/mL) pomešani su s vodom (200 μ L), vodenim rastvorom fenola (400 μ L, 5% m/v) i koncentrovanom H₂SO₄ (2 mL, 96%). Apsorbancu je očitana nakon 40 minuta, na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan), na 490

nm, naspram slepe probe (400 μ L vode, 400 μ L fenola i 2 mL H_2SO_4). D-(+)-glukoza korišćena je kao standard za konstrukciju standardne krive. Rezultati su izraženi kao procenat šećera (%).

3.5.2.2. GC-FID-MS analiza alditol acetata i parcijalno metilovanih alditol acetata (PMAA)

Analiza je korišćena za određivanje monosaharidnih komponenti i tipa veza prisutnih u polisaharidnim ekstraktima; metilovanje polisaharida izvršeno je prema proceduri datoj od strane Needs-a i Selvendran-a (1993), dok je dalja priprema PMAA urađena prema proceduri datoj od strane Harris-a i saradnika (1984); za pripremu alditol acetata nije vršeno metilovanje uzoraka.

Polisaharidni ekstrakti (5 mg) rastvoreni su u DMSO-u (1 mL) nakon čega je rastvoru dodat metil jodid (0.5 mL) i fino sprasjen NaOH (40 mg); reakciona smeša je uz konsantno mešanje ostavljena tokom 3h na sobnoj temperaturi. Nakon izvršene reakcije, smeši je dodata voda (1 mL) i CH_2Cl_2 (1 mL), smeša je vorteksirana tokom 5 min i zatim centrifugirana da bi se odvojile vodena i organska faza (2000g, 5 min). Vodena faza je odbačena, a organska uparena do suva pod sniženim pritiskom, u vakuum uparivaču, na 40 °C. Metilovani polisaharidi su dalje podvrgnuti hidrolizi korišćenjem trifluorosirćetne kiseline (2M, 1mL), u autoklavu (100 °C, 2h). Uzorci su nakon hidrolize upareni do suva pod sniženim pritiskom, u vakuum uparivaču (Heidolph Hei-VAP Value rotacioni uprivač, Schwabach, Nemačka), na 40 °C. Suvi hidrolizati su dalje podvrgnuti redukciji, dodavanjem rastvora $NaBH_4$, (0.5M, 1mL) u razblaženom amonijum hidroksidu (2M), tokom 1h na 60 °C, u vodenom kupatilu. Smeši je dodat aceton (0.5 mL) da bi se prekinula reakcija, a zatim je uparena do suva pod sniženim pritiskom, u vakuum uparivaču, na 40°C. Suvi hidrolizati su dalje rastvoreni u glacijalnoj sirćetnoj kiselini, a zatim je rastvoru dodat etil acetat (1 mL) i anhidrid sirćetne kiseline (3 mL), smeša dobro promešana, a potom je dodata i koncentrovana perhlorna kiselina (70%, 100 μ L) i smeša ponovo promešana. Nakon 5 min, smeša je ohlađena u ledenom vodenom kupatilu i dodata je voda (10 mL) i odmah potom 1-metilimidazol (200 μ L); smeša je još jednom dobro promešana i ostavljena još 5 min. Zatim je dodat CH_2Cl_2 (1 mL) i smeša vorteksirana tokom 5 min. Nakon

razdvajanja faza, odbačena je vodena faza a dihlorometanska čuvana u zamrzivaču (-20 °C) do dalje analize.

Razdvajanje i detekcija PMAA izvršena je na na Agilent 6890 N gasnom hromatografu sa FID i MS detektorom i kapilarnom kolonom (HP-5MS, 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm), pri temperaturi injektora i detektora od 280 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum (1 mL/min). Temperaturni program je bio podešen na 60-280 °C, uz linearni porast temperature od 3 °C/min. FID detektor bio je podešen na 280 °C, a split-splitless injektor na 200 °C, a snimanje je vršeno u split modu (1:10). Korišćena je EI tehnika jonizacije, 70 eV. Zapremina injektovanog uzorka bila je 1 μL.

Identifikacija je vršena poređenjem retencionih indeksa (RI) i masenih spektara komponenata smeša sa odgovarajućim podacima iz kompjuterske datoteke (Wiley, NIST/NBS). Procentualni sadržaj pojedinačnih komponenti određivan je metodom normalizacije integrisanih površina pikova.

3.5.2.3. Analiza mono- i disaharida tečnom hromatografijom

Metanolni ekstrakti rastvoreni su u vodi, u visokoj koncentraciji (50 mg/mL), da bi se ekstrahovala samo hidrofilna frakcija, i centrifugirani 10 minuta na 10000 rpm (Eppendorf 5430 R, Hamburg, Nemačka). Odvojeni supernatant je filtriran kroz membranski filter (BRAND 0.2μm, BrandTech Scientific, Inc., Essex, CT, SAD) i sakupljeni filtrat korišćen za dalju analizu.

Prečišćena polisaharidna frakcija podvrgnuta je kiseloj hidrolizi (Boual i saradnici, 2012). Uzorci (10 mg) su rastvoreni u razblaženoj trifluorosirćetnoj kiselini (4 mL, 4M) i smeše su konstatno mešane tokom 6h na 80 °C. Nakon hidrolize, trifluorosirćetna kiselina je uparena do suva pod sniženim pritiskom, na vakuum uparivaču (Heidolph Hei-VAP Value rotacioni uprivač, Schwabach, Nemačka) a ostatak rastvoren u metanolu i ponovo uparen do suva. Ispiranje metanolom ponovljeno je 5 puta, dok trifluorosirćetna kiselina nije skoro potpuno odstranjena iz sistema. Suvi ostatak je rastvoren u 1.5 mL vode i takav korišćen za dalju analizu.

Tečna hromatografija uzoraka vršena je na HPLC sistemu Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific (Waltham, SAD), koristeći kolonu za razdvajanje i detekciju šećera (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca^{2+} , 300 mm \times 7.7 mm, 8 μm). Kolona je inkubirana na 80°C, a kao mobilna faza korišćena je voda. Eluiranje je vršeno brzinom od 0.6 mL/min. Detekcija šećera je postignuta RI-detektorom, tj. detektorom refraktivnog indeksa (RefractoMax 520, ERC, Germany), a obrada podataka vršena je u Chromeleon softveru. Za konstrukciju standardnih kriva standarda korišćeni su glukoza, fruktoza, manoza, galaktoza, ksiloza, ramnoza, arabinoza, fukoza, glukuronska i galakturonska kiselina, N-acetilglukozamin, glukozamin i trehaloza.

3.5.2.4. Određivanje ukupnih, α - i β -glukani

Ukupni, α - i β -glukani u polisaharidnim ekstraktima određeni su komercijalnim kitom, prema procedure datoj od strane proizvođača (MUSHROOM and YEAST BETA-GLUCAN ASSAY KIT, Megazyme Int., Wicklow, Ireland).

3.5.3. Ukupni fenoli

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima procenjen je Folin-Ciocalteu metodom (Skotti i saradnici, 2014), prilagođenoj mikropločama sa 96 bunara. Metanolni, odnosno vodeni rastvori ekstrakata (12.5 μL , 4 mg/mL) pomešani su s vodom (175 μL), Folin-Ciocalteu reagensom razblaženim vodom (25 μL , 1:5 v/v) i vodenim rastvorom Na_2CO_3 (20% m/v, 75.5 μL). Ploče s reakcionim smešama ostavljene su u mraku tokom 2h a zatim je očitana apsorbanca na 630 nm na spektrofotometru (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD). Galna kiselina korišćena je za konstrukciju standardne krive, a rezultati su izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta (mg GAE/g).

3.5.4. HPLC-MS analiza fenolnih kiselina

HPLC-MS analiza fenolnih kiselina u metanolnim ekstraktima je vršena na Agilent LC/MS sistemu 1260/6130 (Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka), opremljenim ChemStation softverom Rev. B.04.03-SP1, UV detektorom (DAD) (G4212B), "single quadrupole API-ESI" masenim detektorom (6130) i Zorbax SB-Aq kolonom (150 \times 3.0 mm; 3.5 μm particle size, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemačka). Razdvajanje je vršeno na 25 °C, uz mobilnu fazu koju su činili 0,1% HCOOH u vodi (A) i metanol (B). Korišćen je linearni gradijentni program 5-95% B (30 min) uz *post run* (5 min), s protokom

od 0.3 ml/min. DAD spektri snimani na 210, 254 i 330 nm. Maseni spektri snimani su u negativnom modu (*the full-scan*). Kao standardi korišćene su p-hidroksi benzojeva, galna, o-kumarna, p-kumarna, kafena, hlorogenska, 1,3-dikafeoilhina (cinarin), 1,5-dikafeoilhina, 3,5-dikafeoilhina, ferula, protokatehinska, rozmarinska, sinapinska i siringinska kiselina. Standardne fenolne kiseline podvrgnute su istim uslovima analize.

3.5.5. Određivanje α -tokoferola

Kvantifikacija α -tokoferola urađena je tečnom hromatografijom, na uređaju HPLC sistemu Agilent 1260 (Agilent technologies, Waldbronn, Nemačka), opremljenim ChemStation softverom (Rev. B.04.03-SP1) i UV-VIS detektorom (G4212B), na Zorbax SB-C18 koloni (250 × 4.6 mm; 5 μ m particle size, Agilent technologies, Waldbronn, Nemačka). Metanolni ekstrakti rastvoreni su u smeši metanola i n-heksana (9:1 V/V, 25 mg/mL) i filtrirani kroz membranski filter (BRAND 0.2 μ m, BrandTech Scientific, Inc., Essex, CT, SAD). Eluiranje je vršeno vodom razblaženom mravljom kiselinom (0.1% v/v) (mobilna faza A) i metanolom (mobilna faza B). Kolona je inkubirana na 25°C, a gradijentni program je bio sledeći: 10 - 90% B (15 min), 90 - 100% B (5 min), izokratsko eluiranje sa 100% B (5 min), 100 - 10% B (5 min), u ukupnom trajanju od 32 min, sa brzinom protoka od 0.8 mL/min, a injekciona zapremina uzorka je bila 5 μ L. Detektor je bio podešen na 280 nm. α -tokoferol je korišćen za konstrukciju standardne krive.

3.5.6. Određivanje ergosterola i slobodnih masnih kiselina

Za određivanje ergosterola i slobodnih masnih kiselina u metanolnim ekstraktima korišćena je gasno-masena hromatografska metoda (GC-MS).

Za određivanje ergosterola uzorci su rastvoreni u metanolu (10 mg/mL).

Za određivanje slobodnih masnih kiselina izvršena je predpriprema uzoraka, tj. metilovanje slobodnih masnih kiselina. Ekstrakti (50 mg) su rastvoreni u razblaženoj H₂SO₄ (10% V/V, 10 mL) i rastvori konstantno mešani tokom 3h na 40°C. Neutralizacija je izvršena ekvimolarnom količinom H₂CO₃ i metanol uparen do suva u vakuum uparivaču (Heidolph Hei-VAP Value rotacioni uparivač, Schwabach, Nemačka). Esterifikovane masne kiseline su iz suvog ostatka ekstrahovne n-heksanom (2 mL).

GC-MS analiza urađena je na Agilent Technologies 6890N – GC Sistemu kuplovanim sa Agilent 5973 Network masenim selektivnim detektorom i MSD ChemStation softverom (G 1701BA). HP-5 MS kolona (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) je korišćena za razdvajanje. Injektiviranje je vršeno u pulsnom “splitless” modu sa “splitless” vremenom od 1 min. Injekcioni volumen uzoraka bio je 1 μ L; korišćeni autosempler bio je Agilent 7683 Injector Series. Inicijalna temperatura (temperatura injektionog porta) bila je 260 °C. Kao gas-nosač korišćen je helijum (5.0, Messer, Bad Soden, Germany), sa konstantnim protokom od 1 mL/min. Inicijalna temperatura rerne bila 50 °C i održavana je 2 min. Temperatura je najpre povećana na 150 °C (temperaturnim ubrzanjem od 25 °C/min) i održavana 4 min, zatim na 250 °C (4 °C/min) i konačno na 300 °C (10 °C/min) i održavana 5 min. Maseni spektri su dobijeni u modu elektronskog udara. Korišćen je MS quad detektor; temperatura transferne linije bila je podešena na 280 °C, MS quad na 150 °C i MS izvor na 230 °C. Analiza je izvršena u “Full Scan” modu a brzina skeniranja bila je 6 skenova/min; opseg skeniranih masa bio je 50 – 600 m/z. Standardna smeša 37 metil-estara masnih kiselina (Supelco FAME Mix C4-C24) je korišćena za identifikaciju i kvantifikaciju masnih kiselina u uzorcima. Kvantifikovanje je vršeno poređenjem površina standarda i odgovarajućih komponenti uzoraka. Ergosterol je korišćen za konstrukciju standardne krive za proračunavanje količine ergosterola u uzorcima. Standardi su analizirani pod istim uslovima kao i uzorci. NIST05 MS Library baza podataka korišćena je za potvrdu identiteta analiziranih komponenti. Rezultati su predstavljeni kao masa odgovarajuće komponente po gramu ekstrakta (mg/g).

3.5.7. Određivanje lovastatina

Lovastatin je u uzorcima određen tečnom hromatografijom. Metanolni ekstrakti rastvoreni su u dimetil sulfoksidu (50 mg/mL) i filtrirani kroz membranski filter (BRAND 0.2 μ m, BrandTech Scientific, Inc., Essex, CT, SAD). Analiza je izvršena na HPLC sistemu Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific (Waltham, SAD) sa reverzno-faznom kolonom (Hypersil GOLD C18, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m). Eluiranje je vršeno mravljom kiselinom u vodi (0.1 %, v/v) (mobilna faza A) i mravljom kiselinom u acetonitrulu (0.1 %, v/v) (mobilna faza B). Eluiranje je vršeno na sledeći način: 0-10 minuta izokratski sa 75% B, zatim od 10-15 minuta gradijentno od 75% B do 100% B, 15-20 minuta 100% B, 20-20.1 minuta

gradijentno od 100% do 75% B i od 20.1-25 izokratski 75% B. Protok mobilne faze bio je 1 mL/min a kolona termostatorana na 30 °C. Detekcija je vršena UV detektorom na 238 nm. Lovastatin je korišćen za konstrukciju standardne krive.

3.5.8. Određivanje kojične kiseline

Kojična kiselina određivana je u metanolnim ekstraktima tečnom hromatografijom (Ariff i saradnici, 1996). Uzorci su rastvoreni u DMSO-u (50 mg/mL) i filtrirani kroz membranski filter (BRAND 0.2µm, BrandTech Scientific, Inc., Essex, CT, SAD). Analiza je izvršena na HPLC sistemu na Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific (Waltham, SAD) sa reverzno-faznom kolonom (Hypersil GOLD C18, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm). Eluiranje je vršeno izokratki, mobilnom fazom koja je predstavljala smešu fosfatnog pufera (50 mM, pH 3) i metanola (95:5 v/v), brzinom od 1 mL/min. Detekcija je vršena UV-detektorom na 265 nm. Kojična kiselina korišćena je za konstrukciju standardne krive.

3.5.9. UV-VIS spektroskopija

UV-VIS spektri polisaharidnih ekstrakata (0.01-2 mg/mL) snimljeni su na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan), u opsegu talasnih dužina 800-190 nm.

3.5.10. ATR - FTIR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom (FTIR) primenjena je na polisaharidne ekstrakte. Infracrveni spektri uzoraka (~2 mg) snimljeni su tehnikom atenuirane totalne refleksije (ATR), na spektrometru Nicolet iS10 (Thermoscientific, Sweden), u rasponu talasnih brojeva od 4000-400 cm⁻¹.

3.5.11. NMR spektroskopija

Nuklearna magnetna rezonanca primenjena je na polisaharidne ekstrakte, hidrolizate polisaharidnih ekstrakata (postupak opisan u poglavlju 3.5.2.2), kao i na vodorastvornu frakciju određenih metanolnih ekstrakata, u cilju ispitivanja tipa veza u polisaharidima, identifikacije mono- i disaharida kao i u pokušaju identifikacije drugih hemijskih grupa. Kao rastvarač je korišćena deuterisana voda (D₂O), osim za vodonerastvornu frakciju hidrolizata polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela *H. utrififormis* koja je rastvorena u DMSO-d₆ sa dodatkom LiCl (6%), uz zagrevanje (100 °C). Polisaharidni ekstrakti i vodorastvorna frakcija njihovih hidrolizata rastvoreni su u koncentraciji od 10 mg/mL,

vodonerastvorna frakcija hidrolizata polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela *H. utriformis* u koncentraciji od 2 mg/mL, a metanolni ekstrakti u koncentraciji od 50 mg/mL, nakon čega su uzorci centrifugirani (5000 rpm, 10 min, Eppendorf 5430 R, Hamburg, Nemačka). Precipitat je odbačen a supernatant korišćen u analizi. ^{13}C i ^3H NMR spektri su snimljeni na 301 K na Bruker Ascend 400 spektrometru (Billerica, MA, SAD), na 100.6 MHz, sa spektralnom širino od 24.04 kHz i 16000 skenova. NMR podaci su obrađeni koristeći TopSpin 3.2 i MestReNova 6.0.2. softver.

3.5.12. Gel-ekskluziona hromatografija

Gel-ekskluziona hromatografija primenjena je na prečišćene polisaharidne ekstrakte radi utvrđivanja homogenosti uzoraka, tj. razdvajanja/određivanja broja polisaharidnih/makromolekulskih frakcija različitih molekulskih masa. Razdvajanje je vršeno na ÄKTA™ pure hromatografskom sistemu (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD) sa Superdex 75 kolonom. Uzorci (20 mg) eluirani su vodom (1 ml/min) i sakupljeno je 40 frakcija od po 4 mL. Vršeno je kontinuirano merenje apsorbance na 254 nm (Pharmacia Biotech LKB Uvicord III detektor, Uppsala, Švedska) a u sakupljenim frakcijama je određivano prisustvo šećera ranije opisanom, fenol-sumpornom metodom (poglavlje 3.4.2.1.).

3.5.13. Elementalna analiza

Elementalna analiza, odnosno sadržaj ugljenika, vodonika, azota i sumpora (C, H, N, S) određen je uređajem VARIO EL III elementalnim analajzerom (Elementar Analysensysteme GmbH, Langenselbold, Nemačka).

3.6. Biološka karakterizacija ekstrakata

3.6.1. Antioksidativna aktivnost

3.6.1.1. ABTS antiradikalna aktivnost

Sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ekstrakata je testirana na ABTS radikalu, po proceduri opisanoj od strane Re i saradnika (1999), adaptiranoj izvođenju u mikropločama sa 96 bunara. Vodeni rastvor $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (3.8%, 88 μL) pomešan je sa vodenim rastvorom ABTS-a (0.38%, 5 mL) i reakciona smeša ostavljena oko 16h u frižideru da bi došlo do nastanka ABTS radikala. Radni rastvor pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora

100x metanolom (za ispitivanje aktivnosti metanolnih ekstrakata), odnosno vodom (za ispitivanje aktivnosti polisaharidnih ekstrakata), tako da je apsorbanca rastvora na 734 nm bila oko 0.700 ($A_{734nm}=0.700\pm 0.020$). Metanolni ekstrakti rastvoreni su u metanolu, a polisaharidni u vodi. Serijska razblaženja uzoraka (20 μ L, 0.0625-4 mg/mL) pomešana su sa rastvorom ABTS radikala (200 μ L) i apsorbanca (A_s) je očitana nakon 20 min na spektrofotometru na 630 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD). Smeša rastvarača (20 μ L) i rastvora ABTS radikala (200 μ L) predstavljala je kontrolu (A_c). Za svaku koncentraciju uzoraka izračunat je procenat neutralizacije ABTS radikala koristeći sledeću formulu: $(A_c - A_s)/A_c \times 100$. Rezultati su predstavljeni kao koncentracija uzoraka koja neutrališe 50% ABTS radikala (EC_{50} , mg/mL). Kao standard je korišćena askorbinska kiselina.

3.6.1.2. CUPRAC redukciona moć

Sposobnost ekstrakata da redukuju metalne jone ispitana je na jonima bakra (Cu^{2+}), metodom CUPRAC (Özyürek i saradnici, 2011). Rastvori $CuCl_2$ (50 μ L, 10 mM), neokuproina (50 μ L, 7.5 mM), CH_3COONH_4 pufer (60 μ L, 1 M, pH 7.0) i serijska razblaženja uzoraka pripremljena u metanolu (metanolni ekstrakti) ili vodi (polisaharidni ekstrakti) (40 μ L, 0.156-10 mg/mL) dodati su redom u mikroploče sa 96 bunara; reakcione smeše su inkubirane 1h u vodenom kupatilu na 30°C. Apсорbanca je merena na spektrofotometru, na 450 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD). Trolox je korišćen za konstrukciju standardne krive (0.078-2.5 mM) a aktivnost uzoraka je izražena kao ekvivalentna aktivnost Trolox-a (mmol Trol. eq.).

3.6.1.3. Test inhibicije oksidativne degradacije β -karotena

Sposobnost ekstrakata da potencijalno spreče (per)oksidaciju masnih kiselina u biološkim membranama ispitana je korišćenjem model-sistema linoleinska kiselina/ β -karoten, po proceduri opisanoj od strane Barros saradnika (2007), a prilagođene mikropločama sa 96 bunara. Hloroformni rastvor β -karotena (2 mL, 0.2 mg/mL) uparen je do suva u vakuum-uparivaču. Linoleinska kiselina (40 mg), TWEEN 80 (400 mg) i voda u porcijama (100 mL) dodati su da bi se napravila emulzija. Ekstrakti su rastvoreni u metanolu (metanolni) ili u vodi (polisaharidni). Emulzija (250 μ L) je pomešana sa serijskim razblaženjima

ekstrakata (20 μ L, 0.156-10 mg/mL). Kao kontrola korišćena je smeša emulzije i odgovarajućeg rastvarača. Apsorbance kontrole i uzoraka su očitavane odmah nakon pripreme (A_{k0} i A_{u0} , respektivno) i nakon inkubacije na 50 °C u vodenom kupatilu tokom 1h (A_{k1} i A_{u1}), na spektrofotometru, na 470 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Winoosci, VT, SAD). Procenat inhibicije izbeljivanja β -karotena izračunat je za svaku koncentraciju uzorka, prema formuli: $[(A_{c0}-A_{c1})-(A_{s1}-A_{s0})]/(A_{c0}-A_{c1}) \times 100$, a rezultati su predstavljeni kao koncentracija uzorka koja inhibira izbeljivanje 50% β -karotena (EC_{50} , mg/mL). Kao standard je korišćena askorbinska kiselina.

3.6.2. Inhibicija tirozinaze

Mogućnost inhibicije tirozinaze ispitana je na metanolnim ekstraktima, prema proceduri datoj od strane Alam i saradnika (2012), s nekim modifikacijama. Tirozinaza (46 U/mL) i L-DOPA (2.5 mM) su rastvoreni u fosfatnom puferu (0.067M, pH 6.8). Razblaženja uzoraka (40 μ L, 0.156-5 mg/mL) su pripremljena u DMSO/fosfatnom puferu (5% v/v, 0.067M, pH 6.8). Reagensi i uzorci su pomešani u mikropločama sa 96 bunara na sledeći način:

A: fosfatni pufer (120 μ L), enzim (40 μ L), L-DOPA (40 μ L);

B: fosfatni pufer (160 μ L), L-DOPA (40 μ L);

C: fosfatni pufer (80 μ L), uzorak (40 μ L), tirozinaza (40 μ L), L-DOPA (40 μ L)

D: fosfatni pufer (120 μ L), uzorak (40 μ L), L-DOPA (40 μ L).

Mikroploče su inkubirane 10 min pre dodavanja L-DOPA-e i još 20 min nakon dodavanja. Apsorbanca je očitavana na spektrofotometru, na 490 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Winoosci, VT, SAD). Inhibicija (%) je izračunata za svaku koncentraciju uzoraka koristeći formulu: $[(A-B) - (C-D)]/(A-B) \times 100$; rezultati su predstavljeni kao koncentracija uzoraka koja inhibira 50% enzimske reakcije (IC_{50} , mg/mL) a kojična kiselina je korišćena kao pozitivna kontrola.

3.6.3. Inhibicija acetilholinesteraze i butirilholinesteraze

Mogućnost inhibicije acetilholinesteraze (AChE) i butirilholinesteraze (BuChE) ispitana je na metanolnim uzorcima prema proceduri datoj od strane Fadaeinasab i saradnika (2013), sa malim izmenama. Acetilholinesteraza, odnosno butirilholinesteraza (0.09 U/mL), acetilholinjodid (AChI), odnosno butirilholinjodid (BuChI) (0.014 M), DTNB (0.01 M) i rastvori uzoraka (0.156-5 mg/mL) pripremljeni su u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 8) i pomešani u mikropločama sa 96 bunara po sledećoj proceduri:

A: fosfatni pufer (160 μ L), AChE/BuChE (20 μ L);

B: fosfatni pufer (180 μ L);

C: fosfatni pufer (140 μ L), AChE/BuChE (20 μ L), uzorak (20 μ L);

D: fosfatni pufer (160 μ L), uzorak (20 μ L);

Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi tokom 15 min, uz lagano mešanje, a zatim su dodati rastvori DTNB (10 μ L) i AChI, odnosno BuChI (10 μ L). Inkubacija je nastavljena još 40 min a zatim je očitana apsorbancija na spektrofotometru, na 405 nm (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD). Procenat inhibicije enzimske reakcije za svaku koncentraciju uzoraka izračunat je prema sledećoj formuli: $[(A-B) - (C-D)]/(A-B) \times 100$; rezultati su izraženi kao koncentracija uzoraka koja inhibira 50% enzimske reakcije (IC_{50} , mg/mL), a galantamin je korišćen kao pozitivna kontrola.

3.6.4. Inhibicija HMG-CoA reduktaze

Mogućnost inhibicije HMG-CoA reduktaze je testirana na metanolnim ekstraktima korišćenjem komercijalnog kita (HMG-CoA Reductase Assay Kit, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa nešto izmenjenom procedurom. Serijski rastvori ekstrakata su pripremljeni u 10% DMSO vodenom rastvoru (0.313-5 mg/mL), dok su pufer, enzim (1.5 U/mgP), koenzim i supstrat pripremljeni po uputstvu proizvođača. Reagensi i uzorci su pomešani po sledećoj proceduri:

A: pufer (346 μ L), enzim (2 μ L), supstrat (24 μ L), koenzim (8 μ L), 10% DMSO (20 μ L);

B: pufer (348 μ L), supstrat (24 μ L), koenzim (8 μ L), 10% DMSO (20 μ L);

C: pufer (346 μ L), enzim (2 μ L), supstrat (24 μ L), koenzim (8 μ L), uzorak (20 μ L).

Apsorbanca reakcionih smeša merena je odmah i nakon inkubacije na 37 °C tokom 10 min, spektrofotometru, na 340 nm (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan). Procenat inhibicije enzimske reakcije za svaku koncentraciju uzoraka izračunat je na osnovu sledeće formule:

$$\{[(A_0-A_{10})-(B_0-B_{10})]-[(C_0-C_{10})-(B_0-B_{10})]\}/[(A_0-A_{10})-(B_0-B_{10})],$$

gde brojevi u supskriptu predstavljaju apsorbance na početku (“0”) i na kraju reakcije (“10”). Rezultati su izraženi kao koncentracija uzoraka koja inhibira 50% enzimske reakcije (IC₅₀, mg/mL), a pravastatin je korišćen kao standard.

3.6.5. Inhibicija α -glukozidaze

Mogućnost inhibicije α -glukozidaze, enzima koji vrši hidrolizu terminalnih neredukujućih $\alpha(1\rightarrow4)$ vezanih glukoznih jedinica oligo- i polisaharida, ispitana je prethodno opisanom metodom na metanolnim ekstraktima (Popović-Đorđević i saradnici, 2017).

Rastvor enzima (400 mU/mL) i supstrata, p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (1.5 mg/mL) pripremljeni su u fosfatnom puferu (0.1M, pH=6.8), dok su serijski rastvori ekstrakata (0.156-5 mg/mL) pripremljeni u smeši DMSO (10%) i fosfatnog pufera (0.1M, pH=6.8). Rastvori enzima (50 μ L) i uzoraka (50 μ L) inkubirani su na 37 °C tokom 15 min. U reakcione smeše dodat je rastvor supstrata (50 μ L) i očitana je apsorbanca na spektrofotometru (BioTek ELx808 microplate reader, Winooski, VT, SAD) na 405 nm (A₁). Inkubacija je nastavljena još 15 min nakon čega je ponovo izmerena apsorbanca na istoj talasnoj dužini (A₂). Kao pozitivna kontrola korišćena je smeša DMSO/fosfatnog pufera (10%, 50 μ L), rastvora enzima (50 μ L) i supstrata (50 μ L). Procenat enzimske inhibicije izračunat je prema sledećoj formuli:

$$[(A_{2k}-A_{1k})-(A_{2u}-A_{1u})]/(A_{2k}-A_{1k})*100,$$

gde su A_{1u} i A_{2u} apsorbance uzoraka, a A_{1k} i A_{2k} apsorbance kontrole.

Akarboza je korišćena kao pozitivna kontrola.

3.6.6. Inhibicija α -amilaze

Mogućnost inhibicije α -amilaze, enzima odgovornog za hidrolizu polisaharida vezanih alfa vezom, ispitana je na metanolnim ekstraktima (Yousefi & saradnici, 2013). Rastvor α -amilaze (2 U/mL) pripremljen je u vodi. Rastvor supstrata, skroba (1%) pripremljen je zagrevanjem u fosfatnom puferu (20 mM, pH=6.9) sa dodatkom NaCl (6.7 mM). Dinitrosalicilna kiselina (DNS, 1%) pripremljena je u rastvoru NaOH (0.4 M), sa dodatkom $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (12%). Serijski rastvori uzoraka (0.156-5 mg/mL) pripremljeni su u smeši DMSO (10%) i vode. Rastvor uzoraka (800 μL) mešan je najpre sa rastvorom enzima (400 μL) u staklenim epruvetama i vršena je inkubacija na sobnoj temperaturi tokom 10 min. Zatim je dodat rastvor skroba (400 μL) i vršena inkubacija na 37 °C, u vodenom kupatilu. Nakon 10 min smešama je dodat rastvor DNS-a (800 μL) i inkubacija je nastavljena u ključalom vodenom kupatilu još 10 min. Nakon hlađenja, apsorbance su merene na 520 nm, na spektrofotometru (Shimadzu UV-1800, Kyoto, Japan), u odnosu na slepu probu koja se sastojala od vodenog rastvora DMSO (10%, 800 μL), vode (400 μL), fosfatnog pufera (20 mM, pH=6.9, sa dodatkom NaCl, 6.7 mM, 400 μL) i rastvora DNS-a (800 μL). Za određivanje maksimalne enzimske reakcije korišćena je smeša rastvora enzima, supstrata, DNS reagensa i vodenog rastvora DMSO, bez uzoraka. Inhibicija je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$(A_e - A_u) / A_e * 100,$$

gde je A_e apsorbance maksimalne jačine enzima a A_u apsorbance u prisustvu uzorka.

Akarboza je korišćena kao pozitivna kontrola.

3.6.7. Antimikrobna aktivnost

Minimalne mikrobicidne koncentracije (MMK), odnosno minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne/fungicidne koncentracije (MBK/MFK) uzoraka određene su mikrodilucionom metodom u skladu sa smernicama datim od strane CLSI (2005) a prema proceduri opisanoj od strane Klaus i saradnika (2015).

Antimikrobna aktivnost je testirana na 5 mikrobnih sojeva "American Type Culture Collection" (ATCC, Manassas, VA, SAD): *Staphylococcus aureus* 6538, *Enterococcus*

faecalis 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Escherichia coli* 25922, *Candida albicans* 10259 kao i na kliničkom izolatu meticilin-rezistentne stafilokoke, *Staphylococcus aureus* (MRSA), dobijenom iz Gradskog instituta za Javno zdravlje (Beograd, Srbija). Antimikrobna analiza je izvedena u mikropločama sa 96 bunara (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Ekstrakti su rastvoreni u vodenom rastvoru DMSO-a (5% v/v), u rasponu koncentracija od 0.01 do 20 mg/mL. Gustina mikrobnih suspenzija podešena je na 10^5 CFU (“*colony forming units*” – jedinica koje formiraju kolonije, tj. mikroba) upotrebom turbidimetra a zatim je u bakterijske suspenzije dodat indikator rasta, TTC (0.0075%). Uzorci (50 μ L) i suspenzije (50 μ L) su dodati u svaki bunar i dobro promućkani; kao pozitivna kontrola rasta korišćena je smeša suspenzija i DMSO vodenog rastvora, u istim odnosima. Eksperiment je urađen u duplikatu. Bakterijski sojevi su inubirani 24h na 37 °C, dok je kandida inkubirana 48h na 30 °C. Koncentracije uzoraka pri kojima nije došlo do vidljivog rasta mikroorganizama (odsustvo crvene boje kod bakterijskih sojeva odnosno odsustvo vidljivih kolonija kod kandidate) uzete su kao MIK vrednosti. MBK/MFK vrednosti su određivani serijskom subkultivacijom uzoraka uzetih iz svakog bunara bez vidljivog rasta mikroorganizama na odgovarajući čvrsti medijum (Müller Hinton agar za bakterijske sojeve i sladni agar za kandidu); najniže koncentracije uzoraka pri kojim nije došlo do vidljivog porasta kolonija mikroorganizama nakon ponovljenog zasejavanja i inkubacije uzete su za MBK/MFK vrednosti. Amoksicilin je korišćen kao standard za bakterijske sojeve (0.05-50 μ g/mL), a flukonazol za *C. albicans* (0.1-100 μ g/mL). Sve probe vršene su u duplikatu, a MIK i MBK/MFK vrednosti određivane strožim kriterijumom, odnosno za inhibitornu koncentraciju uzimana je ona pri kojoj nije došlo do vidljivog porasta mikroorganizama u oba bunara.

3.6.8. Citotoksična/antitumorska aktivnost

3.6.8.1. Priprema uzoraka

Osnovni rastvori metanolnih ekstrakata pripremljeni su u DMSO-u (150 mg/mL) i kasnije po potrebi razblaživani kompletnim hranljivim medijumom (RPMI-1640 bez fenol-crvenog), s dodatkom L-glutamina (3 mM), streptomicina (100 μ g/mL), penicilina (100

IU/ml), termički-inaktiviranog FBS-a (10%) i HEPES-a (25 mM). pH medijuma podešen je na 7.2 rastvorom NaHCO₃.

3.6.8.2. Priprema tumorskih ćelijskih linija

Ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i humanog karcinoma dojke (MDA-MB-453) su kultivisane kao monosloj u kompletnom hranljivom medijumu, na 37 °C, u vlažnoj atmosferi vazduha sa 5% CO₂. Za rast ćelija MDA-MB-453, kao i u svim eksperimentima, kompletni hranljivi medijum je obogaćen glukozom (1.11 g/L).

3.6.8.3. Priprema mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC)

PBMC su odvojene od heparinizirane krvi (dobijene od zdravih volontera) centrifugiranjem u gradijentu gustine (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway). Ćelije prikupljene sa interfeze (površine između uzorka i Lymphoprep-a) su isprane 3x Haemacel-om (vodeni rastvor s dodatkom jona Na⁺ (145 mM), K⁺ (5.1 mM), Ca²⁺ (6.2 mM), Cl⁻ (145 mM) i gelirajućih polimera (35 g/L), pH 7.4), a potom su prebrojane i resuspendovane u hranljivom medijumu sa FBS-om (10%).

3.6.8.4. Tretman tumorskih ćelijskih linija

HeLa (2000 ćelija po bunaru) i MDA-MB-453 (3000 ćelija po bunaru) su zasejane u mikroploče sa 96 bunara (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka). Nakon 20h, 4 koncentracije ekstrakata u kompletnom hranljivom medijumu su dodate ćelijama (0.3125-2.5 mg/mL), osim kontrolnih, kojima je dodat čist hranljivi medijum.

3.6.8.5. Tretman mononuklearnih ćelija periferne krvi (PBMC)

PBMC su zasejane u mikroploče sa 96 bunara (150000 ćelija po bunaru), u hranljivom medijumu ili hranljivom medijumu obogaćenom fitohemaglutininom (PHA, 5 µg/mL). Nakon 2h, 5 različitih koncentracija uzoraka je dodato u bunare sa ćelijama (0.1875-3 mg/mL).

3.6.9. Imunomodulatorna aktivnost polisaharidnih ekstrakata

Ekstrakti su rastvoreni u vodi (10 mg/mL) i sterilisani u autoklavu (100 °C, 30 min).

THP-1 i U937 ćelije zasejane su u ploče sa 24 bunara (4x10⁵/mL/bunaru, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka), u kompletnom RPMI 1640 medijumu koji je sadržao FBS (10%),

L-glutamin (1mM) i smešu antibiotika (gentamicin, penicilin i streptomycin, 1%). Da bi se indukovala diferencijacija makrofaga, ćelije su tretirane sa PMA (50 nM) tokom 48h, nakon čega je usledila zamena kompletnog medijuma svežim. Nakon 24h, u bunare su dodati uzorci u različitim koncentracijama (20-200 µg/mL) i inkubacija ćelija je nastavljena još 24h. Dodatno, nekim kulturama dodati su lipopolisaharid (LPS) iz bakterije *Escherichia coli* (100 ng/mL) i humani rekombinantni interferon γ (INF γ), 3h nakon dodavanja ekstrakata. Nakon inkubacije, sakupljen je supernatant bez ćelija, centrifugiran (2000 rpm, 10 min), a potom je zamrznut i čuvan na -40 °C pre analize citokina. Vijabilnost ćelija je određivana Tripan plavo ekskluzionim testom i svuda je bila preko 80%.

Nivoi citokina su analizirani u supernatantu diferenciranih pa potom tretiranih THP-1 i U937 ćelija korišćenjem specifičnih ELISA testova (R&D systems, Minneapolis, MN, SAD) ili fluorescentnim imunočesticama (Bender Med-Systems, Beč, Austria) protočnom citometrijom i koncentracije su izračunate na osnovu standardnih kriva konstruisanih za svaki od ispitivanih citokina, prema protokolu datom od strane proizvođača.

3.7. Inkapsulacija polisaharidnih ekstrakata u lipozome

3.7.1. Priprema lipozoma

Lipozomi su pripremljeni prolipozomnom metodom (Isailović i saradnici, 2013). Fosfolipon G (250 mg), etanol (400 µL), uzorak (10 mg) i voda (750 µL) su pomešani u čaši, pomoću magneta, na magnetnoj mešalici (AMTAST Basic, Lakeland, FL, SAD), brzinom od 1500 rpm, na temperaturi od 70 °C. Pošto je dobijena homogena smesa, etanol je otparen, i dalje uz intenzivno mešanje. Smesa je ohlađena u frižideru i nakon toga u nju dodata ohlađena voda (2 °C), u malim porcijama, tokom 10 min, do ukupne zapremine od 5 mL, uz intenzivno mešanje na 1500 rpm. Mešanje je nastavljeno tokom 30 min na 750 rpm, nakon čega su su dobijeni lipozomi čuvani u frižideru.

3.7.2. Karakterizacija lipozoma

3.7.2.1. Merenje veličine i Zeta-potencijala lipozoma

Veličina i Zeta-potencijal lipozoma određivani je na uređaju Nano-ZS Zetasizer (Malvern, Malvern, Velika Britanija). Uzorci su za potrebe analize razblaživani vodom 1000x.

3.7.2.2. *Određivanje stepena inkapsulacije*

Nerazblaženi rastvor lipozoma (2 mL) je centrifugiran (Eppendorf 5930 R, Hamburg, Nemačka) pri sniženoj temperaturi (4 °C), tokom 40 min, na 17000 rpm. Dobijeni bistri supernatant je korišćen za određivanje količine neinkapsuliranih polisaharida, uz pretpostavku da se ostatak polisaharida nalazi u lipozomima, obzirom na to da su rastvori uzoraka stabilni pri koncentraciji od 2 mg/mL na T=4 °C. Fenol-sumporna metoda (opisana u 3.5.2.1.) korišćena je za određivanje polisaharida u supernatantu za sva tri uzorka, na osnovu sadržaja ukupnih šećera u supernatantu i uzorcima, dok je za ekstrakte mladih i zrelih plodonosnih tela korišćen i metod direktne spektrofotometrije (opisane u 3.5.8.), pri čemu su najpre konstruisane standardne krive zavisnosti koncentracije uzoraka (0.005-2 mg/mL) i apsorbance na 254 nm (Shimadzu UV-1800, *Kyoto*, Japan). Stepenn inkapsulacije izračunat je na osnovu sledeće formule:

$$(m_u - m_s) / m_u * 100,$$

gde su m_u i m_s ukupna masa ekstrakta krišćena u pripremi lipozoma i masa ekstrakta u supernatantu, redom.

3.7.3. **Studija otpuštanja aktivnih komponenti iz lipozoma**

Studija otpuštanja polisaharida iz lipozoma vršena je u Francovoj difuzionoj ćeliji (PermeGear, Inc, *Hellertown*, PA, SAD) upotrebom semipermeabilnih celuloznih membrana (Whatman OE 66 0.2 μ m, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Membrane su najpre inkubirane tokom 40 min u vodi, na sobnoj temperaturi. Suspenzija lipozoma (2.5 mL) je zatim naneta na membranu i vršeno je uzorkovanje iz akceptorske ćelije u određenim intervalima tokom 24h. Uzimano je 0.4 mL rastvora iz donorske komore i ista zapremina vode vraćana u sistem. Paralelno je praćena i brzina difuzije kroz membranu rastvora neinkapsuliranih uzoraka, iste koncentracije (2 mg/mL). Količina otpuštenih ekstrakata je određivana fenol-sumpornom metodom za sve uzorke (opisanoj u poglavlju 3.5.2.1), kao i direktnom spektrofotometrijom za ekstrakte mladih i zrelih plodonosnih tela (opisanoj u poglavlju 3.5.9).

3.8. Statistička analiza

Svi eksperimenti su rađeni u triplikatu, osim ako nije drugačije naglašeno. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti sa standardnim devijacijama. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA ONE-WAY) u kombinaciji sa Tuckey's HSD testom korišćena je za utvrđivanje statistički značajne razlike ($p=0.05$), gde je to bilo potrebno. Statistička analiza urađena je u programu OriginPro 8 dok je MS Excel (Microsoft Office 2010 Professional) korišćen za izračunavanje kvadratnih koeficijenata korelacije (R^2).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Analiza metanolnih ekstrakata

4.1.1. Prinos ekstrakcije

Prinosi metanolnih ekstrakata dati su u tabeli 4.1. Količina ekstrakata dobijenih od iste polazne mase droge najveća je u slučaju micelijuma, nešto manja u slučaju mladih plodonosnih tela i najmanja u slučaju zrelih plodonosnih tela, odnosno zrele glebe (u nastavku: zrela plodonosna tela). Odnos droga:ekstrakt (DER, eng. „*Drug:Extract Ratio*”) je vrlo sličan za isti stadijum razvoja različitih vrsta puhara. Iako je gleba zrelih puhara vrlo fine, praškaste konzistencije, prinosi ekstrakcije su manji, jer veliki deo mase zrele glebe čine spore debelih ćelijskih zidova; takođe, autoliza kroz koju plodonosna tela prolaze neminovno dovodi do hidrolize mnogih jedinjenja.

Uvedene su sledeće skraćenice za ekstrakte/materijal korišćen za dobijanje ekstrakata; uz početna slova latinskih imena dodate su odrednice “MIC” za micelijum, “I” za mlada plodonosna tela (od latinskog “*immaturus*”, nezreo) i “M” za zrela plodonosna tela (od latinskog “*maturus*”, zreo):

HUMIC – *Handkea utriiformis*, micelijum

HUI – *Handkea utriiformis*, mlada plodonosna tela

HUM – *Handkea utriiformis*, zrela plodonosna tela

HEI – *Handkea excipuliformis*, mlada plodonosna tela

HEM - *Handkea excipuliformis*, zrela plodonosna tela

VPI – *Vascellum pratense*, mlada plodonosna tela

VPM – *Vascellum pratense*, zrela plodonosna tela

Tabela 4.1. Prinosi metanolne ekstrakcije

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
DER ¹	4.3:1	4.7:1	6.2:1	4.6:1	6.1:1	5.1:1	5.9:1

¹Odnos droga:ekstrakt (eng. “*Drug:Extract Ratio*”)

4.1.2. Hemijska karakterizacija ekstrakata

Proteini su u svim ekstraktima prisutni u tragovima, uglavnom ispod jednog procenta (tabela 4.2), što je i očekivano za metanolne ekstrakte. U slučaju *H. utriformis* sadržaj proteina je isti i u ekstraktima dobijenim iz mladih i iz zrelih plodonosnih tela, dok je kod *H. excipuliformis* i *V. pratense* sadržaj proteina nešto veći u ekstraktima mladih plodonosnih tela. Ako se uzme u obzir i DER, ova razlika se dodatno povećava. Ipak, kako se radi o veoma malim količinama proteina u uzorcima ne mogu se doneti zaključci o eventualnom uticaju autolize na sadržaj proteina. Micelijum *H. utriformis* (u nastavku: micelijum) sadrži najmanju količinu proteina u metanolnom ekstraktu. Treba napomenuti da se metodom po Bradford-u detektuju samo polipeptidni molekuli velike molekulske mase (Sapan i saradnici, 1999). i da su drugi peptidi manje molekulske mase verovatno prisutni u uzorcima. Druge metode za određivanje proteina, odnosno ukupnih peptida (Biuretska metoda, npr.) nisu adekvatne pošto se baziraju na redukciji bakra, a ekstrakti sadrže i druge molekulske grupe sa potencijalnom redukcijom sposobnošću.

Šećeri čine značajan procenat ekstrakta micelijuma, kao i značajan procenat ekstrakata mladih puhara; u zrelih puharama nalaze se u manjem procentu, s izuzetkom *H. utriformis*, ali kod sve tri vrste sadržaj šećera se smanjuje nakon autolize (tabela 4.2). Šećeri čine preko 50% ekstrakta micelijuma, od čega je oko 40% glukoza i 50% trehaloza. Glukoza se nalazi u hranljivom medijumu koji se koristi za gajenje micelijuma pa dolazi do njene aktivne akumulacije u micelijumu. Trehaloza je gljivlji disaharid koji gljive proizvode da bi preživjele stresne uslove – periode bez vlage, kao i niske temperature. Ona omogućava očuvanje makromoleula od vitalnog značaja za gljivu, proteina, lipidnih membrana itd, pružajući potporu ovim makromolekulima/strukturama i sprečavajući njihovu denaturaciju nakon gubitka vode ili pri smrzavanju (Wiemken, 1990). Ovaj disaharid je zato našao

primenu u industriji, medicini i nauci kao krioprotektant pri smrzavanju i liofilizaciji uzoraka koji sadrže osetljive molekule . Zbog svoje sposobnosti vezivanja vode, trehaloza je našla primenu i u kozmetici (Ohtake, 2011, Dey & De, 2015). Micelijum *H. utriformis* se pokazao kao odličan proizvođač ovog šećera, a obzirom na to da je produkcija ovog šećera odgovor na stres, verovatno je moguće, manipulacijom uslova gajenja, dobiti i veće prinose. Pri metanolnoj ekstrakciji, nakon uparavanja i koncentrisanja dolazi do kristalizacije ovog šećera i lakog fizičkog odvajanja od ostatka ekstrakta, kao i mogućnosti daljeg lakšeg prečišćavanja. Trehaloza čini i gotovo celokupnu šećernu frakciju ekstrakata mladih plodonosnih tela, a u ekstraktima zrelih puhara nalazi se u značajno manjoj količini; pokazano je da se trehaloza aktivno akumulira u gljivljim strukturama u fazi mirovanja – pre svega sporama – iako glebu čini sporonosna masa, moguće je da zbog debljine/strukture zidova spora ne dolazi do ekstrakcije ovog šećera. Druga mogućnost je da se trehaloza aktivno razgrađuje tokom autolize.

Od prostih šećera u ekstraktima zrelih puhara prisutan je i aminošećer *N*-acetilglukozamin, gradivna jedinica gljivljeg polisaharida hitina, koji ulazi u sastav ćelijskog zida gljiva. Ovaj šećer je proizvod hitinolize (Lim & Choi, 2009), pošto nije detektovan u ekstraktima mladih puhara. Kako se ne nalazi uobičajeno u slobodnom stanju, njegovo prisustvo je potvrđeno i NMR-om, prisustvom karakterističnih signala u ¹³C spektru (karbonilni δ 174.54, anomerni δ 94.99 i 90.90, ugljenik metal grupe acil grupe δ 22.23 i 21.96). Zrele puhare to čini retkim izvorom slobodnog oblika ovog aminošećera. *N*-acetilglukozamin ima višestruku ulogu i u ljudskom organizmu, pre svega kao gradivna jedinica hijaluronske kiseline, glikozaminoglikana vezivnog tkiva. Zbog toga se dijetetski suplementi koji sadrže *N*-acetilglukozamin koriste u terapiji stanja koja pogađaju vezivna tkiva, kao što je artritis. Zbog značaja hijaluronske kiseline u održavanju zdravlja i integriteta kože predložena je i primena *N*-acetilglukozamina u tretmanu rana, ali i u kozmetičke svrhe, u tretmanu bora (Pedrali i saradnici, 2015). Uz to, pokazano je da *N*-acetilglukozamin posredno inhibira tirozinazu, sprečavajući glikozilaciju ovog enzima, a samim tim i njegovu aktivaciju, čime dovodi do smanjene produkcije melanina (Ortonne & Bissett, 2008). Zbog toga je predloženo da *N*-acetilglukozamin može da ima primenu i u tretmanu hiperpigmentacije

koja može da nastane iz više razloga, npr. zbog foto-senzitivnosti novonastalog epitela ili pak zbog starenja kože (“staračke pege”) (Pedrali i saradnici, 2015).

Da je hitinoliza u puharama potpuna, *N*-acetilglukozamin bi se nalazio u većoj količini u zreloj glebi, jer su studije pokazale da hitin čini značajan procenat gljivljeg tkiva (Nitschke et al., 2011); međutim ovaj aminošećer je detektovan u *H. excipuliformis* i *V. pratense* u relativno maloj količini (5,34, odnosno 10,24 mg/g ekstrakta, redom), a u nešto većoj količini je prisutan u *H. utriformis* (26 mg/g ekstrakta), što je manje od 0.5% suve mase u sva tri slučaja. Moguće je da je hitinoliza nepotpuna, tj. da dovodi do formiranja kako monomernih, tako i oligomernih jedinica *N*-acetilglukozamina, ili pak da se hitin u većoj meri nalazi u peridijumu i subglebi. Takođe, moguće je da se i hitinoliza ne odvija u istom obimu kod svih vrsta puhara i da ona zavisi od više faktora, unutrašnjih (interspecijalnih) i spoljašnjih (klimatski/vremenski faktori) i da samim tim količina slobodnog *N*-acetilglukozamina varira u zrelim puharama. Eventualno prisustvo glukozamina nije potvrđeno NMR spektroskopijom.

Drugi prosti šećeri nisu detektovani u metanolnim ekstraktima. I dok se ukupni sadržaj neutralnih šećera određen fenol-sumpornom metodom dobro poklapa sa količinom šećera određenom tečnom hromatografijom kod ekstrakta micelijuma i mladih plodonosnih tela, to nije slučaj sa ekstraktima zrelih puhara; ovi ekstrakti bi mogli da sadrže i oligosaharide (oligoglukane npr.) koji bi bili proizvod nepotpune autolize drugih gradivnih polisaharida ćelijskog zida, sem hitina, kao što su ranije više puta pominjani glukani ili manani. Eventualno prisustvo *N*-acetilglukozaminskih oligomera bilo bi od posebnog značaja jer je pokazano da ovakvi oligosaharidi poseduju imunostimulišuću i antitumorsku aktivnost (Harish i saradnici, 2007).

Prisustvo trehaloze i *N*-acetilglukozamina potvrđeno je i NMR-om, odnosno detektovano je prisustvo odgovarajućih signala u koncentrisanoj vodorastvornoj frakciji metanolnih ekstrakata.

Ukupni fenoli određivani su upotrebom Folin-Ciocalteu reagensa i verovatno predstavljaju različite molekulske klase (tabela 4.3). Sadržaj fenolnih komponenti kreće se od ~3-20

mgGAE/g ekstrakta i sličan je onom određivanom u drugim gljivama (Butkhup et al., 2018, Barros i saradnici, 2009). Generalno, ekstrakti zrelih puhara, koji su tamniji, sadrže nešto više fenolnih jedinjenja, što je možda iznenađujuće s obzirom na to da puhare prolaze kroz autolizu. Ipak, Lim & Choi (2009) su utvrdili da se prilikom dizintegracije ćelijskog zida prilikom autolize jedne vrste gnojištarke, *Coprinellus congregates* (Psathyrellaceae) povećava raspoloživost fenolnih komponenti asociranih sa šećerima ćelijskim zidom. Razlika u sadržaju fenolnih komponenti naročito je izražena kod ekstrakta tri različita stadijuma razvoja *H. utriformis*. Kod druge dve vrste, kada se uzme u obzir razlika u prinosima, praktično i ne postoji razlika u ukupnim fenolima u polaznom materijalu, samo u njihovoj koncentraciji u ekstraktima. Ekstrakt micelijuma sadrži najmanje ovih jedinjenja (3.21 mgGAEs/g ekstrakta), dok ekstrakti zrelih karpofora *H. utriformis* i *V. pratense* sadrže najviše (~20 mgGAEs/g ekstrakta, bez statistički značajne razlike). Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima mladih karpofora (11.22-13.67 mgGAEs/g ekstrakta) skoro je identičan sadržaju fenola koje su Barros i saradnici (2009) odredili za metanolne ekstrakte mladih karpofora srodnih vrsta puhara, *L. molle* i *L. perlatum* (11.48 i 10.57 mgGAEs/g ekstrakta, redom). S obzirom na to da se među poznatim gljivljim pigmentima, nalazi mnogo jedinjenja fenolne strukture (Bell, 1986; Gill, 2004) verovatno je da su upravo i u puharama prisutni fenolni pigmenti, strukture hemijski različite od fenolnih komponenti poreklom iz biljaka, koje su daleko bolje okarakterisane. Nepostojanje komercijalnih standarda onemogućava detaljniju analizu ove frakcije. U ekstraktima nije detektovan nijedan od standarda korišćenih u HPLC analizi, uglavnom fenolnih kiselina. Barros i saradnici (2009) i Vaz i saradnici (2011) su određivali sadržaj nekih fenolnih kiselina (protokatehuinske, *p*-hidroksibenzojeve, *p*-kumarinske, cimetine i vanilinske kiselinu) u više vrsta portugalskih samoniklih gljiva i utvrdili da se one u gljivama nalaze u veoma malim količinama (~0.4-350 mg/kg suve mase); Barros i saradnici (2009) su istraživanjima obuhvaili i dve ranije pomenute vrste puhara, i dok su u *L. molle* detektovali *p*-hidroksibenzojevu i vanilinsku kiselinu (41.66 i 39.99 mg/kg suve mase), u *L. perlatum* nisu detektovali ni jednu od ispitivanih fenolnih kiselina.

Tabela 4.2. Sadržaj proteina i šećera u metanolnim ekstraktima

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
Proteini (%)	0.69±0.04 ^{c1}	0.84±0.02 ^b	0.90±0.01 ^b	1.39±0.03 ^a	0.87±0.06 ^b	0.68±0.06 ^c	0.47±0.03 ^d
Šećeri (%)	53.48±2.84 ^a	29.02±0.83 ^b	19.57±0.82 ^c	26.83±1.01 ^b	9.46±0.74 ^d	28.64±1.19 ^b	9.01±0.87 ^d
Trehaloza (mg/g)	256.81±5.83 ^b	287.81±2.07 ^a	23.00±0.40 ^g	238.00±10.79 ^c	105.20±6.07 ^e	160.80±6.92 ^d	47.20±2.31 ^f
Glukoza (mg/g)	246.23±8.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GlcNAc (mg/g)	nd ²	nd	26.32±0.08 ^a	nd	5.34±0.09 ^c	nd	10.24±0.23 ^b

¹Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

²Nije detektovano

Fenolna jedinjenja su dobro poznata po mnogobrojnim biološkim aktivnostima, pre svega antioksidativnom, ali i antiinflamatornom, anti-aterogenom, antimikrobnom i važni su nutraceutici u prehrambenim proizvodima (Shahidi & Ambigaipalan, 2015, Singh et al., 2017, Vuong et al., 2013, Kocak et al., 2017), ali i u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima (Kumar et al., 2018, Demoliner et al., 2018).

α -tokoferol je fenolno jedinjenje koje ujedno predstavlja i vitamin E. U biljkama je, uz druge tokoferole, uključen u očuvanje integriteta ćelijskih membrana, sprečavajući (per)oksidaciju nezasićenih masnih kiselina, pa se njihov nivo menja kao odgovor na stres (Saini & Keum, 2016). U gljivama je njegova uloga nedovoljno poznata. U njima je, prema nekim istraživanjima, zastupljeniji β -tokoferol (Heleno i saradnici, 2010), ali je α -tokoferol biološki najaktivnija forma, s aspekta vitaminske aktivnosti. Pored antioksidativne aktivnosti, α -tokoferol izgleda poseduje direktan stimulativan efekat na fibroblaste i keratinocite, što bi opravdalo njegovu upotrebu u proizvodima za tretman rana (Hobson, 2014). Njegov sadržaj varira u puharama ali ponovo, kao kod ukupnih fenolnih komponenti, postoji trend većih količina u ekstraktima zrelih puharama, s izuzetkom *V. pratense* (tabela 4.3). U micelijumu i ekstraktu mladih plodonosnih tela *H. excipuliformis* α -tokoferol se nalazi ispod praga detekcije; s druge strane, u ekstraktu zrelih *H. excipuliformis*, α -tokoferol je detektovan, ali, kao i u ekstraktima *V. pratense*, njegov sadržaj je ispod 0.5 mg/g ekstrakta. Ekstrakti plodonosnih tela *H. utrififormis* sadrže značajno veću količinu α -tokoferola; u ekstraktu mladih plodonosnih tela njegova koncentracija je oko 2,3 mg/g, dok je u ekstraktu zrelih plodonosnih tela 4 mg/g.

Tabela 4.3. Sadržaj nekih biološki aktivnih sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
Ukupni fenoli (mgGAE/g)	3.21±0.21 ^{d1}	11.52±0.25 ^c	19.75±0.95 ^a	11.22±0.43 ^c	14.93±0.81 ^b	13.67±0.58 ^b	20.25±0.92 ^a
α-tokoferol (mg/g)	nd ²	2.29±0.08	4.00±0.36	nd	0.49±0.07	0.29±0.02	0.34±0.08
Ergosterol (mg/g)	7.70±0.08 ^b	1.22±0.05 ^d	31.65±0.41 ^a	0.36±0.04 ^e	0.47±0.12 ^e	1.11±0.08 ^d	2.85±0.07 ^c
Lovastatin (μg/g)	4.95±0.17 ^g	234.44±8.67 ^b	25.04±1.13 ^f	191.29±7.91 ^c	65.41±4.56 ^e	273.68±12.32 ^a	87.57±3.45 ^d
Kojična kiselina (mg/g)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

¹Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

²Nije detektovano

Slično je i sa ergosterolom (tabela 4.3), gljivljim steroidom koji ulazi u sastav ćelijskih membrana gljiva, a za čoveka predstavlja provitamin D₂ (Heleno i saradnici, 2016). Veća količina ovog jedinjenja prisutna je u ekstraktima zrelih puhara u odnosu na ekstrakte mladih puhara, što se opet može povezati sa razaranjem gradivnih struktura gljiva prilikom autolize. Sadržaj ergosterola daleko je veći u ekstraktu zrelih plodonosnih tela *H. utriformis* nego u ostalim uzorcima, čak 12x veći nego u ekstraktu zrelih *V. pratense* i više od 60x veći nego u ekstraktu zrelih *H. excipuliformis* i čini više od 3% ekstrakta (31.65 mg/g). Ekstrakt micelijuma *H. utriformis* sadrži značajno veću količinu ergosterola nego ekstrakt mladih plodonosnih tela (7.70 naspram 1.22 mg/g), što ukazuje na činjenicu da se struktura membrana u ovim gljivama menja tokom razvoja. Količina ergosterola, izražena preko suve mase polaznog materijala jedino u slučaju zrelih plodonosnih tela *H. utriformis* može da se uporedi sa sadržajem ergosterola u drugim gljivama (~0.5%) (Kalač, 2009). Ekstrakcija ergosterola iz gljivljeg tkiva je inače mnogo kompleksniji proces od maceracije (Jasinghe & Perera, 2005), tako da i ne treba očekivati da je ostvareno kompletno ekstrahovanje ovog sterola, ali je jasno da je u slučaju *V. pratense*, i naročito *H. utriformis*, autoliza dovela do bolje raspoloživosti ergosterola i lakše ekstrakcije. Osim provitaminske funkcije, ergosterol pokazuje i druge aktivnosti, antioksidativnu (Amirullah i saradnici, 2018) i antiinflamatornu (Kuo i saradnici, 2011).

Slobodne masne kiseline, kao deo lipidne frakcije sa fiziološkom aktivnošću, takođe su bile predmet ispitivanja (tabela 4.4.). Neke nezasićene masne kiseline su esencijalne i predstavljaju prekursore eikozanoida, važnih signalnih molekula koji imaju funkciju u imunom odgovoru. Palmitoleinska, oleinska i linoleinska kiselina pokazuju povoljne efekte na brzinu zarastanja rana ukoliko se koriste na koži, ponovo modifikovanjem inflamatornog odgovora (Silva i saradnici, 2018, Pereira i saradnici, 2008). Slobodne masne kiseline pokazuju i antimikrobnu aktivnost, koja se značajno razlikuje u zavisnosti od duži

Tabela 4.4. Sadržaj slobodnih masnih kiselina u ekstraktima (mg/g); C14 – miristinska, C15 – pentadekanska, C16:1 – palmitoleinska; C16 – palmitinska; C17:1 – cis-10-heptadecenska, C17 – margarinska; C18:2 – linoleinska, C18:1 – oleinska, C18:0 – stearinska; C20:1 – eikozenska, C20 – eikozanska; C22 – behenska, C23 – trikozanska, C24 – lignocerinska kiselina

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
C14	0.20±0.03 ^{b1}	0.09±0.02 ^c	0.16±0.01 ^b	0.04±0.00 ^d	0.09±0.00 ^c	0.06±0.02 ^{cd}	1.49±0.02 ^a
C15	0.93±0.07 ^a	0.27±0.02 ^c	0.91±0.06 ^a	0.24±0.04 ^c	0.17±0.02 ^c	0.44±0.09 ^b	0.30±0.01 ^b ^c
C16:1	0.60±0.03 ^b	0.58±0.08 ^b	1.05±0.11 ^a	0.24±0.07 ^c	0.67±0.10 ^b	0.98±0.06 ^a	
C16	2.38±0.17 ^c	1.22±0.10 ^{de}	5.59±0.23 ^a	0.97±0.08 ^e	0.20±0.01 ^f	1.43±0.20 ^d	4.40±0.11 ^b
C17:1	0.28±0.05						
C17	0.94±0.09 ^a	0.08±0.02 ^d	0.20±0.02 ^{bc}	0.10±0.01 ^d	0.08±0.02 ^d	0.17±0.02 ^{cd}	0.31±0.05 ^b
C18:2	10.97±0.62 ^b	4.44±0.35 ^d	25.68±1.87 ^a	4.60±0.21 ^d	7.44±0.43 ^c	4.90±0.36 ^d	11.74±0.56 ^b
C18:1	2.67±0.13 ^a	0.25±0.07 ^c	2.58±0.18 ^a	0.15±0.03 ^c	0.33±0.04 ^c	0.23±0.02 ^c	0.84±0.05 ^b
C18:0	2.00±0.04 ^a	1.34±0.09 ^b	0.53±0.03 ^{ef}	0.67±0.08 ^{de}	0.47±0.05 ^f	0.88±0.04 ^c	0.72±0.07 ^{cd}
C20:1	0.08±0.00	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd
C20	0.10±0.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C22	0.16±0.04 ^b	nd	nd	nd	0.11±0.02 ^c	nd	0.22±0.01 ^a
C23	0.10±0.02 ^b	nd	0.15±0.03 ^a	nd	nd	nd	nd
C24	0.76±0.04 ^a	nd	0.40±0.09 ^b	0.04±0.01 ^d	0.08±0.00 ^d	0.04±0.00 ^d	0.25±0.02 ^c
Ukupno	22.15±1.34 ^b	8.26±0.75 ^c	37.25±2.63 ^a	7.05±0.46 ^c	9.64±0.63 ^c	9.13±0.81 ^c	20.27±0.79 ^b

¹Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

²Nije detektovano

lanca/stepena zasićenosti, kao i vrste mikroorganizma (Kabara i saradnici, 1972). U ekstraktima je detektovano ukupno 14 različitih slobodnih masnih kiselina (najviše u micelijumu – 14). Ekstrakti mladih plodonosnih tela sadrže međusobno sličnu količinu slobodnih masnih kiselina (~7-9 mg/g ekstrakta), dok se količina ovih komponenti značajno razlikuje kod zrelih plodonosnih tela (od 9.64-37.25 mg/g ekstrakta). Takođe, zrela plodonosna tela sadrže veću količinu masnih kiselina od mladih, s izuzetkom *H. excipuliformis*, kod koje je koncentracija masnih kiselina veća u ekstraktu zrelih plodonosnih tela, ali je ukupni sadržaj sličan, kada se u obzir uzme razlika u prinosu ekstrakcije.

Linoleinska kiselina je najzastupljenija u svim ekstraktima (~50-77%, što je u skladu sa ranije iznetim podacima vezanim za lipidnu frakciju gljiva; Kalač, 2009). Zasićene kiseline, palmitinska i stearinska su druga, odnosno treća po zastupljenosti (ne obavezno tim redom) u ekstraktima mladih karpofora. Sadržaj oleinske kiseline (koja, kako je ranije rečeno, čini značajan udeo ukupnih masnih kiselina u gljivama) je u njima relativno mali i iznosi ~2% ukupnih slobodnih masnih kiselina u ovim ekstraktima. Linoleinska, palmitinska, stearinska i oleinska čine preko 80% slobodne frakcije. U ekstraktima zrelih karpofora dolazi do povećanja udela linoleinske i oleinske kiseline i smanjenja udela njihovog zasićenog analoga, stearinske kiseline. Kod zrelih plodonosnih tela *V. pratense* dolazi i do povećanja količine miristinske kiseline (7.35% frakcije). U ekstraktu micelijuma takođe dominira linoleinska kiselina, ali je njen udeo najmanji od svih ekstrakata (~50%); oleinska, stearinska i palmitinska kiselina podjednako su zastupljene (9-12%).

Najveći ukupni sadržaj masnih kiselina prisutan je u ekstraktu zrelih plodonosnih tela *H. utriformis*, gotovo 4% ekstrakta. Linoleinska kiselina čini čak 2.5 % ovog ekstrakta.

Na osnovu iznetih rezultata, može se zaključiti da su ispitivane puhare izvor mikronutrijenata s potencijalnim povoljnim delovanjem na ljudsko zdravlje, bilo da se konzumiraju kao mlade ili koriste u druge svrhe, npr. za dobijanje dijetetskih ili kozmetičkih proizvoda, naročito kao zrele. Izneti rezultati ukazuju na to da autoliza u većini slučajeva pospešuje mogućnost ekstrakcije ispitivanih fiziološki aktivnih jedinjenja, ili dovodi do sinteze ovih jedinjenja. Uz značajno veću količinu ergosterola, α -tokoferola,

nezasićenih masnih kiselina, *N*-acetilglukozamina i ukupnih fenola, *H. utriformis* se izdvaja kao bolji izvor ovih farmakološki aktivnih jedinjenja a ujedno ukazuje i na to da je autoliza kompletnija kod ove vrste što verovatno omogućava lakšu i potpuniju ekstrakciju ovih komponenti, vezanih pre svega za ćelijske membrane i polisaharide.

4.1.3. Biološka aktivnost ekstrakata

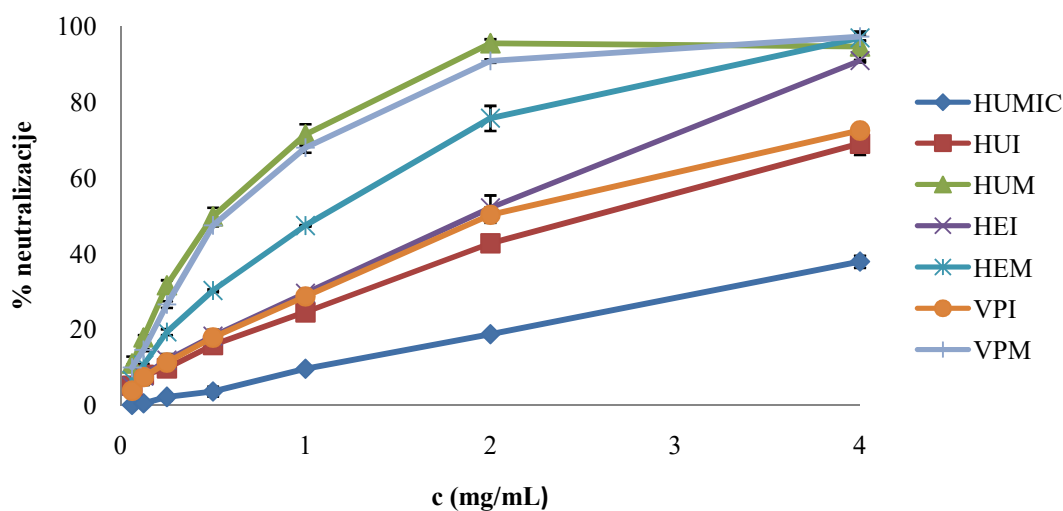
4.1.3.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost ekstrakata procenjena je trima metodama – sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala, redukcije jona teških metala i inhibicije oksidativne degradacije β -karotena, odnosno sprečavanja oksidacije nezasićenih masnih kiselina (tabela 4.5). U skladu sa ovim analizama, urađene su i prethodno opisane analize hemijske karakterizacije radi utvrđivanja jedinjenja, odnosno molekulskih grupa odgovornih za antioksidativnu aktivnost.

Antiradikalska aktivnost ekstrakata zrelih puhara je značajno veća od ekstrakata mladih plodonosnih tela (slika 4.1) što se koreliše sa ukupnim fenolima (korelacija sa α -tokoferolom i ergosterolom je slaba), mada je aktivnost ekstrakata zrelih puhara daleko izraženija nego što bi bilo očekivano na osnovu razlike u sadržaju ukupnih fenola, što sugeriše da postoji strukturna razlika ove frakcije kod mladih i zrelih karpofora i ukazuje na to da se autolizom sintetišu/oslobađaju aktivnija jedinjenja. Micelijum ima najmanju aktivnost, koja pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije u ispitivanom opsegu; ova linearnost je nešto manje izražena kod ekstrakata mladih gljiva (osim kod *H. excipuliformis*), a ima više logaritamski karakter za ekstrakte zrelih plodonosnih tela, što je naročito izraženo kod *V. pratense* i *H. utriformis*, kod kojih se plato aktivnosti dostiže pri koncentraciji od 2 mg/mL. Daljim povećavanjem koncentracije (2x), aktivnost je neznatno (bez statističkog značaja) bolja kod *V. pratense*, dok je kod *H. utriformis* čak prisutan trend opadanja aktivnosti. Ovo se može objasniti pro-oksidativnom aktivnošću fenolnih jedinjenja pri njihovoj većoj koncentraciji (León-González i saradnici, 2015).

Proces autolize nesumnjivo vodi produkciji potentnijih antioksidanasa od onih prisutnih u mladim plodonosnim telima. Ovo bi mogli da budu određeni pigmenti, obzirom da, kako je

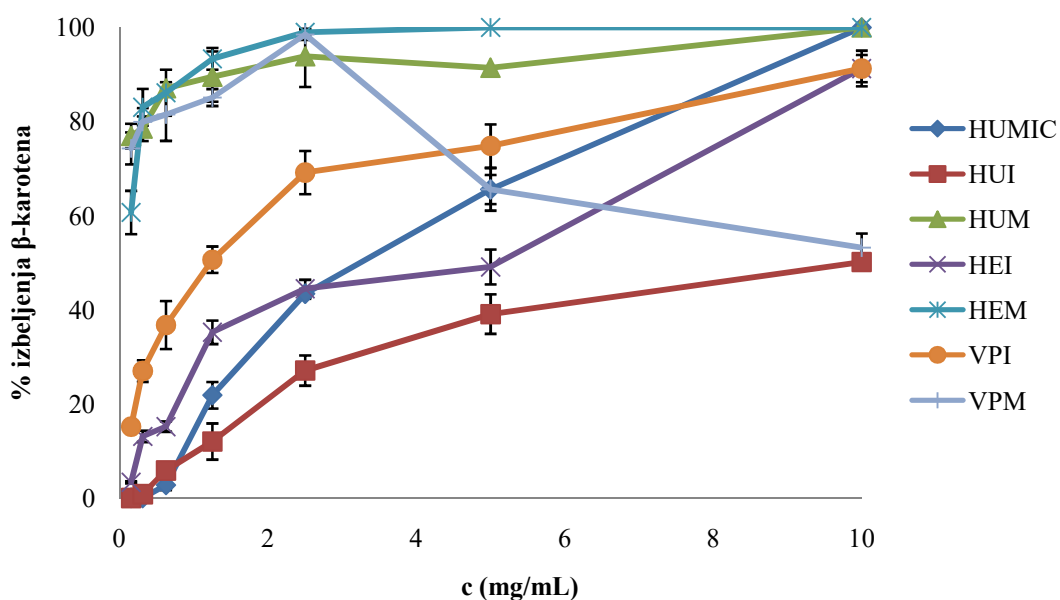
ranije pomenuto, tkivo plodonosnih tela ovih gljiva tamni tokom sazrevanja, pa su samim tim i ekstrakti zrelih puhara tamnije boje.



Slika 4.1. ABTS antiradikalska aktivnost ekstrakata

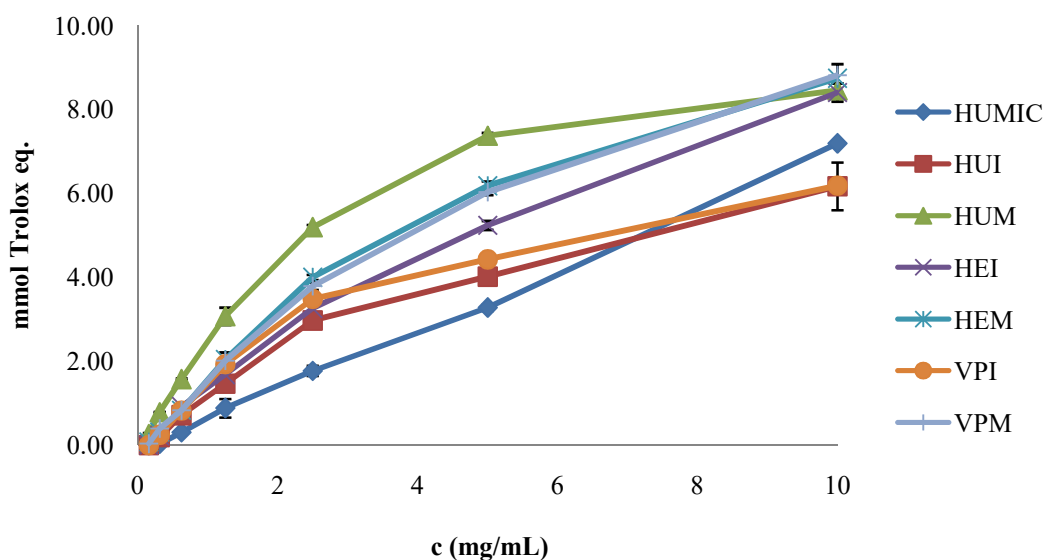
U testu inhibicije oksidativne degradacije β -karotena situacija je nešto kompleksnija. Generalno, ekstrakti zrelih puhara imaju daleko bolju aktivnost od ekstrakata mladih puhara (slika 4.2), pri čemu su EC_{50} vrednosti sva tri ekstrakta zrelih puhara manje od najmanje korišćene koncentracije (<0.156 mg/mL). Njihova aktivnost uporediva je sa aktivnošću askorbinske kiseline, pri svim koncentracijama. Ekstrakt zrelih plodonosnih tela *V. pratense*, odnosno VPM, pokazuju sličnu, značajnu aktivnost kao i druga dva ekstrakta zrelih puhara samo pri nižim koncentracijama (≤ 2.5 mg/mL) i dostiže skoro 100% inhibicije; pri daljem povećanju koncentracije međutim dolazi do opadanja aktivnosti, što se i u ovom slučaju može pripisati pro-oksidativnoj aktivnosti aktivnih komponenti – međutim tog efekta nema kod druga dva ekstrakta zrelih plodonosnih tela. Ekstrakti mladih puhara imaju manje izraženu aktivnost, i međusobno se značajno razlikuju – najbolju aktivnost pokazuje VPI, dok HUI pokazuje najslabiju. Micelijum ima čak bolju aktivnost od HUI pri svim koncentracijama, a slabiju od VPI i HEI pri nižim koncentracijama (≤ 2.5 mg/mL). Nekoliko autora našlo je direktnu vezu između sadržaja ukupnih fenola i α -

tokoferola u gljivama i njihovoj sposobnosti da neutrališu slobodne linoleinske radikale (Cheung et al., 2003; Barros et al., 2007; Froufe et al., 2011). Ako se izuzme ekstrakt micelijuma, aktivnost ekstrakata mladih i zrelih plodonosnih tela se koreliše sa ukupnim fenolima, ali, slično kao i kod antiradikalske aktivnosti, razlika u potentnosti inhibicije je daleko veća od očekivane. Aktivnost u ovom slučaju ne zavisi isključivo od ukupnih fenolnih komponenti, već i od drugih molekulskih grupa, i/ili, ponovo, specifičnih fenolnih jedinjenja. Iako je α -tokoferol lipofilni antioksidans, korelacija aktivnosti sa njegovim sadržajem je slaba; prisustvo drugih tokoferola se ipak ne može isključiti, mada je za dve druge vrste puhara, *Lycoperdon molle* i *L. perlatum* utvrđeno da, za razliku od drugih ipitivanih gljiva, ne sadrže druge tokoferole (Barros i saradnici, 2008). Ergosterol je takođe lipofilni antioksidans, ali aktivnost se ne koreliše ni sa količinom ovog sterola; veća količina ergosterola u micelijumu bi jedino mogla da objasni bolju aktivnost u odnosu na HUI, od koga ima značajno manje ukupnih fenola. Anti(per)oksidativna aktivnost je, po svemu sudeći, u korelaciji sa više komponenti ekstrakata, od kojih bi glavne ipak bile fenolne strukture.



Slika 4.2. Test inhibicije oksidativne degradacije β -karotena

Moć ekstrakata zrelih puhara da redukuju Cu^{2+} takođe je bolja od ekstrakata mladih puhara (slika 4.3). Ovo je naročito izraženo pri nižim koncentracijama. Micelijum pokazuje najslabiju aktivnost, takođe pri $c \leq 5 \text{ mg/mL}$. Aktivnost se stoga dobro koreliše sa ukupnim fenolima pri nižim koncentracijama; HEI ima značajno bolju aktivnost od drugih ekstrakata mladih puhara i dostiže slične vrednosti pri najvećoj koncentraciji. Micelijum ima lošiju aktivnost od HUI pri nižim koncentracijama (ponovo u korelaciji sa ukupnim fenolima), međutim, pri najvišoj koncentraciji pokazuje značajno bolju aktivnost. Takođe, pokazuje linearnu zavisnost aktivnosti od koncentracije, u opsegu ipitivanih koncentracija, za razliku od ostalih ekstrakata čija je zavisnost više logaritamska – što ukazuje na drugi tip aktivnih molekula. Esktrakt micelijuma je bogat redukujućim šećerom glukozom, pa je aktivnost možda rezultat veće koncentracije ovog šećera, a ne nekog biološki aktivnog jedinjenja od interesa.



Slika 4.3. CUPRAC antioksidativna analiza

Tabela 4.5. Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
ABTS (EC ₅₀ , mg/mL)	5.24±0.19 ^{a1}	2.68±0.11 ^b	0.55±0.07 ^c	1.93±0.13 ^c	1.13±0.04 ^d	2.08±0.19 ^c	0.55±0.00 ^e
CUPRAC (mM Trolox eq.; c=10 mg/mL)	7.2±0.01 ^b	6.16±0.14 ^c	8.44±0.04 ^a	8.41±0.22 ^a	8.74±0.34 ^a	6.19±0.14 ^c	8.81±0.30 ^a
Test inhibicije oksidativne degradacije β-karotena (EC ₅₀ , mg/mL)	3.20±0.22 ^c	9.97±0.82 ^a	<0.16	5.11±0.2b ³	<0.16	1.26±0.17 ^d	<0.16

¹Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

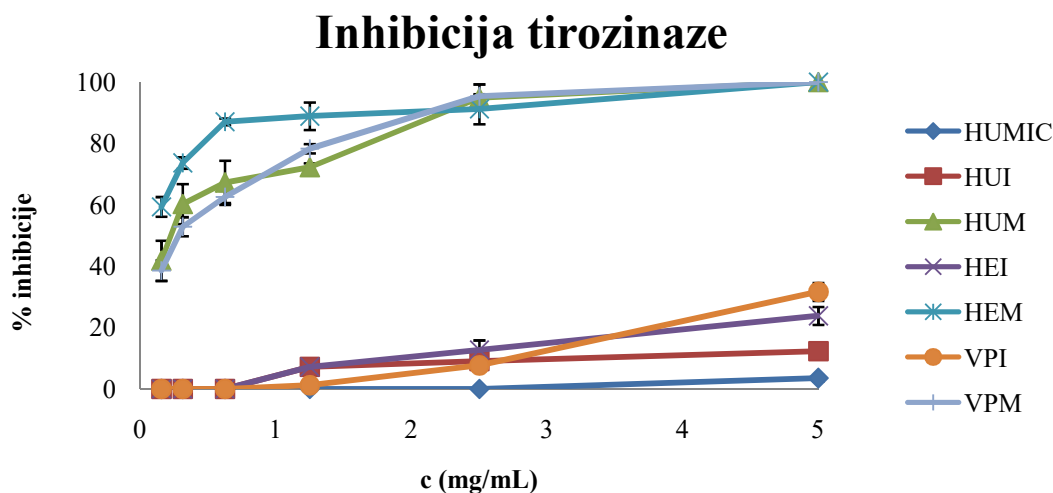
Antioksidativna aktivnost, gledana u celini, značajno je bolja kod ekstrakata zrelih puhara. Ovi ekstrakti bogatiji su fenolnim komponentama, a sadržaj ukupnih fenola relativno se dobro koreliše sa različitim antioksidativnim metodama – međutim, aktivnost ekstrakata zrelih puhara je u nekim slučajevima mnogo izraženija nego što bi se očekivalo na osnovu ukupnih fenolnih jedinjenja. Bilo da su za bolju aktivnost odgovorna i druga jedinjenja, a gotovo sigurno da jesu, bilo da je u pitanju razlika u samoj fenolnoj frakciji, činjenica je da prilikom sazrevanja u puharama dolazi pojačano nastaju jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću. Iako je antioksidativna aktivnost ekstrakata zrelih puhara generalno bolja, ekstrakti mladih puhara i dalje pokazuju značajnu aktivnost. Ekstrakt micelijuma vrlo efikasno sprečava oksidaciju linoleinske kiseline, čak bolje od ekstrakata mladih puhara.

4.1.3.2. Inhibicija enzimske aktivnosti

Tirozinaza je enzim koji je odgovoran za proizvodnju melanina u koži. Inhibitori ovog enzima koriste se u kozmetici, u proizvodima za izbeljivanje kože. Kojična kiselina, hinon izolovan iz gljivica roda *Aspergillus* najkorišćeniji je inhibitor tirozinaze (Ariff et al., 1996).

Metanolni ekstrakti mladih puhara pokazali su slabu aktivnost prema tirozinazi, uz merljivu inhibiciju tek pri višim koncentracijama (≥ 2.5 mg/mL, slika 4.4). Inhibicija koja je ostvarena pri najvećoj korišćenoj koncentraciji (5 mg/mL) bila je ~30% u slučaju VPI, ~24% u slučaju HEI i samo ~12% u slučaju HUI. Ekstrakt micelijuma pokazao je najslabiju aktivnost, sa svega 3.5% inhibicije pri najvećoj koncentraciji; Park i saradnici (2015) su takođe utvrdili da etanolni ekstrakti micelijuma više vrsta gljiva nisu efikasni inhibitori tirozinaze. Ekstrakti zrelih puhara, s druge strane, pokazali su se kao izuzetno potentni inhibitori ovog enzima. Inhibicija od preko 90% enzimske aktivnosti postignuta je već pri 2.5 mg/mL, uz veoma niske IC_{50} vrednosti, između 0.156 i 0.313 mg/mL za VPM i HUM, i čak ispod 0.156 mg/mL za HEM (procenjeno na ~0.1 mg/mL). Studije koje su se bavile antitirozinaznom aktivnošću ekstrakata gljiva su malobrojne, i na osnovu dostupnih istraživanja može se reći da su ekstrakti zrelih puhara daleko potentniji inhibitori od velike većine drugih gljiva, osim od petroleumskih i butanolnih ekstrakata čage (*Innonotus obliquus*) (Taofiq et al., 2016).

Kako supstrat tirozinaze predstavljaju aromatične aminokiseline (tirozin i DOPA) (Min Chang, T., 2012), utvrđeno je da različita fenolna jedinjenja i prirodni ekstrakti bogati fenolima imaju sposobnost inhibicije ovog enzima (Taofiq et al., 2016, Zengin et al., 2015, Paun et al., 2016, Arumugam et al., 2018). Korelacija aktivnosti ekstrakata sa ukupnim fenolima postoji, tj. zreli ekstrakti, nešto bogatiji fenolima pokazuju bolju aktivnost; međutim, razlika u aktivnosti daleko prevazilazi razliku u sadržaju fenola u korist ekstrakata zrelih puhara, tako da je verovatnije da su specifična fenolna jedinjenja, nastala u procesu autolize zaslužna za inhibiciju tirozinaze, slično kao i kod antioksidativne aktivnosti. Kojična kiselina nije detektovana ni u jednom od ekstrakata. Drugi poznati inhibitori ovog enzima koji su detektovani u gljivama su fenolne kiseline, ferulinska, kafena, elagna i p-kumarinska kiselina (Taofiq et al., 2016), ali one takođe nisu detektovane u ekstraktima. Iz šampinjona (*Agaricus bisporus*) je izolovano fenoksazinsko jedinjenje (2-amino-3H-fenoksazin-3-on), koje se pokazalo kao potentni inhibitor tirozinaze pri koncentracijama od 0.5-2 μ M. Ovo jedinjenje međutim ne deluje kao direktni inhibitor enzima i ne poseduje aktivnost *in vitro*, već deluje na nivou genske ekspresije i sinteze samog enzima (Miyake i saradnici, 2010).



Slika 4.4. Inhibicija tirozinaze

Acetilholinesteraza vrši razlaganje acetilholina, neurotransmitera, na holin i acetat. Inhibitori ovog enzima koriste se u medicini kao lekovi za tretman neurodegenerativnih

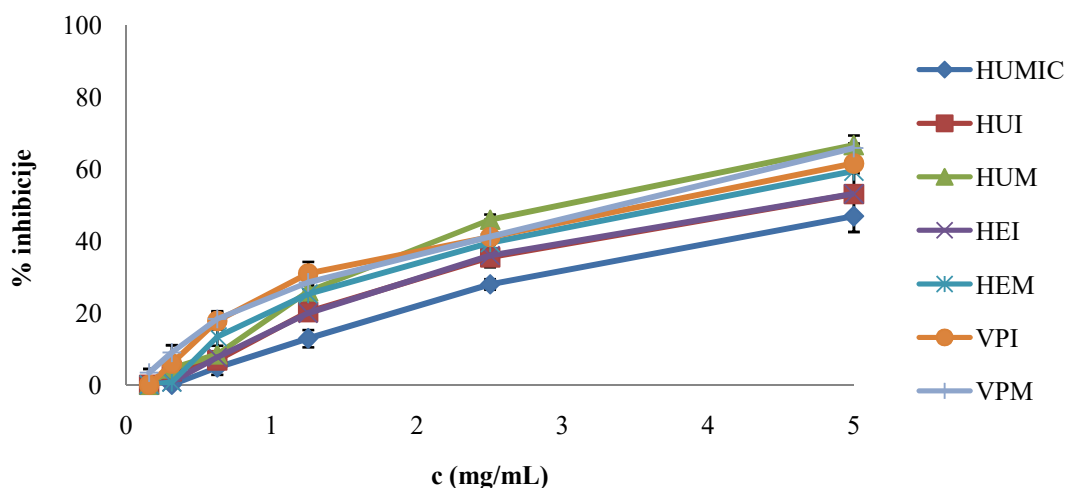
bolesti, Alchajmerove bolesti i demencije, jer sprečavanje hidrolize acetilholina, odnosno povećavanje njegove koncentracije u centralnom nervnom sistemu dovodi se u vezu sa poboljšanjem kliničke slike kod bolesnika tj. poboljšanja kognitivnih funkcija. Ipak, prepoznato je da su trenutne terapijske opcije limitirane i da pre svega među prirodnim proizvodima treba tražiti nove aktivne principe (Kulshreshtha & Piplani, 2016).

Svi ekstrakti su pokazali inhibitornu aktivnost prema ovom enzimu koja se može okarakterisati kao umerena (slika 4.5); pri najvišoj koncentraciji (5 mg/mL) ekstrakti su inhibirali aktivnost enzima od 47-67%. Ekstrakti zrelih puhara ponovo su generalno pokazali bolju aktivnost od svojih „parnjaka“, dok je ekstrakt micelijuma pokazao najslabiju aktivnost. Aktivnost uzoraka je ipak istog reda veličine (IC_{50} od 2.8-6 mg/mL), za razliku od inhibicije tirozinaze. Ako se uporede ekstrakti mladih i zrelih plodonosnih tela, razlika je najizraženija u slučaju *H. utriformis*, dok je u slučaju *V. pratense* ona uočljiva tek pri najvišoj koncentraciji (5 mg/mL). Kada su Akata i saradnici (2018) testirali ekstrakte nekoliko vrsta turskih samoniklih gljiva na anti-acetilholinesteraznu aktivnost, najbolji rezultat je dobije upravo za zrele primerke plodonosnih tela *H. utriformis* (kao *Lycoperdon utriforme*); rezultati se međutim ne mogu uporediti jer autori nisu dali metodologiju rada. Ponovo postoji korelacija sa ukupnim fenolnim jedinjenjima, a prirodna fenolna jedinjenja su, pokazala su istraživanja, u različitoj meri, inhibitori ovog enzima (Hasnat i saradnici, 2013; Szwajgier & Borowiec, 2012). Autoliza i u ovom slučaju dovodi, ili do sinteze ili do bolje ekstrakcije jedinjenja odgovornih za inhibiciju acetilholinesteraze. Kako apsolutna razlika u aktivnosti nije velika, micelijum bi mogao da bude dobar izvor aktivnih jedinjenja sa anti-acetilholinesteraznom aktivnošću, s obzirom na to da je njegovo gajenje moguće u laboratorijskim uslovima.

Inhibitorna aktivnost prema butirilholinesterazi je manje izražena (slika 4.6) i pri najvećoj koncentraciji (5 mg/mL) kreće se od 9-35% za ekstrakte plodonosnih tela, dok u slučaju micelijuma nema inhibicije. Korelacija sa fenolnom frakcijom je još izraženija u slučaju BuChE. Značajna selektivnost u inhibiciji AcHE ostvarena je kod svih uzoraka; ekstrakt micelijuma je pokazao apsolutnu selektivnost prema AcHE, što ga čini odličnim potencijalnim izvorom inhibitora AcHE. Ekstrakti mladih plodonosnih tela su pri najvećoj

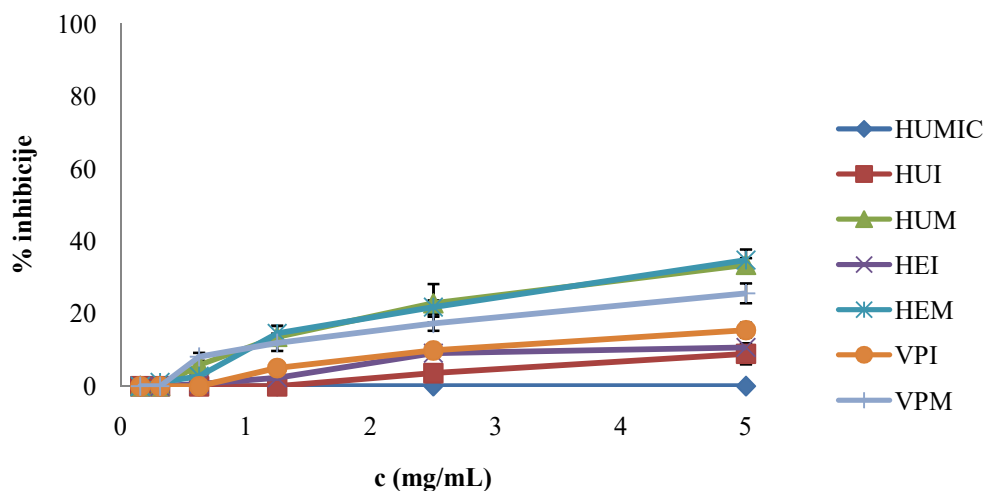
koncentraciji inhibirali aktivnost enzima svega ~9-15%, odnosno pokazali su 4-6X selektivnije delovanje prema AcHE (najveću *H. utriformis*, ~6X). Ekstrakti zrelih puhara pokazali su bolju inhibitornu aktivnost prema BuChE, inhibirajući enzim pri najvećoj koncentraciji ~26-35%, ali i slabiju selektivnost prema AcHE (1.7-2.6X). Selektivna inhibicija AChE naspram inhibicije BuChE u ovom trenutku nema jasno definisan značaj. Selektivnost prema AChE lekova koji se koriste u terapiji Alchajmerove bolesti povezivana je sa boljim terapijskim ishodom (Liston et al., 2004), međutim, novije studije pokazale su da u kasnijim stadijumima Alchajmerove bolesti dolazi do povećane ekspresije nivoa BuChE u mozgu (Kumar et al., 2018). Selektivnost inhibicije bi prema tome bila od značaja u zavisnosti od stadijuma bolesti.

Inhibicija AChE



Slika 4.5. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE)

Inhibicija BuChE

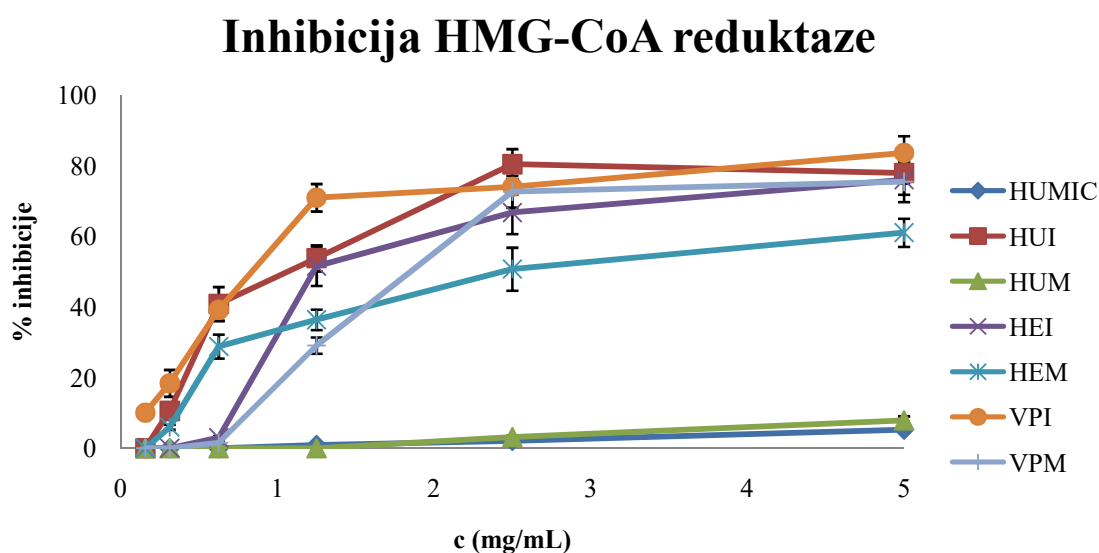


Slika 4.6. Inhibicija butirilholinesteraze (BuChE)

HMG-CoA reduktaza je jedan od enzima odgovornih za sintezu holesterola i određuje brzinu stvaranja endogenog holesterola. Glavna grupa lekova koji se koriste u terapiji hiperholesterolemije su statini, prirodni – lovastatin, i polusintetski, dobijeni hemijskom modifikacijom lovastatina, (pravastatin, rosuvastatin itd). Lovastatin je prvi put izolovan iz crvenog pirinča, odnosno gljivice *Monascus purpureus*, koja je odgovorna za njegovu fermentaciju. Kasnije je prisustvo lovastatina potvrđeno i u drugim gljivama, najpre bukovači, a zatim i drugim makromicetama (vrganj itd) (Wasser i Weis, 1999; Chen i saradnici, 2012; Seenivasan i saradnici, 2018, Gil-Ramirez i saradnici, 2013).

Ekstrakti su pokazali različitu inhibitornu aktivnost prema ovom enzimu (slika 4.7). Ekstrakti mladih puhara generalno imaju bolje inhibitorno delovanje, što je posebno izraženo pri nižim koncentracijama (≤ 1.25 mg/mL); pri višim koncentracijama verovatno dolazi do zasićenja enzimske reakcije tako da ekstrakti imaju tendenciju dostizanja platoa aktivnosti, koja je oko 80% inhibicije. Sva tri ekstrakta mladih karpofora imaju skoro identične IC_{50} vrednosti, od oko 1 mg/mL, što se može okarakterisati kao značajna aktivnost. Aktivnost ekstrakata zrelih puhara se međusobno više razlikuje; dok HUM jedva pokazuje vidljivu aktivnost (~8%) pri najvišoj koncentraciji (5 mg/mL), HEM dostiže IC_{50}

pri 2.5 mg/mL, a VPM već pri 1.9 mg/mL. VPM pri tome dostiže aktivnost ekstrakata mladih puhara pri 2.5 mg/mL i pokazuje najbolju aktivnost od sva tri ekstrakta zrelih plodonosnih tela. Micelijum, slično kao HUM, inhibira oko 5% enzimske reakcije pri najvišoj koncentraciji.



Slika 4.7. Inhibicija HMG-CoA reduktaze

Aktivnost, izražena preko IC_{50} vrednosti, se, zanimljivo, odlično koreliše sa količinom lovastatina u ekstraktima ($R^2=0.91$). Korelacija je linearno-negativna, odnosno, što je veći sadržaj lovastatina u ekstraktu, to je IC_{50} vrednost manja, tj. njegova aktivnost veća. Međutim, lovastatin je prolek – tj. fiziološki neaktivan oblik koji najpre mora da se enzimski konvertuje u fiziološki aktivan oblik u ljudskoj jetri, lovastatinsku kiselinu koja ima direktno inhibitorno dejstvo na enzim (Du Souich et al., 2017). Lovastatin, kojim su bogati uzorci mladih puhara (naročito *V. pratense*), ne može da bude odgovoran za aktivnost ekstrakata. Ipak, gljive proizvode i pomenutu lovastatinsku kiselinu (od koje laktinizacijom nastaje lovastatin) (Lisec et al., 2012) koja bi mogla da bude odgovorna za aktivnost. Slično su primetili i drugi autori koji su analizirali ekstrakte *Pleurotus* spp., tj. nisu detektovali statine u uzorcima, ali je inhibitorna aktivnost prema HMG-CoA reduktazi bila prisutna (Gil-Ramírez et al., 2013). Sadržaj direktnih inhibitora iz ekstrakata se izgleda koreliše sa sadržajem lovastatina.

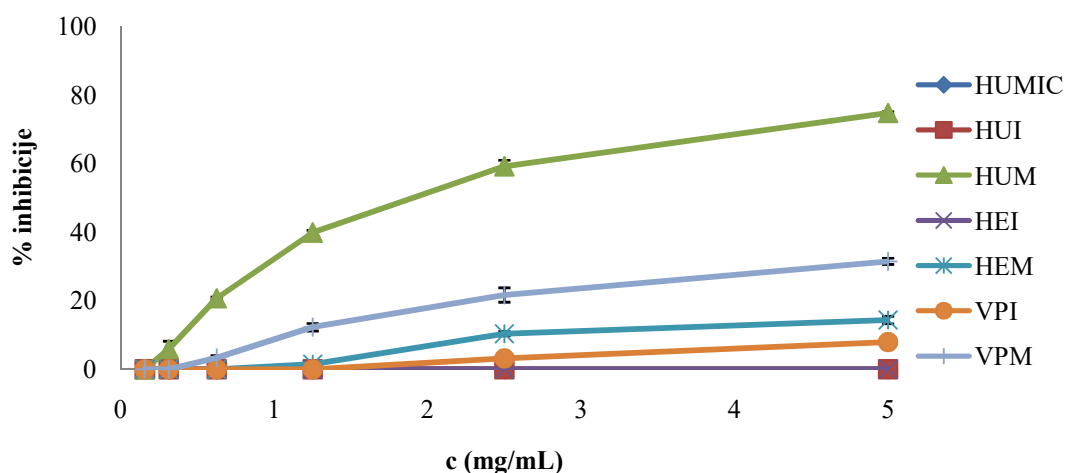
Lovastatin se akumulira u mladim plodonosnim telima; njegova količina se naizgled smanjuje prilikom sazrevanja, što je posebno izraženo kod *H. utrififormis*, međutim moguće je da pre dolazi do njegove depozicije u spore, iz kojih je ekstrakcija otežana, kao što je slučaj s bukovačom (Wasser i Weis, 1999). Micelijum proizvodi lovastatin, ali se u samom micelijumu nalazi u značajno manjoj količini nego u mladim plodonosnim telima. Moguće je da se, kao sekundarni metabolit, on izlučuje u spoljašnju sredinu, jer se lovastatin upravo i dobija iz fermentacione tečnosti gljivica iz roda *Aspergillus* i drugih (Mouafi i saradnici, 2016).

α -amilaza i α -glukozidaza su enzimi koji su uključeni u metabolizam šećera, tačnije polisaharida. Raskidaju specifično glikozidne veze α -tipa, koje se sreću kod polisaharida koje ljudi koriste u ishrani, pre svega skrobu, ali i glikogenu. Inhibitori α -glukozidaze su od kliničkog značaja i nekoliko lekova koji blokiraju ovaj enzim koriste se u terapiji dijabetesa, akarboza, miglitol i vogliboza (Popović-Đorđević i saradnika, 2017).. Prirodni proizvodi sa inhibitornom aktivnošću na ove enzime bi na sličan način mogli da se koriste u smanjenju postprandijalne hiperglikemije.

Ekstrakti micelijuma i mladih plodonosnih tela nisu pokazali aktivnost prema α -glukozidazi (sika 4.8), osim VPN, koji je pokazao merljivu aktivnost tek pri maksimalnoj koncentraciji (5 mg/mL, ~8%). S druge strane, ekstrakti zrelih puhara pokazali su bolju aktivnost, koja se značajno razlikovala za ove tri vrste. Za HEM i VPM nije postignuta IC_{50} vrednost i pri maksimalnoj koncentraciji ovi uzorci postigli su oko 14 i 30% inhibicije, redom. VPM pokazao je sličnu aktivnost kao akarboza, koja je pri istoj koncentraciji inhibirala 34% enzimske aktivnosti. Daleko značajniju inhibicionu moć pokazao je HUM, koji je pri maksimalnoj koncentraciji dostigao oko 75% inhibitorne aktivnosti, uz IC_{50} vrednost od 1.85 mg/mL. Uzevši u obzir da akarboza nije postigla 50% enzimske inhibicije u ovom testu, jasno je da je HUM izvor veoma potentnih aktivnih principa koje bi trebalo okarakterisati i koji bi mogli da nađu primenu u terapiji poremećaja metabolizma šećera. Poznato je da fenolna jedinjenja izolovana iz biljaka pokazuju anti- α -glukozidaznu aktivnost, pa nije isključeno da bi fenolna frakcija mogla da bude odgovorna za bolju aktivnost ekstraktata zrelih puhara. Neki od inhibitora koji se koriste u terapiji imaju amino-

šećernu strukturu pa nije isključeno da razgradni proizvodi hitina, kojih ima samo u zrelim puharama poseduju ovakvu aktivnost. Aktivnost ekstrakata zrelih puhara koreliše se sa ukupnim sadržajem *N*-acetilglukozamina (HUM>VPM>HEM), mada nije poznato da li sam *N*-acetilglukozamin poseduje anti- α -glukozidaznu aktivnost. Osim antihiperглиkemijskog efekta, inhibitori α -glukozidaze su potencijalni antivirusni lekovi širokog spektra; naime, mnogi virusi imaju spoljašnje omotače koji se sastoje od glikoproteina. Ovi glikoproteini su često esencijalni u životnom ciklusu virusa i faktori su virulentnosti a istraživanja su pokazala da je njihova transformacija, posredovana α -glukozidazom ključna za njihovu produkciju i virulentnost. Posebna pažnja usmerena je na HIV i hepatitis B virus; pokazano je da inhibitori α -glukozidaze (miglustat) sprečavaju fuziju HIV-a sa CD4 limfocitima i da sprečavaju sekreciju hepatitis B viriona iz zaraženih hepatocita (Mehta i saradnici, 1998). Na taj način, ekstrakti zrelih puhara mogli bi da poseduju i antivirusno dejstvo i budu izvor novih antivirusnih lekova.

Inhibicija α -glukozidaze

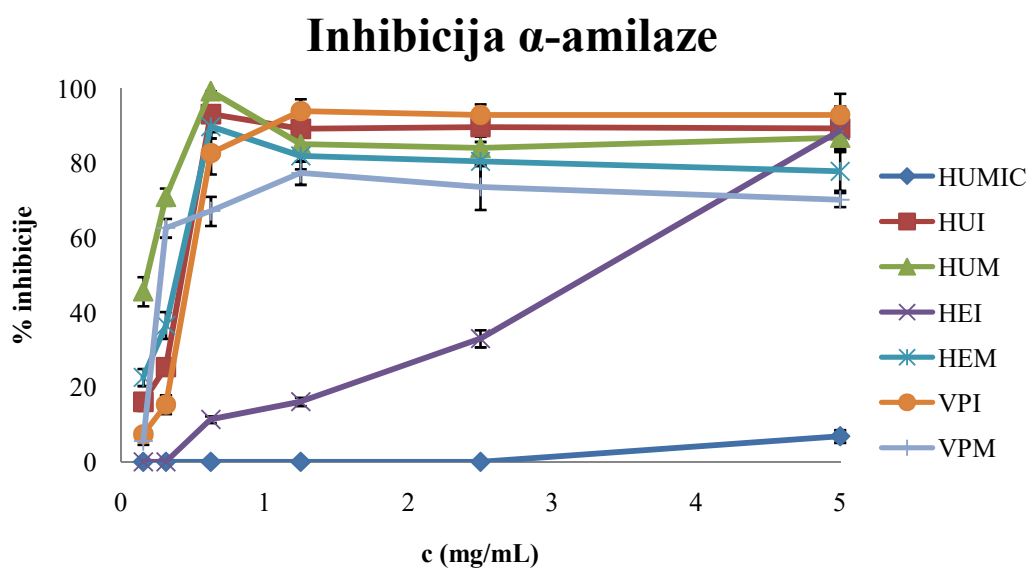


Slika 4.8. Inhibicija α -glukozidaze

S druge strane, u testu inhibicije α -amilaze, svi ekstrakti, osim micelijuma, pokazali su aktivnost u relativno niskim koncentracijama (slika 4.9), ali daleko manju nego sama akarboza. Ponovo je aktivnost ekstrakata zrelih puhara bolja od ekstrakata mladih puhara i ponovo je HUM najaktivniji ekstrakt s IC_{50} vrednošću od 0.18 mg/mL i skoro potpunom

inhibicijom enzimske aktivnost (>99%) pri koncentraciji od 0.625 mg/mL. HEI je pri koncentracijama nižim od 5 mg/mL pokazao najslabiju aktivnost (isključujući micelijum), i relativno visoku IC₅₀ vrednost od 3.26 mg/mL.

Iako trenutno ne postoje lekovi koji deluju inhibicijom α -amilaze, ovaj enzim je označen kao budući strateški pristup tretmanu poremećaja unosa ugljenih hidrata (dijabetes i gojaznost), ali i zubnog karijesa i periodontalnih bolesti. Biljne, tj. prirodne sirovine označene su kao potencijalni izvor inhibitora α -amilaze (Sales i saradnici, 2012).



Slika 4.9. Inhibicija α -amilaze

IC₅₀ vrednosti metanolnih ekstrakata u testovima inhibicije na ispitivane enzime date su u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Inhibitorna aktivnost ekstrakata na enzime, IC₅₀ vrednosti (mg/mL)

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
Inhibicija							
tirozinaze	>5	>5	0.22±0.01 ^b	>5	<0.156	>5	0.28±0.02 ^a
(mg/mL)							
Inhibicija							
AChE	5.83±1.26 ^a	4.48±0.10 ^{ab}	2.84±0.11 ^c	4.43±0.21 ^b	3.88±0.17 ^b	3.58±0.23 ^b	3.40±0.09 ^b
(mg/mL)							
Inhibicija							
BuChE	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5
(mg/mL)							
Inhibicija							
HMG-CoA-R	>5	1.06±0.05 ^c	>5	1.24±0.13 ^c	2.50±0.17 ^a	0.86±0.09 ^c	1.87±0.23 ^b
(mg/mL)							
Inhibicija							
α-glukozidaze	>5	>5	1.83±0.32	>5	>5	>5	>5
(mg/mL)							
Inhibicija							
α – amilaze	>5	0.43±0.05 ^b	0.18±0.03 ^c	3.26±0.15 ^a	0.42±0.08 ^b	0.47±0.08 ^b	0.28±0.03 ^{bc}
(mg/mL)							

¹Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

4.1.3.3. *In vitro* antimikrobna aktivnost

Ekstrakti su pokazali različitu aktivnost na ispitivane sojeve mikroorganizama (tabela 4.7); generalno, ekstrakt micelijuma pokazuje najbolju aktivnost, a ekstrakti mladih puhara pokazuju bolju aktivnost od zrelih. HUMIC je jedini uzorak koji je pokazao inhibitornu aktivnost prema svim ispitivanim sojevima, u opsegu ispitivanih koncentracija. Takođe, za HUMIC je određena i najniža vrednost MIK-a, sveukupno gledano, prema bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* (0.625 mg/mL). HUI i HEI pokazuju vrlo sličnu aktivnost kao i HUMIC i vrlo sličnu međusobnu aktivnost. Oba ekstrakta pokazuju vrlo slab trend nešto boljeg delovanja protiv G- bakterija, ali je uzorak premali da bi se doneli definitivni zaključci. HUMIC, HUI i HEI pokazuju značajnu aktivnost prema *S. aureus*, i, što posebno treba naglasiti, prema meticilin-rezistentnom soju ove bakterije (MRSA); HEI pokazuje čak i baktericidno delovanje prema ovoj bakteriji, pri najvišoj koncentraciji (20 mg/mL), što je, uz baktericidnu aktivnost VPM prema *E. faecalis* (MBK=20 mg/mL) ujedno i jedino zabeleženo baktericidno dejstvo za metanolne ekstrakte. MRSA je multirezistentni soj stafilokoke i infekcije ovom bakterijom postale su sve rašireniji problem; MRSA je najčešće izazivač infekcija kože, naročito u bolničkim usovima i ove infekcije često dovode do smrtnih ishoda. MRSA je i vodeći uzročnik bakterijemija u razvijenim zemljama i može da dovede do endokarditisa, artritisa, osteomijelitisa i komplikacija kao što su septički šok (Hassoun i saradnici, 2017). Zato je od izuzetnog značaja nalaženje novih izvora aktivnih supstanci koje mogu da pomognu u borbi protiv ovog patogena. *Pseudomonas aeruginosa*, G- bakterija prema kojoj je ekstrakt micelijuma pokazao značajnu aktivnost, takođe je prepoznata kao jedan od vodećih uzročnika teških intrahospitalnih infekcija, zbog prisustva multirezistentnih sojeva.

VPI ne pokazuje tako dobru antimikrobnu aktivnost kao HUI i HEI, ali i dalje nešto bolju nego ekstrakti zrelih puhara.

Ekstrakti zrelih puhara, HUM, HEM i VPM pokazuju aktivnost prema G⁺ bakterijama; identičnu prema *S. aureus* sojevima (20 mg/mL), i sličnu prema *E. faecalis* (HUM=HEM=20 mg/mL; VPM=5 mg/mL) Prema *E. coli* jedino HUM pokazuje inhibitornu aktivnost (MIK=20 mg/mL), a prema *P. aeruginosa* nijedan od ekstrakata zrelih

puhara. Prema kandidi aktivnost pokazuje samo VPM (MIK=20 mg/mL). Sazrevanjem, tj. autolizom evidentno dolazi do smanjenja količine aktivnih principa koji se nalaze u micelijumu i mladim plodonosnim telima.

Kalvatinska kiselina je, kao što je ranije rečeno, azoksicijanid sa potentnim antibiotksim dejstvom (Umezawa i saradnici, 1975) i jedno od retkih dobro okarakterisanih i ispitivanih jedinjenja izolovanih iz puhara. Poznato je da kalvatinsku kiselinu sintetiše *H. utrififormis*, a takođe je utvrđeno da je produkuje micelijum više vrsta puhara (Coetzee and van Wyk, 2009), što ukazuje na to da je ovo jedinjenje inheretno za celu grupu puhara, i da ga verovatno sintetišu i *H. excipulliformis* i *V. pratense*. Ne postoje podaci da se kalvatinska kiselina akumulira u micelijumu i plodonosnim telima puharama, ali je poznato da su njeni derivati izolovani iz plodonosnih tela nekih vrsta (Kamo i saradnici, 2005, Fugmann i saradnici, 2001), međutim stadijum razvoja plodonosnih tela nije poznat. Ukoliko je kalvatinska kiselina prisutna u plodonosnim telima ispitivanih puhara i ukoliko je odgovorna za antimikrobnu aktivnost, evidentno je da se u tom slučaju njena koncentracija značajno smanjuje prilikom sazrevanja. Nepostojanje standarda onemogućilo je njenu eventualnu detekciju u ekstraktima.

Određena polifenolna jedinjenja i slobodne masne kiseline poseduju antimikrobnu aktivnost, pokazala su istraživanja (Singh i saradnici, 2017; Kabara i saradnici, 1972). Međutim, kod aktivnosti ekstrakata ne postoji korelacija u količini masnih kiselina i/ili fenola i njihove aktivnosti. Ekstrakti zrelih puhara bogatiji su ovim grupama jedinjenja ali je njihova aktivnost slabija. Veći deo ekstrakata nije mogao da bude hemijski definisan a u gljivama postoji mnogo različitih sekundarnih metabolita koji bi mogli da budu odgovorni za delovanje.

Činjenica da ekstrakti zrelih puhara nisu tako aktivni prema bakterijama isključuje mogućnost da gleba zrelih puhara pomaže zarastanju rana zahvaljujući antimikrobnoj aktivnosti.

Tabela 4.7. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata (mg/mL) i standardnih antibiotika ($\mu\text{g/mL}$); amoksicilin (AMX) korišćen je za bakterijske a flukonazol (FLU) za *C. albicans*

	HUMIC		HUI		HUM		HEI		HEM		VPI		VPM		AMX/FLU	
	MIK ¹	MMK ²	MIK	MMK	MIK	MMK	MIK	MMK	MIK	MMK	MIK	MMK	MIK	MMK	MIK	MMK
<i>S. aureus</i>	2.5	- ³	5	-	20	-	5	-	20	-	20	-	20	-	0.17	1.36
MRSA	5	-	2.5	-	20	-	5	20	20	-	20	-	20	-		
<i>E. faecalis</i>	2.5	-	2.5	-	20	-	2.5	-	20	-	-	-	5	20	0.34	2.71
<i>E. coli</i>	10	-	1.25	-	20	-	1.25	-	20	-	5	-	20	-	5.42	21.68
<i>P. aeruginosa</i>	0.625	-	1.25	-	-	-	1.25	-	-	-	10	-	-	-	21.68	43.36
<i>C. albicans</i>	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	50

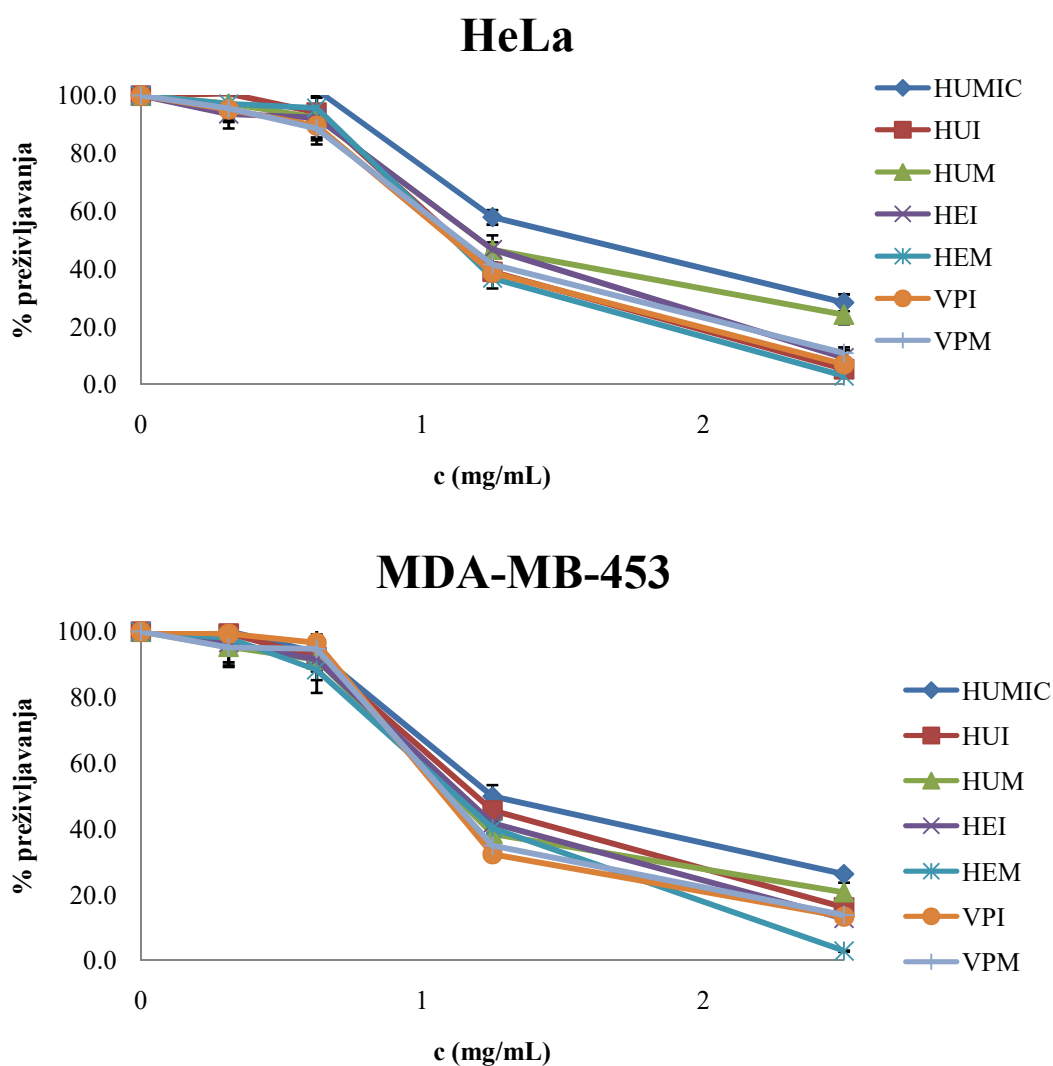
¹Minimalna inhibitorna koncentracija

²Minimalna mikrobicidna koncentracija

³Nema aktivnosti

4.1.3.4. *In vitro* citotoksična/antitumorska aktivnost

Citotoksična aktivnost određivana je na HeLa ćelijama (ćelije humanog karcinoma materice), MDA-MB-453 ćelijama (ćelije humanog karcinoma dojke), kao i mononuklearnim ćelijama periferne krvi zdravih osoba, stimulisanih ili nestimulisanih fitohemaglutininom (PBMC+PHA i PBMC, redom). Svi ekstrakti pokazali su dozno zavisnu citotoksičnu aktivnost prema malignim i perifernim monojedarnim ćelijama krvi (slike 4.10 i 4.11).



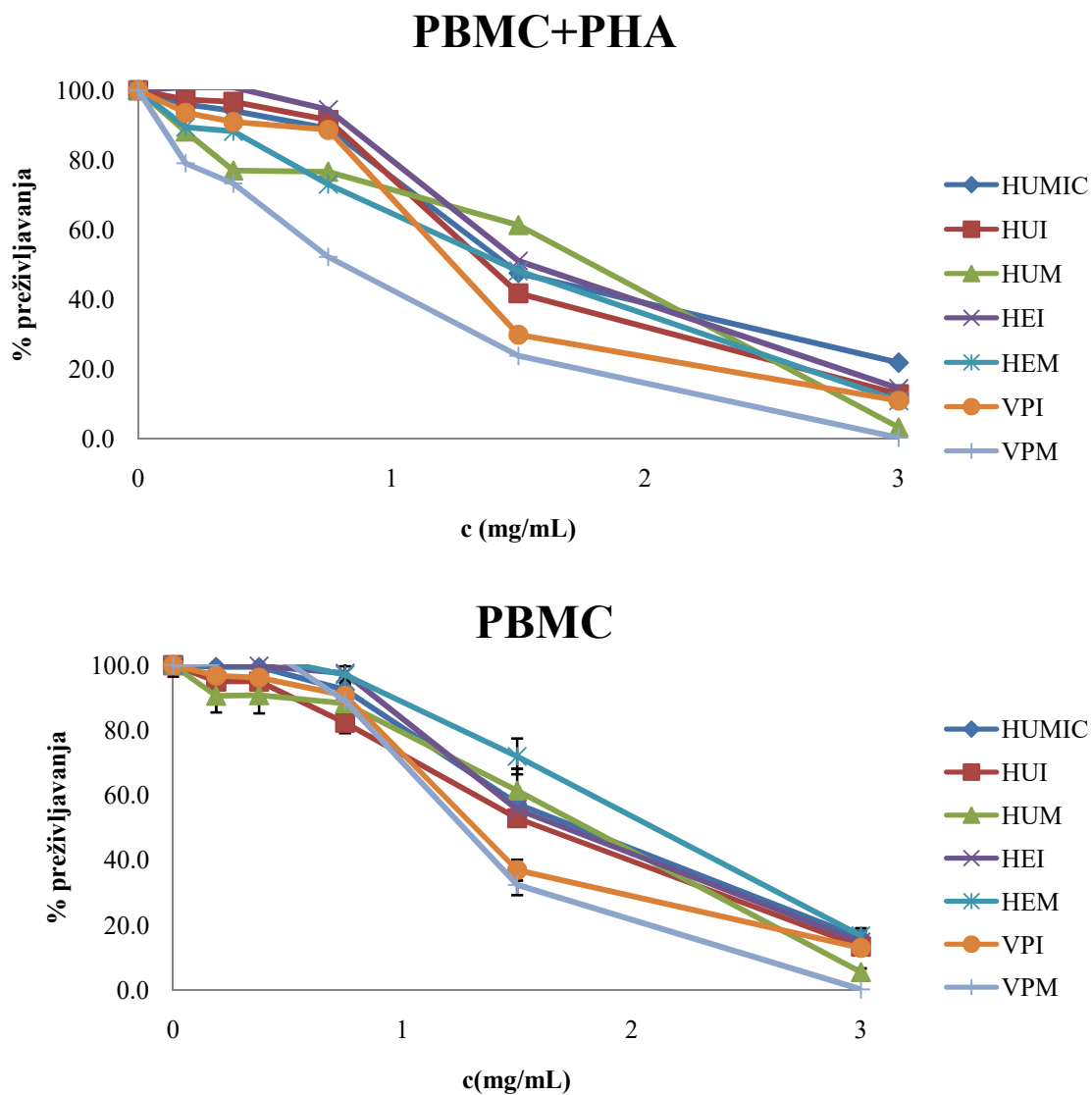
Slika 4.10. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na tumorske ćelijske linije

Sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 0.80-2.10 mg/mL (tabela 4.8), ekstrakti su pokazali umerenu citotoksičnu aktivnost prema ispitivanim ćelijama. I ekstrakti mladih i zrelih plodonosnih tela pokazali su vrlo sličnu aktivnost prema obe tumorske ćelijske linije, u opsegu IC_{50} vrednosti od 1.09-1.24 mg/mL. Ekstrakt micelijuma je pokazao nešto slabiju aktivnost prema obe tumorske ćelijske linije, sa IC_{50} vrednošću od 1.6 mg/mL. Ekstrakti *H. utriformis* i *H. excipuliformis*, i mladih i zrelih plodonosnih tela pokazali su nešto selektivniju aktivnost prema tumorskim ćelijskim linijama, što je naročito izraženo kod ekstrakata zrelih puhara, i posebno kod HEM. VPI ne pokazuje selektivnost, a VPM čak deluje toksičnije prema PBMC+PHA. HUMIC, slično kao VPI, nema selektivnog dejstva prema bilo kojoj od ćelijskih linija.

Ekstrakt zrelih plodonosnih tela *H. excipuliformis* se izdvaja kao posebno značajan uzorak; pri maksimalnoj korišćenoj koncentraciji dovodi do preživljavanja svega nekoliko procenata (<5%) ćelija malignih linija i oko 40, odnosno 30% ćelija PBMC, odnosno PBMC+PHA, redom, dok npr., HUM dovodi do preživljavanja oko 25% ćelija malignih linija i isto toliko ćelija PBMC.

Nekoliko peptidnih struktura sa citotoksičnim dejstvom je izolovano iz različitih puhara, uključujući peptid sličan ubikvitinu iz mladih plodonosnih tela *H. utriformis* (Coetzee and van Wyk, 2009). Slični/isti peptidi mogli bi da budu odgovorni za aktivnost ekstrakata, ali je verovatnije sinergističko delovanje više različitih komponenti; ranije pominjana kalvatinska kiselina takođe poseduje citotoksična svojstva, kao i njeni strukturni analozi, kraniformin i rubroflavin, a koji su izolovani iz nekih vrsta puhara. (Takaishi i saardnici, 1997), Nepostojanje standarda, kao i kompleksnost potencijalnog izolovanja i dokazivanja ovih jedinjenja onemogućilo je utvrđivanje njihovog eventualnog prisustva u ekstraktima. NMR spektar DMSO- d_6 rastvora ekstrakata nije pokazao signale karakteristične za azoksiformonitrilne/azoksiformamide, ali ova jedinjenja su aktivna u niskim koncentracijama pa bi mogla da budu prisutna u koncentracijama koje NMR ne može da detektuje. Nije poznato kako autoliza utiče na citotoksične agense izolovane iz puhara; u ispitivanim zrelim puharama prisutni su aktivni principi selektivnijeg dejstva i one

predstavljaju potencialni izvor citotoksičnih supstanci delotvornih protiv ćelija raka dojke i materice.



Slika 4.11. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na ćelije periferne krvi

Tabela 4.8. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na zdrave i kancerske humane ćelije (mg/mL)

	HUMIC	HUI	HUM	HEI	HEM	VPI	VPM
HeLa	1.61±0.03 ^{a1B2}	1.14±0.02 ^{bD}	1.20±0.10 ^{bB}	1.24±0.03 ^{bC}	1.11±0.11 ^{bC}	1.12±0.01 ^{bC}	1.14±0.08 ^{bA}
MDA-MB-453	1.67±0.05 ^{aB}	1.20±0.01 ^{bC}	1.11±0.09 ^{bB}	1.16±0.01 ^{bD}	1.12±0.07 ^{bC}	1.10±0.02 ^{bC}	1.09±0.12 ^{bA}
PBMC	1.80±0.03 ^{bA}	1.59±0.03 ^{cA}	1.81±0.11 ^{bA}	1.70±0.01 ^{bcA}	2.10±0.10 ^{aA}	1.30±0.02 ^{dA}	1.27±0.12 ^{dA}
PBMC+PHA	1.47±0.01 ^{bC}	1.36±0.01 ^{bcB}	1.79±0.16 ^{aA}	1.51±0.03 ^{bB}	1.44±0.14 ^{bcB}	1.22±0.02 ^{cB}	0.80±0.06 ^{dB}

¹ Različita mala slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

² Različita velika slova u kolonama označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

U zaključku, ekstrakti plodonosnih tela, u zavisnosti od stadijuma razvoja, pokazuju različitu antioksidativnu, antimikrobnu i inhibitornu aktivnost na različite enzime uključene u patološke procese, dok je njihovo citotoksično dejstvo vrlo slično. Aktivnost ekstrakata zrelih plodonosnih tela je superiorna u antioksidativnim metodama i većini metoda koje se odnose na inhibiciju enzima, osim u slučaju inhibicije HMG-CoA reduktaze, gde su bolju aktivnost pokazali ekstrakti mladih plodonosnih tela. Oni su pokazali i bolju antimikrobnu aktivnost, dok je citotoksična aktivnost bila slična. Prema tome, puhare, a naročito zrela plodonosna tela koja više nisu jestiva, predstavljaju odličan izvor različitih farmakološki aktivnih jedinjenja; odlična antioksidativnu aktivnost (naročito u testu inhibicije oksidativne degradacije β -karotena), kao i snažna inhibicija tirozinaze pri relativno niskim koncentracijama, uz ranije komentarisani hemijski sastav, čini zrele puhare i potencijalnim kandidatom za kozmetičke proizvode namenjene nezi kože i tretmanu određenih stanja, kao što je hiperpigmentacija. Micelijum ne može da bude adekvatna zamena za plodonosna tela, jer osim dobrog antimikrobnog dejstva i umerene inhibitorne aktivnosti na acetilholinesterazu, ekstrakti micelijuma nisu mogli da se porede sa aktivnošću ekstrakata plodonosnih tela.

4.2. Analiza polisaharidnih ekstrakata

4.2.1. Prinosi ekstrakcije

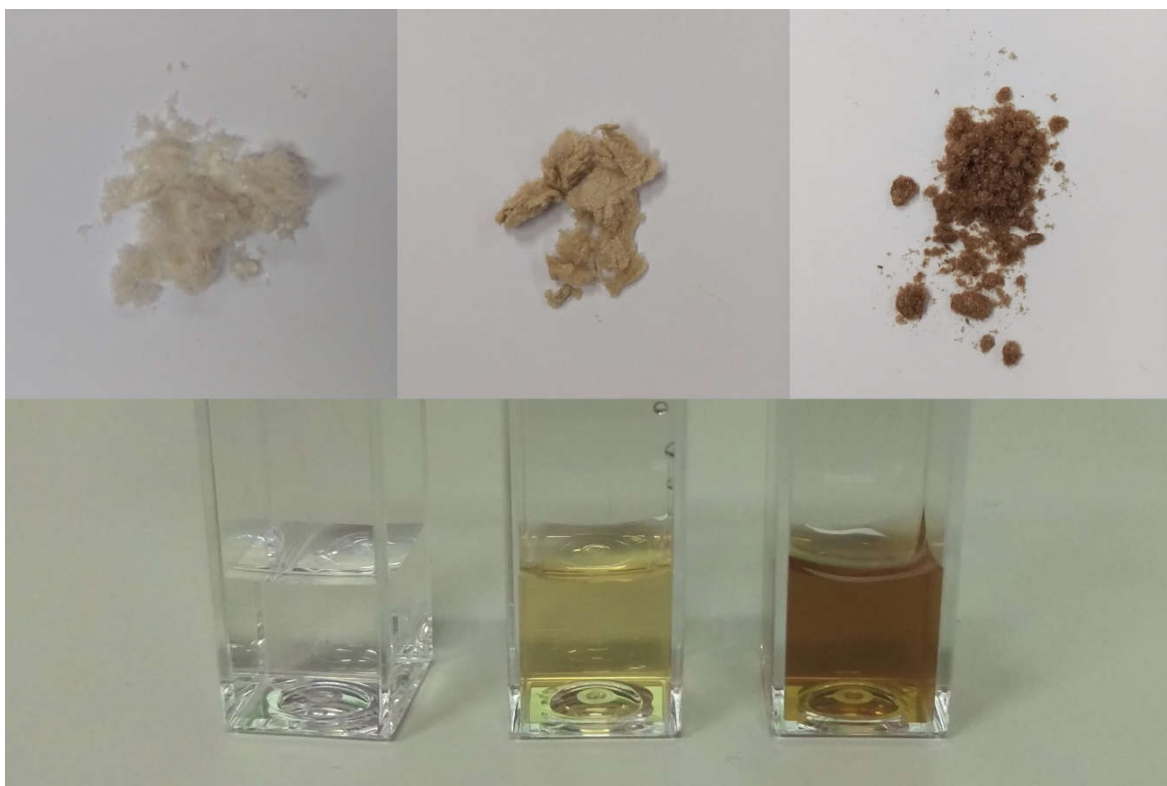
Prinosi vrele vodene ekstrakcije i svakog stepena prečišćavanja dati su u tabeli 4.9. Micelijum i mlada plodonosna tela daju sličan, relativno dobar prinos pri vreloj vodenoj ekstrakciji, odnosno 1g ekstrakta od oko 8.5 g droge (od koje je prethodno pripremljen metanolni ekstrakt). Gleba zrelih plodonosnih tela daje daleko manji prinos – 1g ekstrakta dobija se od čak 31g droge. Time je pretpostavka da hitinoliza može poboljšati ekstrakciju vodorastvornih polisaharida opovrgnuta. Uz hitinolizu, tokom autolize dolazi i do razlaganja i drugih polisaharida. Dijaliza dovodi do velikih gubitaka u masi, što je posebno izraženo kod ekstrakata mladih i zrelih plodonosnih tela. Gubici pri dijalizi ekstrakta micelijuma su manji, oko 37%. Gubitak pri dijalizi ekstrakta mladih plodonosnih tela je oko 50%, dok je gubitak pri dijalizi ekstrakata zrelih plodonosnih tela čak 76%. Ovo ukazuje na to da se makromolekulska frakcija ekstrakata bitno razlikuje i da ekstrakt micelijuma sadrži najveći procenat makromolekula velike molekulske mase, a ekstrakt glebe zrelih plodonosnih tela najmanje – takođe, struktura makromolekula može biti bitan faktor – razgranati polisaharidi teže će proći pore membrane od linearnih, čak iako su iste molekulske mase. Deproteinizacija vodi daljem značajnom gubitku mase ekstrakata, iako proteini ne čine veliki procenat dijalizovanih ekstrakata; ovo se može objasniti nepotpunom prvom dijalizom, ili prisustvom manoproteina i drugih polisaharidno-proteinskih kompleksa – polisaharidni ostaci ovakvih kompleksa bi, nakon deproteinizacije, ukoliko su relativno male molekulske mase mogli da prođu kroz pore membrana i budu odstranjeni. Oko 50% ekstrakata micelijuma i mladih plodonosnih tela je izgubljeno nakon deproteinizacije i oko 26% ekstrakta zrele glebe. Za 1g delimično prečišćene polisaharidne frakcije velike molekulske mase potrebno je 27,6 g suvog micelijuma, 84,8 g suvih mladih plodonosnih tela i 200,8 g glebe zrelih puhara. Poređenja radi, za dobijanje 31 g čistog lentinana, β -glukana iz šitake (*Lentinula edodes*), potrebno je 200 kg svežih pečuraka (Wasser, 2017).

Radi preglednosti, u nekim tabelama korišćene su ranije definisane skraćenice (4.1.1) koje se odnose na poreklo ekstrakata.

Tabela 4.9. Prinosi polisaharidne ekstrakcije, DER¹

	Vreli vodeni ekstrakt	Dijalizovani ekstrakt	Deproteinizovani ekstrakt
Micelijum	8.5	13.5	27.6
Mlada plodonosna tela	8.5	17.0	84.8
Zrela gleba	31.0	129.1	200.0

¹DER – odnos droga:rastvarač (eng. *Drug:Extract Ratio*)

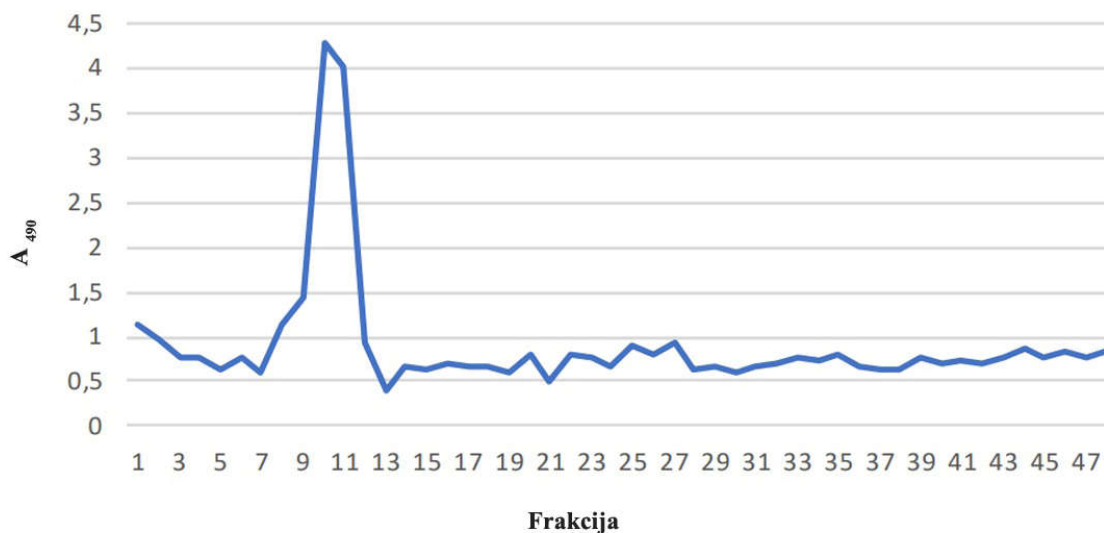


Slika 4.12. Deproteinizovanih polisaharidni ekstrakti micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, sleva nadesno (gore) i odgovarajući vodeni rastvori (c=2 mg/mL)(dole)

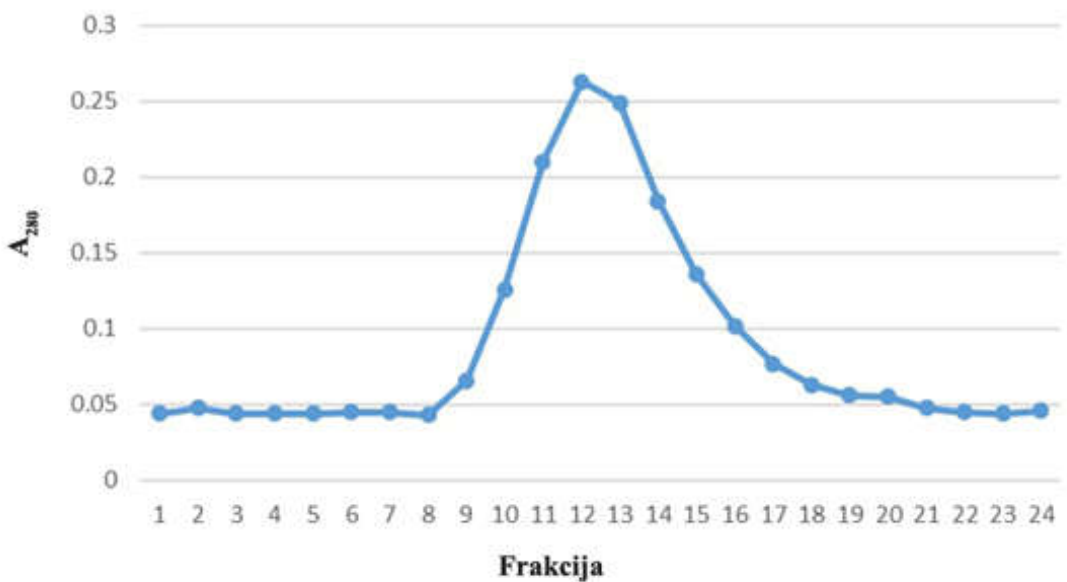
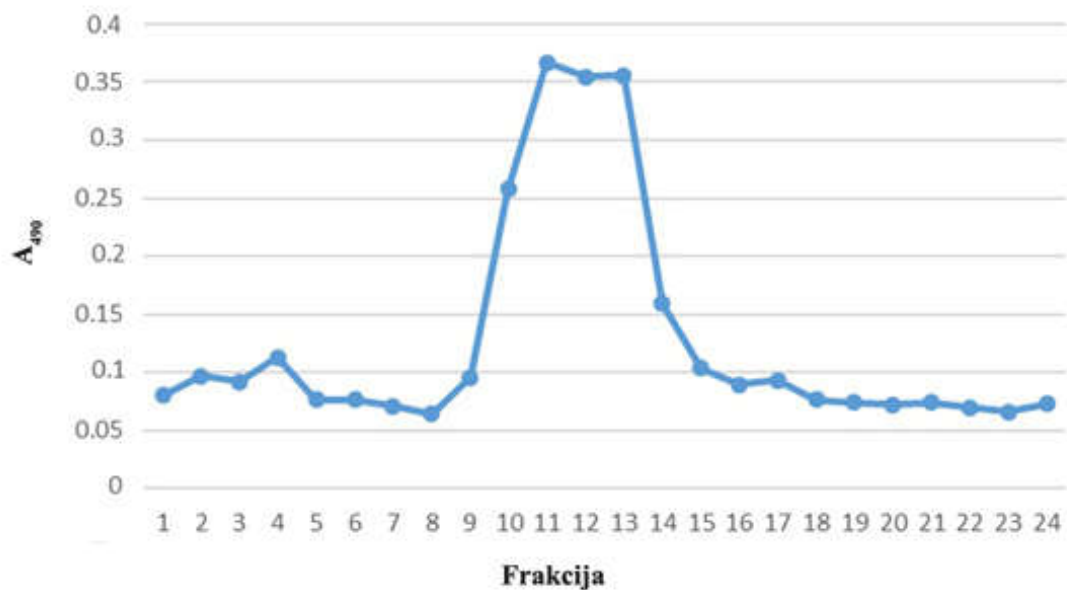
4.2.2. Fizičko - hemijska analiza polisaharidnih ekstrakata

4.2.2.1. Veličina makromolekulske frakcije

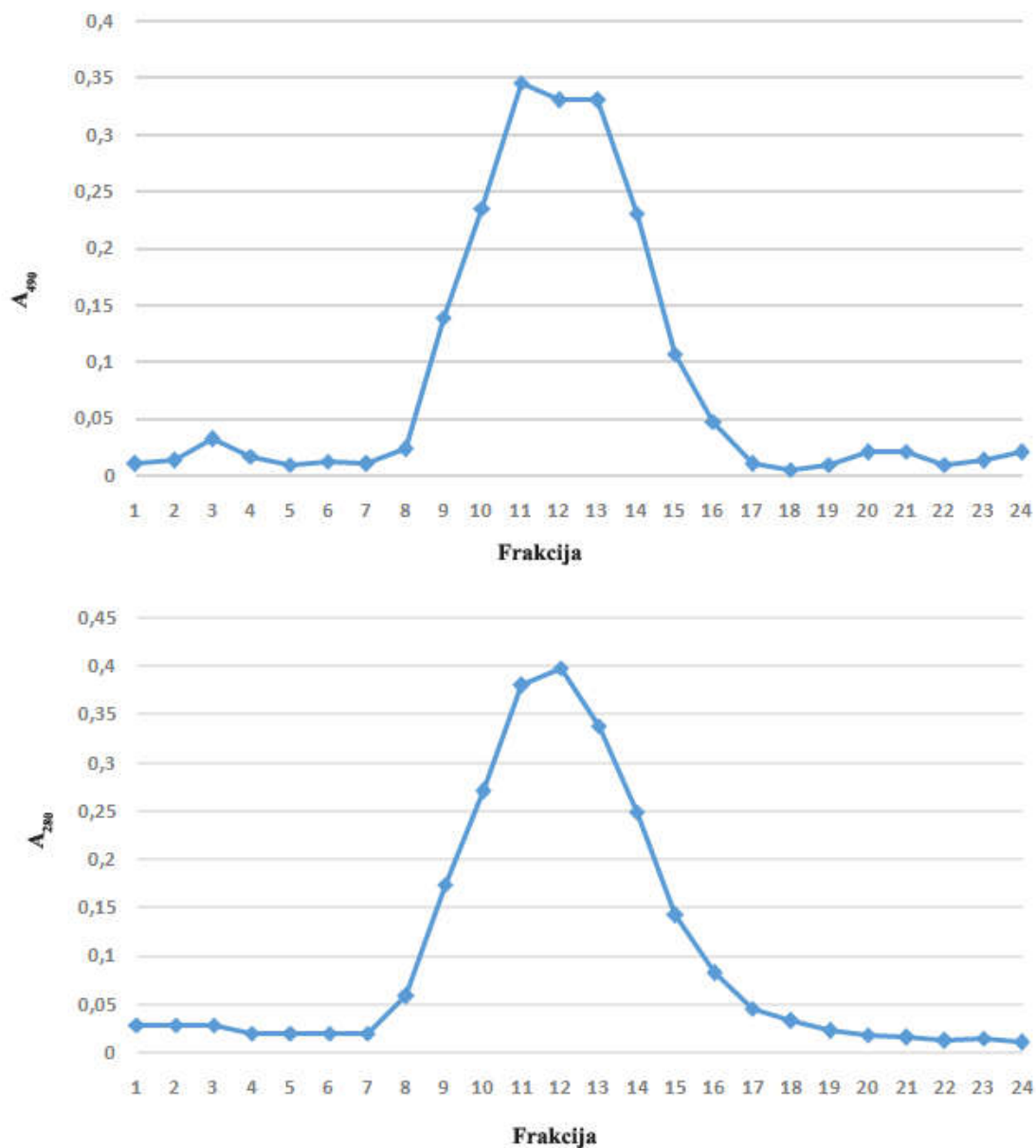
U sva tri slučaja, gel-ekskluzionom hromatografijom na Superdex 75 koloni, dobijena je po jedna relativno homogena frakcija (tj. jedan pik) koja potiče od ugljenih hidrata, a nisko retenciono vreme ukazuju da se radi o makromolekulskim frakcijama većim od 100 kDa (slike 4.13-15); ova frakcija međutim može, i verovatno se sastoji iz više subfrakcija, što nije moglo da bude utvrđeno zbog limita Superdex 75 kolone (razdvajanje molekula do ~100 kDa). U frakcijama sakupljenim tokom eluiranja uzoraka je pored prisustva količine šećera, merena i apsorbanca na 254 nm, čime je vršena detekcija aromatičnih struktura, koje potiču od proteina i drugih nešećernih komponenti. U slučaju ekstrakta micelijuma nije bilo frakcija koje su pokazivale apsorpciju u UV-oblasti što ukazuje na čiste polisaharide; s druge strane, u ekstraktima plodonosnih tela u određenim frakcijama eluata zabeležena je instenzivna apsorpcija na 254 nm, što je naročito bilo izraženo u slučaju zrelih plodonosnih tela, a što ukazuje na prisustvo proteina i drugih molekulskih grupa s aromatičnim grupama. Intenzitet UV apsorpcije koreliše se sa količinom šećera u frakcijama eluata, tj. ovi pikovi se relativno dobro poklapaju. Ovo ukazuje na prisustvo melaninsko/proteinsko-polisaharidnih kompleksa u ekstraktima plodonosnih tela.



Slika 4.13. Gel-ekskluzioni hromatogram polisaaharidnog ekstrakta micelijuma



Slika 4.14. Gel-ekskluzioni hromatogrami polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela; hromatogrami su dobijeni određivanjem ukupnih šećera u frakcijama (gore) i direktnom UV spektrofotometrijom (dole)



Slika 4.15. Gel-ekskluzioni hromatogrami polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela; hromatogrami su dobijeni određivanjem ukupnih šećera u frakcijama (gore) i direktnom UV spektrofotometrijom (dole)

4.2.2.2. *Ugljeni hidrati*

Polisaharidni ekstrakti su podvrgnuti kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi monosaharidnih komponenata koja je obuhvatala:

- 1) kvalitativno određivanje derivatizovanih monosaharida gasno-masenom hromatografijom sa masenom spektroskopijom
- 2) kvalitativno određivanje monosaharidnih komponenti NMR-om nakon kisele hidrolize
- 3) analizu ukupnog sadržaja šećera fenol-sumpornom metodom
- 4) kvantitativno određivanje monosaharida tečnom hromatografijom nakon kisele hidrolize
- 5) određivanje ukupnih, kao i α - i β -glukana u uzorcima komercijalnom enzimskom metodom
- 6) analizu tipa veza u polisaharidima gasno-masenom hromatografijom sa masenom spektroskopijom (GC-MS)
- 7) analizu tipa glikozidnih veza polisaharida NMR-om

GC-MS i NMR spektroskopija, kao i tečna hromatografija, korišćeni su za kvalitativnu analizu šećernih komponenata polisaharidnih ekstrakata.

GC-MS analiza derivatizovanih parcijalno-metilovanih alditol acetata korišćena je pre svega za određivanje tipa veza u polisaharidima, ali je iskorišćena i za kvalitativnu analizu šećera u uzorcima; njom je pouzdano utvrđeno prisustvo glukoze i galaktoze u sva tri uzorka, s tim što je odnos veličine odgovarajućih pikova u uzorcima drugačiji što ukazuje i na različitu zastupljenost ovih šećera; u ekstraktu micelijuma dominira pik koji odgovara glukozi, dok je pik koji odgovara galaktozi daleko manji, što ukazuje da se ovaj šećer nalaz u tragovima i da se šećerna frakcija uzorka gotovo potpuno sastoji od glukoze. U ekstraktima

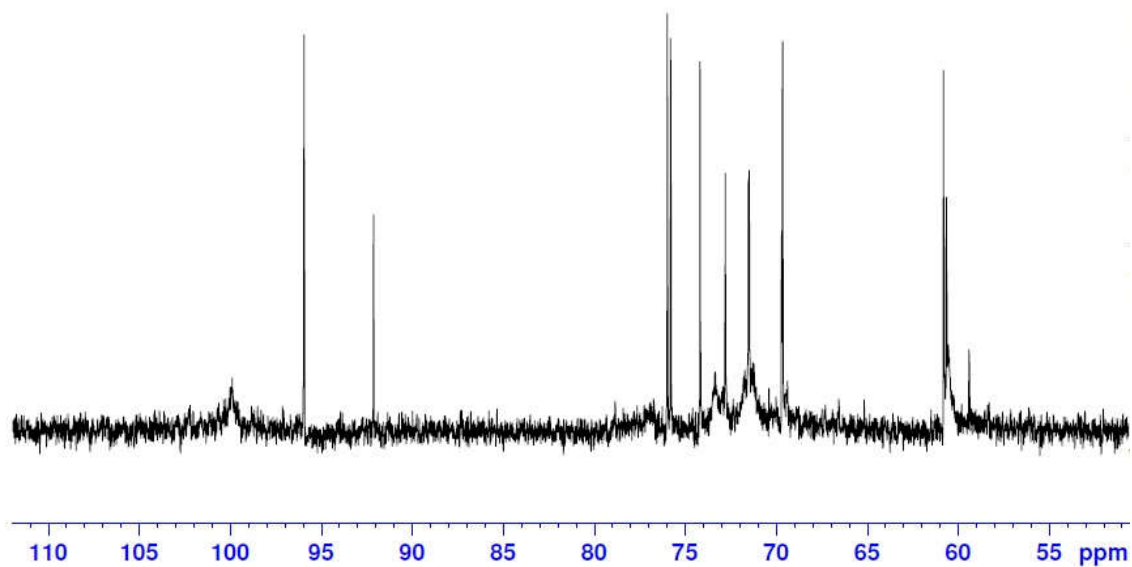
plodonosnih tela se s druge strane, pored glukoze, nalazi i značajan sadržaj galaktoze. U gasnom hromatogramu svih uzoraka postoje pikovi koji nisu mogli da budu pouzdano identifikovani, jer se njihovi maseni spektri ne poklapaju dovoljno dobro sa dostupnim masenim spektrima iz baze podataka. Postoji određen stepen poklapanja nekih od ovih pikova sa derivatima manitola, odnosno manoze, ali on nije zadovoljavajući.

Uzorci su, za kvalitativnu analizu NMR-om i kvantitativnu analizu monosaharida HPLC-om hidrolizovani trifluorosirćetnom kiselinom. Uzorci nisu tretirani kiselinom duže od 6h zbog rizika od stvaranja razgradnih proizvoda šećera.

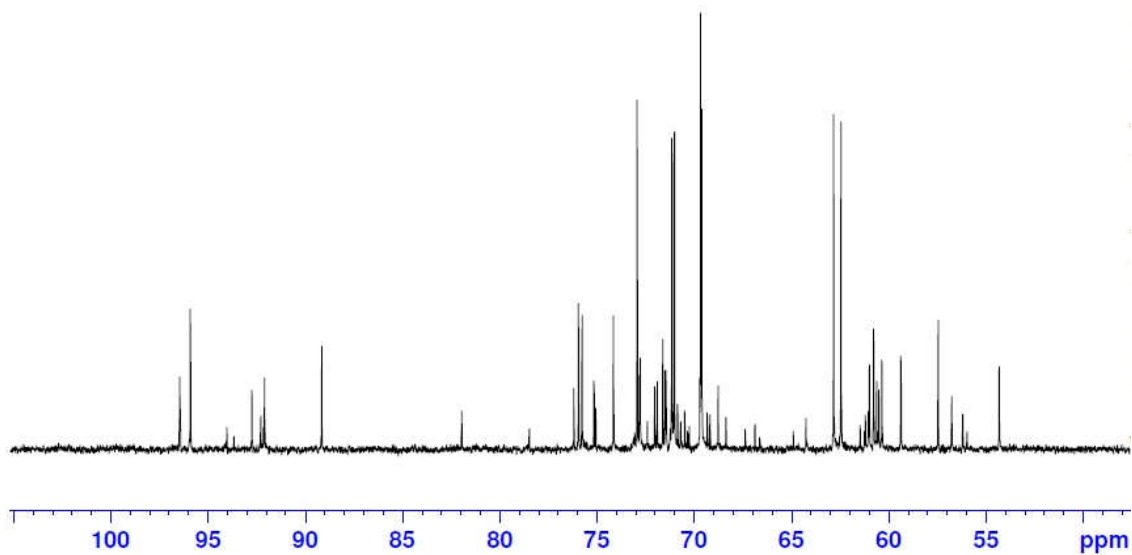
NMR spektroskopija potvrdila je da je u polisaharidnim ekstraktima plodonosnih tela prisutno više šećera, kao i da oni imaju isti šećerni sastav (slike 4.16-18). Pored glukoze (signali anomernih C-atoma na 95.88 i 92.07 ppm, ekstrakti plodonosnih tela sadrže i galaktozu (signali anomernih C-atoma na 96.47 i 92.29 ppm), čiji su signali nešto manje izraženi što sugerise i manju količinu ovog šećera, kao i manozu (signali anomernih C-atoma na 94.04 i 93.67 ppm), koja je, ponovo imajući u obzir jačinu signala, zastupljena u još manjoj meri. Signali rastvora hidrolizata koji su pridruženi ovim šećerima poklapaju se skoro savršeno sa signalima standarda i međusobno se ne preklapaju.

Postoji međutim još signala u oba uzorka koji bi mogli da potiču od još jednog šećera, što je posebno indikovano dodatnim signalima u regionu koji odgovara anomernim ugljenicima šećera. U oba uzorka vidljivi su nedovoljno definisan signal na 96.45, kao i signal na 92.18 ppm, koji se relativno dobro poklapaju sa signalima anomernih ugljenika standarda ksiloze (96.54 i 92.15 ppm). Međutim, drugi signali koji bi poticali od ksiloze se, ili ne korelišu dobro ili se preklapaju sa signalima drugih šećera, tako da potencijalno prisustvo ksiloze nije moglo da bude pouzdano utvrđeno NMR-om; takođe, prisustvo ovog šećera nije utvrđeno GC-MS analizom. S obzirom na to da su ovi signali bliski onima pridruženim galaktozi, jedna od mogućnosti bi bila da je u uzorcima prisutan neki derivat galaktoze, a preleged literaturnih podataka ukazuje pre svega na 3-*O*-metil-galaktozu koja je ranije potvrđena iz više vrsta gljiva, ulazeći u sastav parcijalno metilovanih galaktana.

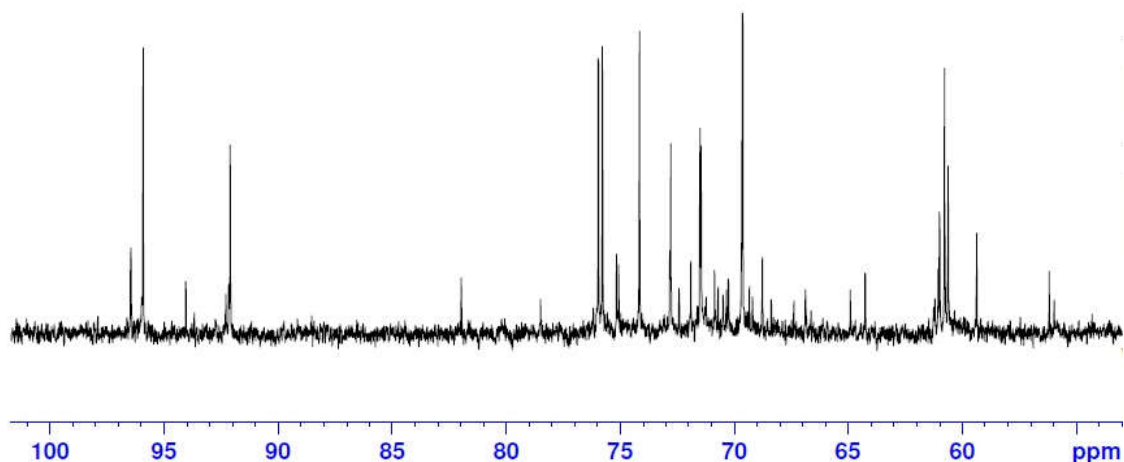
Prisustvo signala na ~56 ppm u ^{13}C spektru hidrolizata, kao i signala na ~3.4 ppm u ^1H spektru ukazuje na prisustvo metoksi (-OCH₃) grupe. Takođe, prisutni su signali koji mogu



Slika 4.16. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta micelijuma

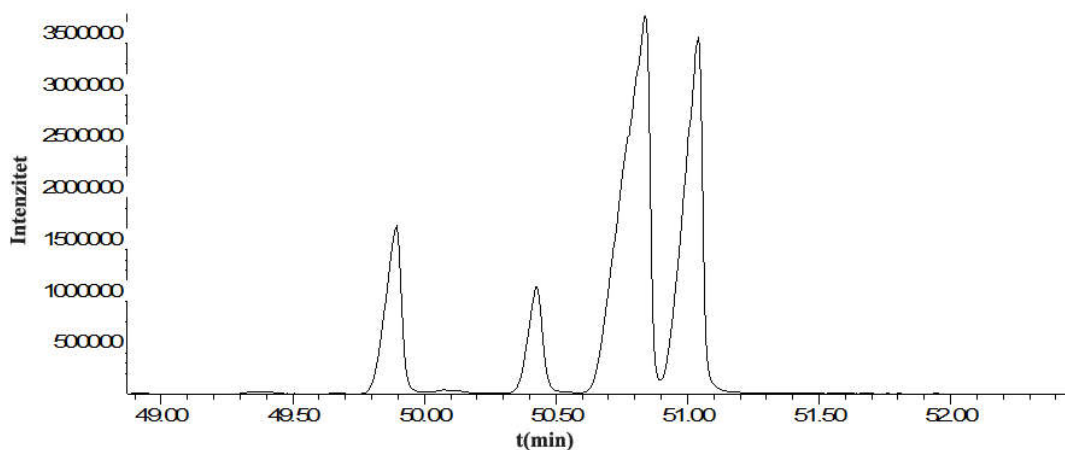


Slika 4.17. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela

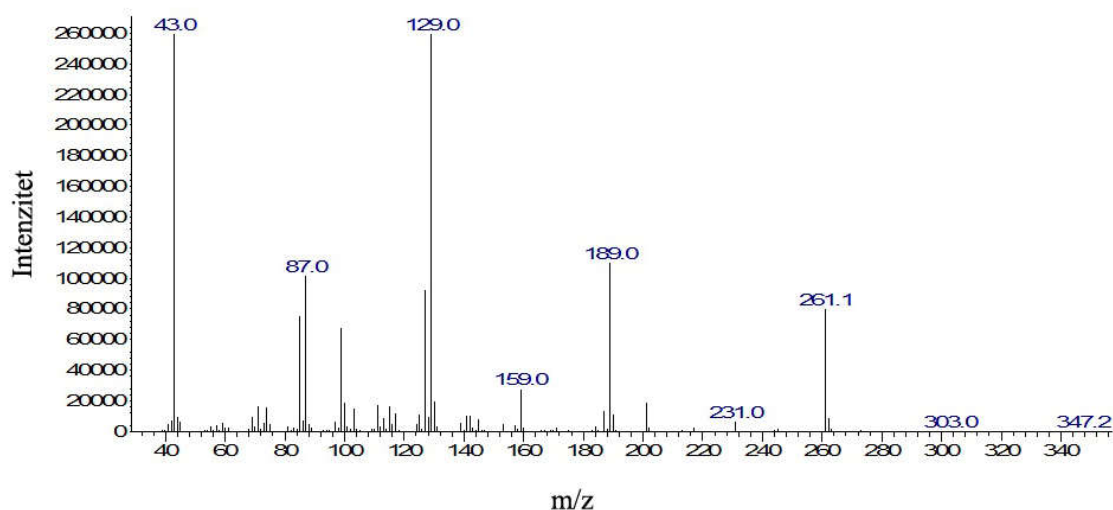


Slika 4.18. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela da se povežu sa pomeranjem signala C3 atoma *O*-metilovane galaktoze (78.5 & 81.98 ppm). Postojanje i ostalih signala koji nisu pridruženi drugim šećerima a čiji se položaj gotovo savršeno koreliše sa međusobnim odnosom položaja signala za α i β anomer 3-*O*-metil- galaktoze određenih od strane Popper i saradnika (2001). Zbog toga je urađena i GC-MS analiza derivatizovanog ekstrakta mladih plodonosnih tela, tj. pripremljenih alditol peracetata i hromatogram je zaista ukazao na prisustvo mono-metilovane heksoze (slika 4.19), pored dominantnih pikova glucitol heksaacetata i galaktitol heksaacetata, koji potiču od glukoze i galaktoze. Na osnovu dostupne digitalne biblioteke podataka o masenim spektrima (Wiley), najveći stepen poklapanja masenog spektra nađen je s derivatom koji bi poticao 4-*O*-metil glukoze (74%), međutim spektar se skoro savršeno poklapa sa masenim spektrom sintetisane 3-*O*-metil galaktoze (Ogawa i saradnici, 1993), sa karakterističnim jonima od 43, 87, 129, 159, 189, 231 i 261 m/z. i gotovo identičnim intenzitetom ovih jona (slika 4.20). Na osnovu svega ovoga, može se gotovo sigurno tvrditi da polisaharidi mladih plodonosnih tela sadrže 3-*O*-metil-galaktozu. Odnos pikova koji odgovaraju derivatima galaktoze i 3-*O*-metil-galaktoze je otprilike 3:1; analiza nije sprovedena na ekstraktu zrelih

plodonosnih tela, ali se zbog prisustva istih signala na NMR spektru koji odgovaraju 3-*O*-metil šećeru može zaključiti da se radi o identičnoj komponenti. 3-*O*-metil-galaktoza poznata je kao gradivna jedinica ćelijskih zidova nekih biljaka i mikroalgi (Popper i saradnici, 2001, Ogawa i saradnici, 1993) a njeno prisustvo je potvrđeno i u nekim vrstama gljiva, u kojima ulazi u sastav α -galaktana, polisaharida sačinjenog od jedinica galaktoze. Prisustvo ovog šećera do sada je potvrđeno u bukovači i srodnim vrstama, *Pleurotus ostreatus* var. "Florida", *Pleurotus ostreatoroseus* (Rosado, 2002; Rosado 2003), *Pleurotus citrinopileatus* (He i saradnici, 2016), kao i lignikolnim vrstama *Phellinus igniarius* (Yang i saradnici, 2007) i *Inonotus levis* (Vinogradov & Wasser, 2005). Oliveira i saradnici (2018) identifikovali su parcijalno metilovan manofukogalaktan u vrsti *Grifola frondosa*; u polisaharidnoj frakciji hrastove brade (*Hericium erinaceus*) utvrđeno je prisustvo drugog metilovanog šećera, 3-*O*-metil-ramnoze (Zhang i saradnici, 2006), međutim njeno prisustvo u uzorcima je malo verovatno s obzirom na to da derivati ramnoze nisu detektovani GC-MS-om, a bilo bi očekivano da, kao deoksi šećer, da karakterističan maseni spektar. S druge strane, 3-*O*-metil-galaktoza, vezana 1,6 vezom, dala bi identičan signal kao i galaktoza vezana istim tipom veze, s obzirom na to da se u toku analize vrši metilovanje uzoraka, tj. dolazi do metilovanja svih slobodnih OH grupa šećera.



Slika 4.19. GC-MS hromatogram alditol acetata, dobijenih derivatizacijom hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela; pikovi su redom pridruženi 3-*O*-metil galaktozi, manozu, glukozi i galaktozi, odnosno njihovim derivatima



Slika 4.20. Maseni spektar mono-metil alditol acetata, identifikovanog kao 3-*O*-metil galaktoza; poklapanje spektra sa sintetskim derivatom 3-*O*-metil galaktoze je skoro savršeno (Ogawa i saradnici, 1993)

Prisustvo signala na oko 15 ppm indikovalo je prisustvo i nekog 6-deoksi šećera, kao što su L-ramnoza i L-fukoza, međutim nepostojanje drugih signala koji bi odgovarali ovim šećerima isključilo je tu mogućnost; ovaj signal mogao bi da potiče iz aminokiseline alanina, koji bi mogao da se nađe u proteinkoj frakciji uzoraka.

Prisustvo signala na oko 160 ppm u oba uzorka, a kojih je više u ekstraktu zrelih plodonosnih tela ukazuje na prisustvo peptidnih veza, odnosno peptidnih molekula u vodorastvornoj frakciji hidrolizata. Ovo se koreliše sa podacima dobijenim UV-spektrofotometrijom, odnosno gel-ekskluzionom hromatografijom, koja je ukazala na prisustvo proteina. Takođe, hidrolizat ekstrakta zrelih puhara ima više signala, od kojih mnogima nije pridružena šećerna komponenta što ponovo ukazuje na veću heterogenost ovog uzorka.

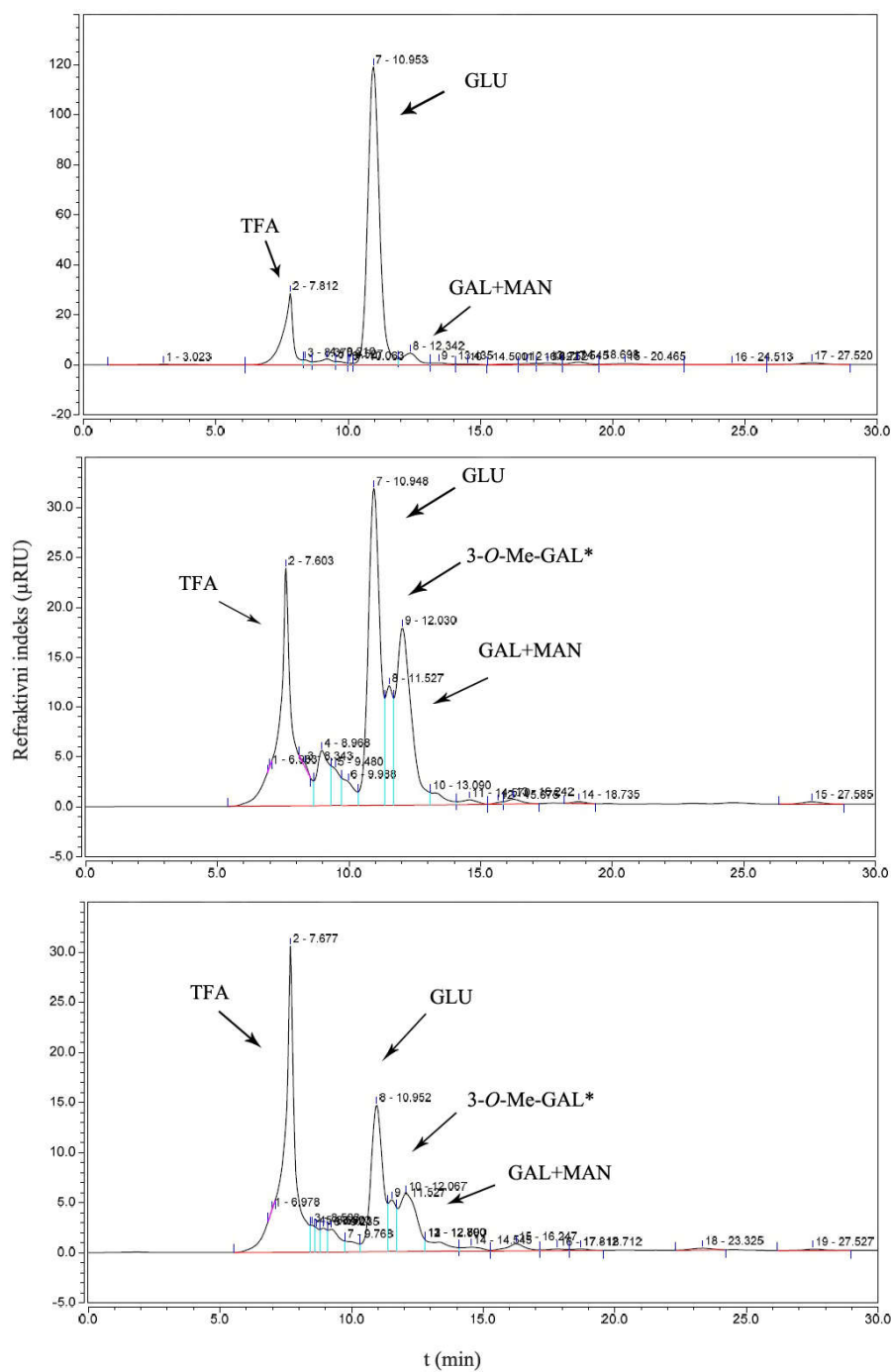
Sumirano, NMR spektroskopija pokazala je da se polisaharidi iz ekstrakata plodonosnih tela sastoje od pretežno glukoze, zatim galaktoze i manoze, uz prisustvo još jednog šećera

koji je najverovatnije 3-*O*-metil-galaktoza. Hidrolizat ekstrakta micelijuma dao je isključivo signale koji odgovaraju α - i β -anomeru glukoze.

Kvantitativni sadržaj šećera utvrđen je fenol-sumpornom metodom i HPLC analizom (tabela 4.10; slika 4.21). Prema fenol-sumpornoj metodi, sadržaj ukupnih šećera u uzorcima je 72.1, 54.2 i 31% za ekstrakte micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, redom, što je relativno mala količina. Obzirom na to da je digestija uzoraka u ovoj metodi relativno kratka, moguće je da ne dolazi do potpune hidrolize polisaharida; takođe, u uzorcima, naročito u ekstraktima plodonosnih tela, prisutni su i drugi šećeri osim glukoze, koja se koristi za konstrukciju kalibracione krive u ovoj metodi. Pokazano je da različiti šećeri imaju različit intenzitet apsorbanace, a glukoza apsorbuje izraženije od nekih drugih čestih monosaharida. (DuBois i saradnici, 1956). Zbog toga je moguće dobijanje manjeg ili većeg sadržaja ukupnih šećera u uzorcima. Galaktoza, za koju je pokazano da je drugi šećer po zastupljenosti od glukoze u ovim uzorcima, daje obojene proizvode koji apsorbuju manje intenzivno od glukoze. Zbog toga su relevantniji rezultati dobijeni HPLC analizom; međutim, preduslov potpune kvantifikacije šećera u uzorcima je njihova prethodna identifikacija i utvrđivanje retencionog vremena za svaku prisutnu šećernu komponentu. Tečna hromatografija hidrolizata polisaharidnih ekstrakata omogućila je i kvantifikovanje pojedinačnih šećera prisutnih u uzorcima. Analiza je pokazala da se ekstrakt micelijuma sastoji gotovo isključivo od glukoze (92%) i galaktoze i manoze u manjoj količini (~5%). Glukoza je glavna šećerna komponenta i u polisaharidnim ekstraktima mladih i zrelih plodonosnih tela, i čini 34.5 i 28 % ovih uzoraka, redom. Drugi šećeri prisutni su u manjoj količini; u oba uzorka, kao što je ranije rečeno, detektovani su i galaktoza i manozna. Ovi šećeri se međutim ne razdvajaju dobro tačnom hromatografijom, jer su njihova retencionna vremena bliska, pa se pikovi delom preklapaju. U oba slučaja međutim, drugi najveći pik na hromatogramu, koji ujedno odgovara drugom najzastupljenijem šećeru, ima retenciono vreme od 12.08 min, što odgovara galaktozi, a ne manozni (retenciono vreme 12.4 min) tako da se ponovo sa velikom sigurnošću može tvrditi da je galaktoza dominantni sekundarni šećer. Kao što je rečeno, u NMR spektru signali koji odgovaraju anomernim ugljenikovim atomima galaktoze su mnogo intenzivniji kod oba uzorka. GC-MS analiza takođe je

potvrdila da je galaktoza zastupljenija od manoze, koja nije mogla da bude ni pouzdano detektovana ovom metodom. Galaktoza i manaza zajedno čine 26.3% polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela, odnosno 12.2% ekstrakta zrelih plodonosnih tela. HPLC analiza isključila je mogućnost prisustva oba ispitivana deoksi šećera, fukoze i ramnoze. Prisustvo ksiloze međutim nije moglo da bude potpuno isključeno, jer je njeno retenciono vreme vrlo blisko galaktozi, mada je njeno prisustvo, kao što je napomenuto, malo verovatno. Kod oba uzorka prisutna je komponenta čije je retenciono vreme 11.5 min, a s obzirom na to da se s velikom sigurnošću može tvrditi da je u oba uzorka prisutna 3-*O*-metil-galaktoza, primenom metode eliminacije, može se pretpostaviti da ovaj pik potiče upravo od ove komponente. Površina ovog pika u oba slučaja odgovara podatku o mogućoj zastupljenosti ovog šećera u uzorcima, na osnovu NMR analize, po kojoj bi on bio treći šećer po zastupljenosti. Dodatno, u slučaju ekstrakta mladih plodonosnih tela, odnos površina pikova koji odgovaraju galaktozi i nepoznatoj komponenti je 2.9, što odgovara odnosu galaktoze i 3-*O*-metil galaktoze utvrđenoj GC-MS analizom alditol acetata. Dakle, ukoliko pomenuti pik zaista potiče od nekog neutralnog šećera, ova komponenta bi činila 9.2% uzorka HUI i 6.5% uzorka HUM. Takođe, HPLC analiza indikuje prisustvo i kiselih pored neutralnih šećera (glukuronske i galakturonske kiseline) ali u veoma malom procentu zbog čega bi njihova detekcija NMR analizom bila otežana. Ukupan sadržaj neutralnih identifikovanih šećera u polisaharidnom ekstraktu mladih plodonosnih tela određenih tačnom hromatografijom iznosi 60.9, a zrelih plodonosnih tela 40.2%. Uz ranije iznetu pretpostavku o retencionom vremenu četvrte šećerne komponente, 3-*O*-metil-galaktoze, ovaj procenat bi bio 70.1, odnosno 46.7 %, redom. Sadržaj šećera može se okarakterisati kao relativno mali, naročito u slučaju zrelih karpofora, ali značajno veći nego onaj određen fenol-sumpornom metodom. Evidentno je da se u vodorastvornoj makromolekularnoj frakciji velike molekulske mase udeo šećera smanjuje.

Za utvrđivanje tipa veza u polisaharidima korišćeni su β -glukanski kit, GC-MS analiza parcijalno metilovanih alditol acetata i NMR.



Slika 4.21. HPLC hromatogrami hidrolizovanih polisaharidnih ekstraktata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, odozgo nadole; TFA - trifluorsirćetna kiselina, GLU - glukoza, GAL+MAN - galaktoza+manoz, 3-O-Me-GAL - 3-O-metilgalaktoza

*Pretpostavljeno retenciono vreme

β -glukanskim kitom je utvrđen sadržaj ukupnih, α - i β -glukana, kao nosioca potencijalnih bioloških aktivnosti. Za HUMIC je utvrđeno da sadrži 82% ukupnih glukana, što ukazuje na nepotpunu enzimsku hidrolizu, pošto je prethodno HPLC analizom utvrđeno da glukoza čini preko 90% ovog uzorka. Od ukupnih glukana preko 66% su α -glukani i približno 15% β -glukani. Veliki sadržaj vodorastvornih α -glukana ukazuje na to da bi ovaj uzorak mogao da se sastoji mahom od glikogena, rezervnog polisaharida gljiva i životinja. Celokupan glukanski sadržaj polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela čine β -glukani; 37%

ekstrakta mladih i 25% zrelih plodonosnih tela. Ovo se dobro koreliše sa ukupnim sadržajem glukoze određenim u uzorcima HPLC analizom (34% i 28%, redom) (tabela 4.10).

Tabela 4.10. Šećerni sastav polisaharidnih ekstrakata *H. utriformis*

	HUMIC	HUI	HUM
Ukupni šećeri (Dubois)(%)	72.1±4.2	54.2±2.7	31.0±2.0
Ukupni šećeri (HPLC)(%)	97.0±1.9	60.9±3.7 (70.1±4.2*)	40.2±1.9 (46.7±2.2*)
Glukoza (%)	92.0±1.7	34.5±2.0	28.0±0.8
Galaktoza + manoza (%)	5.0±0.2	26.3±1.7	12.2±1.1
3-O-metil galaktoza (%)*	-	9.2±0.5	6.5±0.3
Glukani (%)	81.0±4.1	37.0±1.8	25.0±2.2
α-glukani (%)	66.0±2.1	-	-
β-glukani (%)	15.0±2.0	37.0±1.8	25.0±2.2

*Izračunato na osnovu pretpostavljenog retencionog vremena za 3-O-metil galaktozu

GC-MS analizom parcijalno metilovanih alditol acetata utvrđen je tip veze za većinu prisutnih šećera.

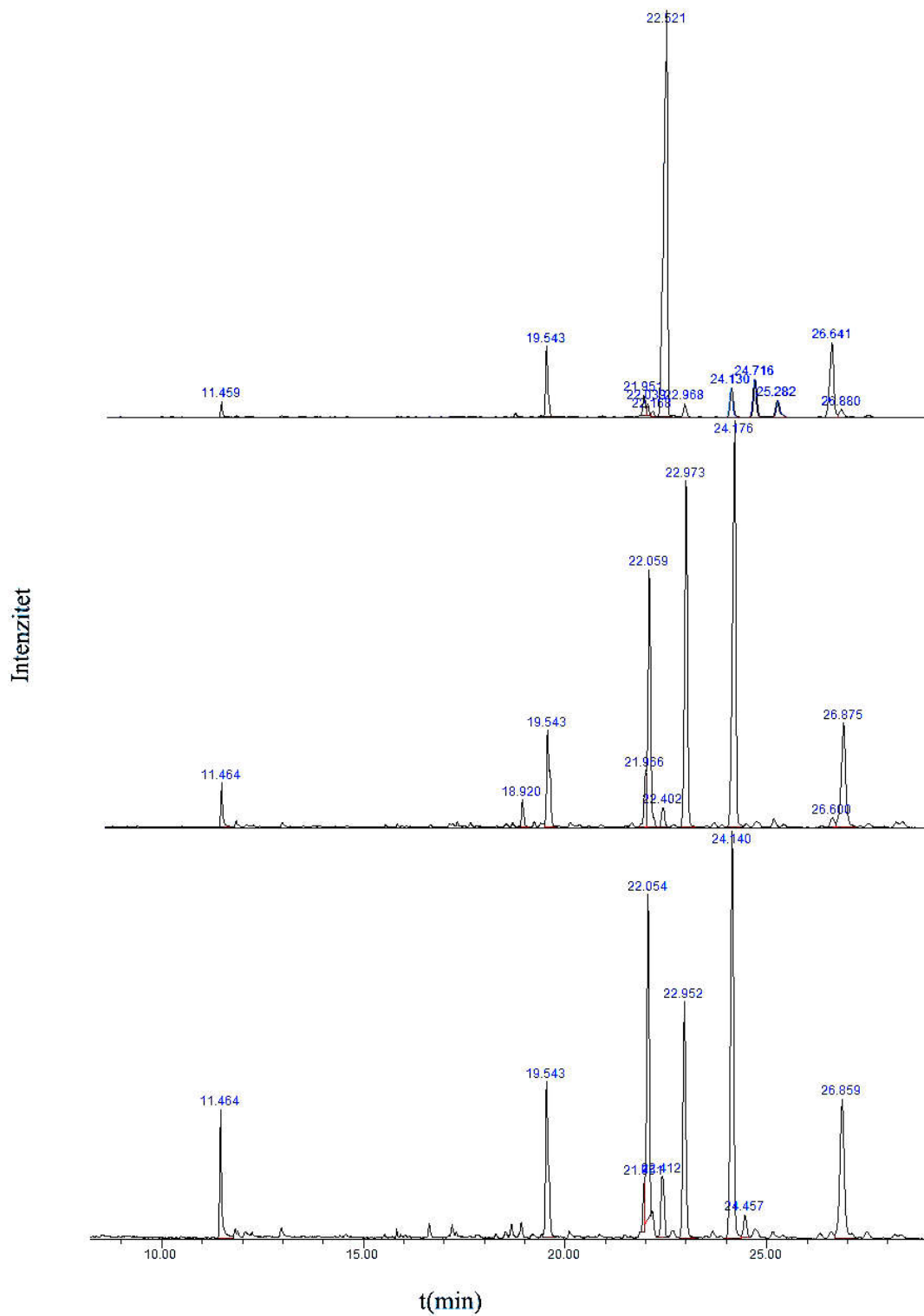
U GC-MS hromatogramu ekstrakta micelijuma (slika 4.22, gore), koji većinski čine α -glukani, dominantan je pik koji potiče od 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil glucitola, koji ukazuje na (1→4) vezane jedinice glukoze, osnovne veze glikogena, rezervnog glijvljeg polisaharida. U uzorku je pouzdano identifikovano prisustvo 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metilglucitola, koji odgovara terminalno vezanim glukoznim jedinicama; takođe, komponenta gotovo identičnog intenziteta čiji se maseni spektar relativno dobro poklapa sa spektrom 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-2,3-di-*O*-metilglucitola ukazuje na prisustvo (1→4),(1→6) vezanih glukoznih jedinica, odnosno povremenog račvanja osnovnog niza u položaju C6, što je karakteristika glikogena, (1→4),(1→6)- α -D-glukana. Odnos površina pikova 1,4,5-tri-*O*-acetil-2,3,6-tri-*O*-metil glucitola i 1,4,5,6-tetra-*O*-acetil-2,3-di-*O*-metilglucitola, podeljenih njihovim molekulskom masama, iznosi 5.5:1, odnosno ukupni procenat glukoznih jedinica račvanja iznosi oko 14%, što ukazuje na visoko-razgranati glikogen. Iz glijva su izolovani strukturno različiti (1→4)- α -D-glukani, koji se razlikuju po stepenu grananja, kao i broju glukoznih jedinica u bočnim nizovima. Amilozi-slični linearni α (1→4) glukani izolovani su iz vrelog vodenog ekstrakta bukovače (*Pleurotus ostreatus*), ali i vrste šampinjona *Agaricus brasiliensis*. Iz pivskog kvasca je izolovan glikogen sa grananjem na svakih 10-14 jedinica (1→4)- α -D-glukanskog lanca. Iz šampinjona (*Agaricus bisporus*), zimske panjevčice (*Flammulina velutipes*) i kordicepsa (*Cordiceps sinensis*) su pak izolovani (1→4)- α -D-glukani sa povremeno supstituisanim jedinicama glukoze osnovnog niza pojedinačnim glukoznim jedinicama u položaju O-6, u odnosu 1:8, 1:7 i 1:10, redom (Synytsya & Novak, 2013). Iz maitake (*Grifola frondosa*) izolovan je veoma razgranat α -glukan sličan glikogenu ("YM-2A") (Masuda i saradnici, 2017).

U hromatogramu ekstrakta micelijuma je prisutno još nekoliko pikova manjeg intenziteta; pik slabog intenziteta poklapa se sa masenim spektrom 1,5,6,-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-glucitola, što ukazuje na prisustvo (1→6) veze; (1→6) vezom mogla bi da bude vezana manje zastupljena β -glukanska frakcija; još dva pika veoma slabog intenziteta daju masene spektre koji se relativno dobro poklapaju sa spektrima 2,4,6-tri-*O*-metil-1,3,5-tri-*O*-acetil i 2,4-di-*O*-metil-1,3,5,6-tetra-*O*-acetil glucitola. Ove komponente ukazivale bi na prisustvo i (1→3), i (1→3),(1→6), odnosno (1→6),(1→3) glukozidnih veza, koje bi isto mogle da se

pripišu β -glukanskoj frakciji; u tom slučaju u uzorku bi mogao da bude prisutan razgranati (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-, odnosno (1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β -D-glukan. Površina ovih pikova čini svega 3.5% ukupne površine hromatograma, što, ako se izuzmu komponente hromatograma koje ne potiču od šećera, odnosno sve komponente čiji identitet nije pouzdano određen, znači da ukupni sadržaj komponenti povezanih sa β -glukanskom frakcijom čini svega 4-5 %; ovo je značajno manje nego što je to utvrđeno β -glukanskim kitom. U veoma maloj količini prisutna je i galaktoza, vezana (1 \rightarrow 6) vezama, na šta ukazuje pik koji potiče od 1,5,6,-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-galaktitola. Galaktoza nije mogla da bude kvantifikovana u ovom uzorku HPLC-om, jer se nalazi u veoma maloj količini. Pikovi koji bi poticali od manoze, čije prisustvo je indikovano HPLC-om, nisu pouzdano utvrđeni

Tabela 4.11. Parcijalno metilovani alditol acetati prisutni u uzorcima i njima pridružene veze, retenciona vremena i maseni fragmenti

Parcijalno metilovani alditol acetat	Tip veze	Retenciono vreme	m/z
2,3,4,6-Me₄-Glu	Glu-(1 \rightarrow	19.54	43,71,87,101,117,129,145,161,205
2,4,6-Me₃-Glu	\rightarrow 3)-Glu-(1 \rightarrow	22.06	43,71,87,101,117,129,161,203,233
2,3,6-Me₃-Glu	\rightarrow 4)-Glu-(1 \rightarrow	22.52	43,87,101,117,129,142,161,233
2,3,4-Me₃-Glu	\rightarrow 6)-Glu-(1 \rightarrow	22.97	43,71,87,101,117,129,161,173,189,233
2,3,4-Me₃-Gal	\rightarrow 6)-Gal-(1 \rightarrow	24.18	43,71,87,101,117,129,161,173,189,233
2,6-Me₃-Glu	\rightarrow 6,4)-Glu-(1 \rightarrow	26.64	43,85,101,117,127,142,159,187,201,261
2,4-Me₃-Glu	\rightarrow 3,6)-Glu-(1 \rightarrow	26.87	43,87,101,117,129,139,159,173,189,233



Slika 4.22. GC-MS hromatogrami parcijalno metilovanih alditol acetata dobijenih derivatizacijom ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela (odozgo nadole)

Gasni hromatogrami ekstrakata plodonosnih tela pokazuju identične pikove (slika 4.22, u sredini i dole), koji potiču od ukupno 5 komponenti, što ukazuje na iste tipove veza, samo se njihov intenzitet međusobno razlikuje. U uzorcima su pouzdano identifikovani pikovi koji potiču od 1,5-di-*O*-acetil-2,3,4,6-tetra-*O*-metil glucitola, 1,5,6,-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-glucitola i 1,5,6,-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-galaktitola. Poklapanje masenih spektara u ova tri slučaja je preko 90%. Pikovi koji potiču od derivata glucitola (odnosno glukoze) ukazuju na prisustvo terminalno vezane glukoze i glukoze vezane (1→6) vezom, kao što je ranije objašnjeno; s obzirom na to da je β-glukanskim kitom potvrđeno prisustvo isključivo β-glukana, proizilazi da su u oba uzorka sigurno prisutni (1→6)-β-D-glukani. Pik koji potiče od 1,5,6,-tri-*O*-acetil-2,3,4-tri-*O*-metil-galaktitola, a koji je veoma izražen, ukazuje na to da je galaktoza u uzorku vezana isto (1→6) vezama, odnosno da ona čini (1→6)-D-galaktan. Drugi tipovi veze nisu potvrđeni za galaktozu (ni terminalni) što ukazuje na to da su i galaktoza i 3-*O*-metil galaktoza vezane istim tipom veze i najverovatnije čine jedinstveni lanac. S obzirom na to da su glukoza i galaktoza najzastupljeniji šećeri, pouzdano se može tvrditi da se šećerna frakcija uzoraka sastoji od (1→6)-β-D-glukanskih lanaca i (1→6)-D-galaktana. Način vezivanja manoze nije razjašnjen, jer nisu pouzdano identifikovani pikovi koji bi odgovarali derivatima ovog šećera ni u uzorcima poreklom iz plodonosnih tela. Manozna bi mogla da čini terminalne lance na drugim polisaharidima i da čini vezu s proteinima npr., da bude deo manoproteina, ili deo heteropolisaharida s obzirom na to da su opisani i manoglukani i manogalaktani ali ne postoji dovoljno dokaza koji bi ukazivali na vezu manoze sa glukoznim ili galaktoznim jedinjcima.

Dva pika koja nisu mogla da budu identifikovana softverskim bazama podataka masenih spektara, a koja su značajnog intenziteta, identifikovana su sa velikim stepenom poklapanja na osnovu literaturnih podataka (Oliveira i saradnici, 2015), pri čemu je uzet u obzir njihov položaj u hromatogramu, odnosno redosled retencionih vremena i maseni spektri. Ovi pikovi identifikovani su kao 2,4,6-trimetil-1,3,5-triacetil glucitol (intenzivniji) i 2,4-dimetil-1,3,5,6-tetraacetil glucitol (manjeg intenziteta), koji ukazuju na (1→3) i (1→3),(1→6), odnosno (1→6),(1→3) vezane glukozne jedinice, tj. prisustvu β(1→3) glukanskih lanaca,

kao i na prisustvo grananja u lancima, tj. $\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)$ ili $\beta(1\rightarrow6)(1\rightarrow3)$ glukana, u zavisnosti od toga da li je glavni lanac vezan $(1\rightarrow3)$ ili $(1\rightarrow6)$ vezom, kao što je objasnjeno u slučaju ekstrakta micelijuma. U slučaju ekstrakata plodonosnih tela pouzdano može da se tvrdi da su glukani prisutni isključivo u β -konfiguraciji, jer u njima oni čine celokupnu glukansku frakciju. Pik koji potiče od $(1\rightarrow3)$ vezane glukoze u slučaju ekstrakta zrelih plodonsnih tela jačeg je intenziteta od onog koji odgovara $(1\rightarrow6)$ vezanoj glukozi, što ukazuje na veći sadržaj $(1\rightarrow3)$ - β - od $(1\rightarrow6)$ - β - glukanskih lanaca.

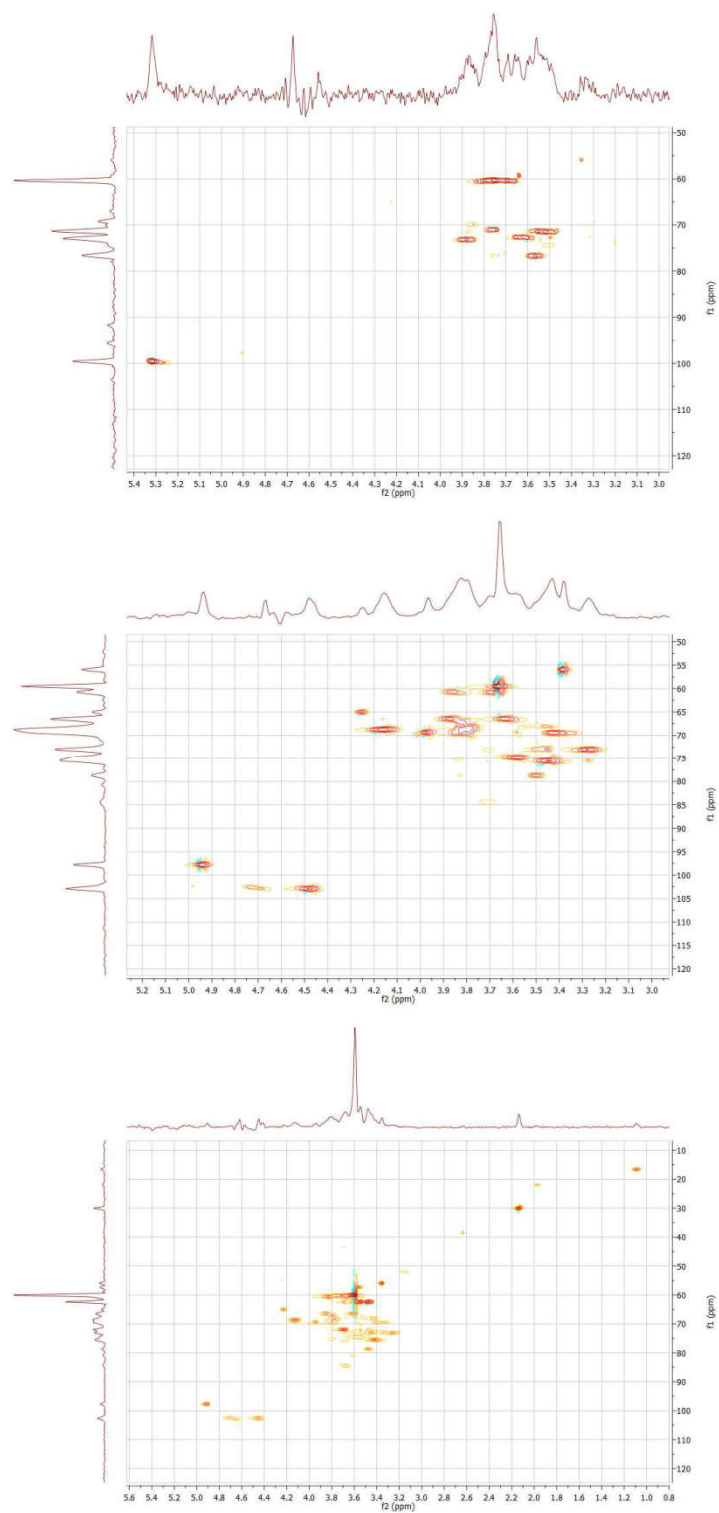
NMR analiza polisaharidnih ekstrakata podrazumevala je analizu prewashodno HSQC spektara D_2O rastvora uzoraka. HSQC spektri, koji pokazuju korelaciju ^{13}C i 1H atoma i ukazuju na međusobne veze ugljenika i vodonika, dali su jasniji uvid u strukturu polisaharida u ekstraktima.

U HSQC spektru ekstrakta micelijuma uočava se signal anomernog ugljenika na 99.52/5.32 ppm, što ukazuje na prisustvo α -vezane glukoze, a što potvrđuje da se uzorak većinski sastoji od α -glukana nalik glikogenu. Još jedan, slabiji anomerni signal na 97.72/4.91 pridružen je terminalno vezanim glukoznim jedinjcima, odnosno jedinjcima neredukujućeg kraja. Signal na 76.71/3.57 ukazuje na prisustvo $\alpha(1\rightarrow4)$ veze. S druge strane, signali koji bi mogli da se povežu sa $\alpha(1\rightarrow6)$ vezama, 66.44/3.60 i 66.66/3.87, odnosno glukoznim jedinjcima račvanja su veoma slabo izraženi. Pretpostavljeni način vezivanja manje zastupljenih β -glukana u ovom uzorku, na osnovu GC-MS analize, $(1\rightarrow6)$ i $(1\rightarrow3)$, nije mogao da bude potvrđen NMR spektrima, što dodatno potvrđuje da se β -glukani u ekstraktu micelijuma nalaze u mnogo manjoj količini nego što je to pokazao β -glukanski kit.

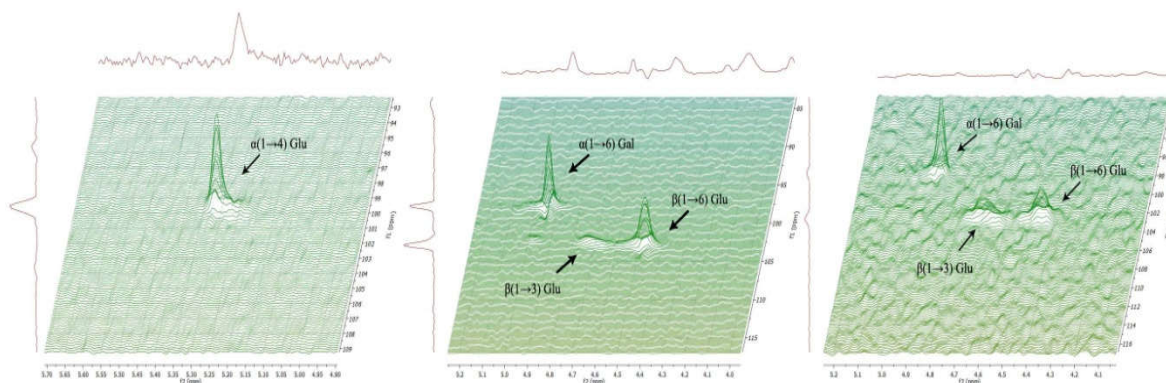
U ekstraktima plodonosnih tela prisutni su signali anomernih ugljenika na skoro identičnim položajima što potvrđuje da su polisaharidi u ovim uzorcima ne samo istog šećernog sastava već i iste/slične strukturne organizacije, na šta je ukazala i GC-MS analiza. Prisustvo više signala C1 visoke frekvence, skoncentrisanih u regionima oko δ 102.5/4.7 i 103/4.5, odnosno ukazuje na β -vezanu glukozu, ali i više od jednog tipa veze. NMR analiza dodatno je potvrdila prisustvo glukanskih lanaca vezanih $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidnim vezama; tipični signali anomernog C-atoma $\beta(1\rightarrow6)$ glikozidnih veza vidljivi su na δ 102.95/4.48,

odnosno 102.64/4.45 u HSQC spektru ekstrakta mladih, odnosno zrelih plodonosnih tela, redom. Takođe, u oba uzorka identifikovani su izraženi signali koji potiču od pomeranja signala C6-supstituisanog atoma na δ 68.74/4.16 i 68.68/3.81, odnosno δ 68.68/4.12 i 68.63/3.79, u spektrima ekstrakata mladih, odnosno zrelih plodonosnih tela, redom. Daljom analizom se međutim uočava da signale pridružene $\beta(1\rightarrow6)$ vezama čine po dva bliska signala (slika 4.25), što ukazuje na prisustvo dva različita tipa $\beta(1\rightarrow6)$ vezanih jedinica glukoze, tj. prisustvo račvanja u $(1\rightarrow6)$ - β -D-glukanskom lancu, odnosno na dodatnu supstituciju na pojedinim glukoznim jedinicima. Prisustvo slabo definisanog signala u regionu δ 84.5/3.7 u oba uzorka potvrđuje postojanje $\beta(1\rightarrow3)$ veze, i ovaj signal bolje je izražen u ekstraktu zrelih plodonosnih tela, kako sugerise i GC-MS analiza. I drugi signali koji mogu da se povežu sa $\beta(1\rightarrow3)$ vezanim glukoznim jedinicama su prisutni, mada se dobrim delom preklapaju sa signalima koji bi poticali i od terminalno vezane glukoze. Ovi signali ponovo su bolje definisani u ekstraktu zrelih plodonosnih tela. Tako se “anomerni” signali na δ 102.58/4.73 i 102.84/4.69, odnosno δ 102.49/4.70 i 102.73/4.67 u spektrima mladih, odnosno zrelih plodonosnih tela, redom, stapaju u jedan “razvučeni” signal, koji može da se poveže sa $\beta(1\rightarrow3)$ glikozidnim vezama ali i terminalno vezanom glukozom. Signali u regionu δ 60.78/3.85 i 60.78/3.69 (ekstrakt mladih plodonosnih tela), odnosno δ 60.58/3.82 i 60.58/3.60 (ekstrakt zrelih plodonosnih tela) potiču od nesupstituisanih C6 atoma i takođe mogu da se povežu sa terminalnim i $\beta(1\rightarrow3)$ glukoznim jedinicama.

S obzirom na to da su signali koji potiču od $\beta(1\rightarrow6)$ veza bolje definisani i jačeg intenziteta od onih koji potiču od $\beta(1\rightarrow3)$ veza (slika 4.24 i 4.25), može se pretpostaviti da su u uzorcima prisutni $(1\rightarrow6)$ - β -D-glukani, koji su razgranati, tj. povremeno se račvaju, u položaju C3, odnosno da je najveća verovatnoća da su u polisahardinim ekstraktima plodonosnih tela prisutni $(1\rightarrow6)$, $(1\rightarrow3)$ - β -D-glukani. NMR analiza ne može međutim da isključi prisustvo i drugih vidova organizacije glukanske frakcije koji uključuju $(1\rightarrow6)$ - β - i $\beta(1\rightarrow3)$ vezu.



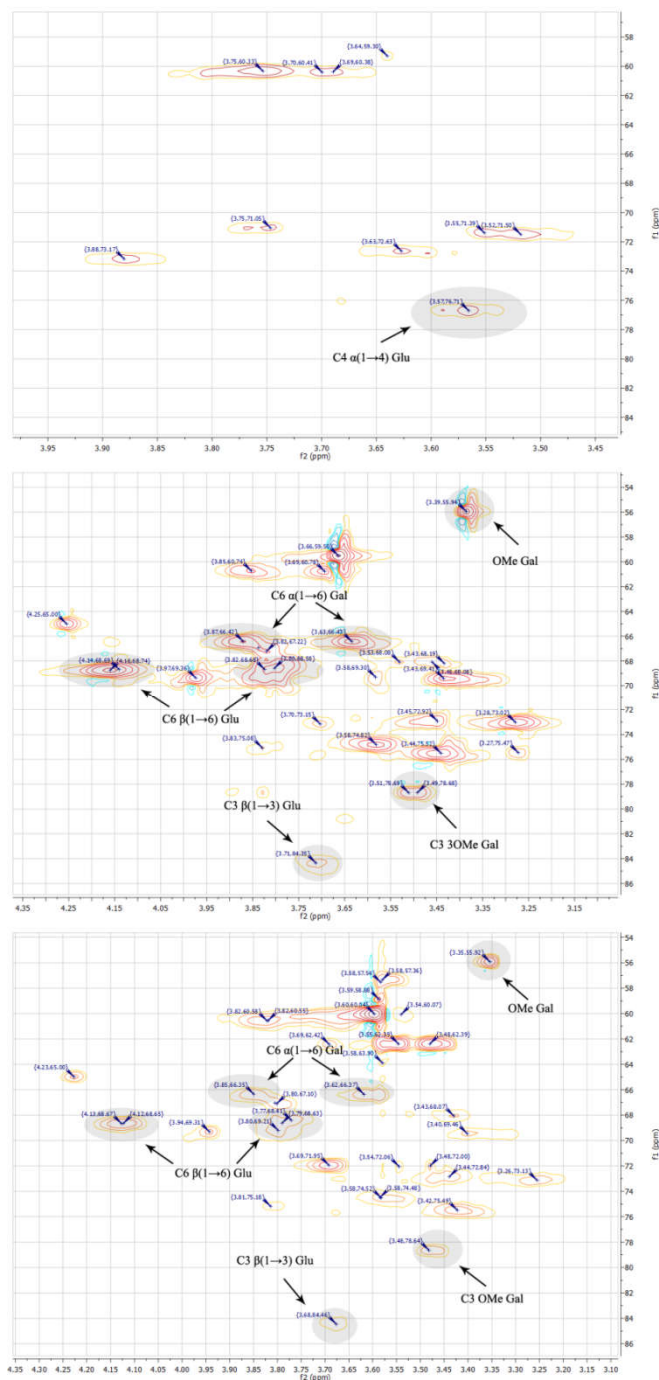
Slika 4.23. HSQC NMR spektri polisaharidnih ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, redom, odozgo nadole



Slika 4.24. Anomerni regioni HSQC NMR spektara, redom, ekstrakta micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela

Ukoliko se pretpostavi da glukanska frakcija uzoraka predstavlja isključivo razgranati $(1\rightarrow6)(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glukan}$, na osnovu odnosa površine pikova derivata glucitola (odnosno glukoze) u gasnom hromatogramu mogu se dati pretpostavke o detaljnijoj strukturi ovakvog glukana; odnos terminalne veze, $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow6)$ i $\beta(1\rightarrow6),(1\rightarrow3)$ veza u ekstraktu mladih plodonosnih tela je približno 1:2:3:1 (tabela 4.12). Ovo ukazuje na to da najverovatniju strukturu glukana čini osnovni $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glukanski}$ lanac kod koga je u proseku svaka 4. glukozna jedinica supstituisana u položaju C3 kratkim $\beta(1\rightarrow3)$ lancima, koje u proseku čine ukupno 3 glukozne jedinice, uključujući i terminalnu (slika 4.27). Zaključke o pravilnosti grananja i broja glukoznih jedinica u bočnim granama nije moguće doneti. Mogućnost postojanja dodatnih, linearnih $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-}$ i $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glukanskih}$ lanaca nije moguće potuno isključiti. Međutim, signali u NMR spektrima koji potiču od $\beta(1\rightarrow3)$ vezanih glukoznih jedinica su, kao što je rečeno, slabo definisani, naročito signali koji potiču od same $\beta(1\rightarrow3)$ veze. Postojanje odvojenog $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glukanskog}$ lanca je s druge strane verovatnije, jer postoji mogućnost da se u uzorak sastoji od $(1\rightarrow6)(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-glukana}$ s visokim stepenom grananja (npr., s grananjem na svakoj 2. ili 3. umesto 4. glukoznoj jedinici osnovnog $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glukanskog}$ skeleta) i linearnog $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glukana}$. Sve tri strukture su ranije izolovane iz gljiva, međutim linearni $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-glukani}$ okarakterisani su iz iz alkalnih ekstrakata i mahom su vodo-nerastvorni; oni uključuju

glukane izolovane iz gljiva *Poria cocos* (pahiman), *Termitomyces eurhizus*, *Ganoderma lucidum* itd (Synytsya & Novak, 2013; Chakraborty i saradnici, 2006, Jin i saradnici, 2003).



Slika 4.25. Regioni karakterističnih veza u HSQC NMR spektrima polisaharidnih ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, odozgo nadole, redom

Linearni (1→6)-β-D-glukani su poznati iz pivskog kvasca, lihenizovanih gljiva, ali su izolovani i iz šampinjona *Agaricus bitorquis*, *A. brasiliensis*, gljiva *Bulgaria inquinans*, *Phellinus baumii* kao i somatskog hibrida gljiva *Pleurotus florida* i *Volvariella volvacea* (Pflo Vv5 FB) i većinom su vodo-rastvorni (Synytsya & Novak, 2013; Ge i saradnici, 2010; Lukša i saradnici, 2015; Das i saradnici, 2010). Iz pomenutog somatskog hibrida Pflo Vv5 FB Maity i saradnici (2013) izolovali su (1→6)(1→3)-β-D-glukan sa bočno vezanom po jednom glukoznom jedinicom. Razgranati (1→6)(1→3)-β-D-glukan povremeno supstituisan kratkim lancima vezanim β(1→3) vezama na C3 je opisan iz, takođe pomenute, relativno srodne vrste šampinjona, *Agaricus brasiliensis* (kao *A. blazei*), kao i iz gljive *Grifola frondosa* (Dong i saradnici, 2002; Nanba i saradnici, 1987; Synytsya & Novak, 2013). Na NMR spektrima ovih polisaharida takođe se može uočiti da su signali koji potiču od β(1→3) veza, tj. supstituisanog C3 atoma, značajno slabijeg intenziteta od drugih signala.

Glukanska frakcija ekstrakta zrelih plodonosnih tela sadrži, kao što je rečeno iste gradivne elemente, ali je njihov odnos nešto drugačiji, sa većim sadržajem β(1→3) od β(1→6) veza. Takođe, jedinice račvanja su učestalije i ponovo odgovaraju sadržaju terminalnih veza. Odnos terminalnih, β(1→3), β(1→6) i β(1→6),(1→3) veza u ovom uzorku je približno 2:4:3:2 (tabela 4.12), što ukazuje da, ako se ponovo pretpostavi da je cela glukanska frakcija β(1→6),(1→3) tipa, osnovni (1→6)-β-D-glukanski lanac grana se u proseku na svakih 1.5 glukoznih jedinica, i da se bočni (1→3)-β-lanci u proseku sastoje od 3 glukozne jedinice, uključujući terminalnu (slika 4.27). S obzirom na veći sadržaj β(1→3) veza, ne može se međutim isključiti mogućnost o drugačijoj organizaciji lanaca, tj. postojanja osnovnog (1→3)-β-lanca koji se grana povremeno u položaju O-6, ili postojanja oba tipa lanaca. Camelini i saradnici (2005) dali su pretpostavku da se sadržaj β(1→3) veza povećava u šampinjonu *Agaricus brasiliensis* sa sazrevanjem plodonosnog tela; nije poznato zbog čega do ovoga dolazi ali bi u slučaju puhara mogla da postoji mogućnost da prilikom autolize dolazi do hidrolize manje razgranatih glukana i eventualno linearnih (1→6)-β-D-glukanskih struktura čije prisustvo nije moglo da bude isključeno iz ekstrakata mladih plodonosnih tela, i da ostaju frakcije većeg stepena grananja. Autori su takođe

zaključili da su se razgranati glukani nalazili pre svega u vodenom ekstraktu, dok su se linearni i slabo razgranati glukani nalazili u alkalnoj frakciji, što je inače utvrđeno od strane više autora (Synytsya & Novak, 2013). Postoji mogućnost i o drugačijoj strukturnoj organizaciji glukana germinativnih hifa koje se nalaze u mladom tkivu i glukana kapilicijuma, odnosno sterilnih hifa i zrelih spora (mada je verovatnoća ekstrakcije glukana iz spora vrelom vodom mala) koje se nalaze u zreloj glebi, tj. da su u njima prisutni (1→6)(1→3)-β-D-glukani s većim stepenom grananja, ili pak (1→3)(1→6)-β-D-glukani, mada je dokaza više za pretpostavljenu β(1→6),(1→3) organizaciju.

Tabela 4.12. Približni izračunati molarni odnos glukoznih jedinica određenih tipova veze u glukanskoj frakciji uzoraka; vrednosti su dobijene deljenjem površine pikova molekulskom masom derivata; 2,3,4,6-Me₄-Glu – 2,3,4,6-tetrametil glucitol diacetat, 2,4,6-Me₃-Glu – 2,4,6-trimetil glucitol triacetat, 2,3,6-Me₃-Glu – 2,3,6-trimetil glucitol triacetat, 2,3,4-Me₃-Glu – 2,3,4 – trimetil glucitol triacetat, 2,4-Me₃-Glu – 2,4-dimetil glucitol tetraacetat, 2,6-Me₃-Glu – 2,6-dimetil glucitol tetraacetat

Parcijalno metilovani alditol acetat	Tip veze	Približni molarni odnos		
		HUMIC	HUI	HUM
2,3,4,6-Me ₄ -Glu	Glu(1→	2	1	2
2,4,6-Me ₃ -Glu	→3)Glu(1→		2	4
2,3,6-Me ₃ -Glu	→4)Glu(1→	11		
2,3,4-Me ₃ -Glu	→6)Glu(1→		3	3
2,4-Me ₃ -Glu	→3,6)Glu(1→		1	2
2,6-Me ₃ -Glu	→6,4)Glu(1→	2		

Na osnovu analize glukanske frakcije iz plodonosnih tela, može se s velikim stepenom sigurnosti pretpostaviti da (1→3), (1→6), (1→6),(1→3) vezane glukozne jedinice detektovane u gasnom hromatogramu ekstrakta micelijuma predstavljaju β-glukansku frakciju ovog uzorka i da je ona iste organizacije kao i frakcija koja se nalazi u plodonosnim telima; signali u NMR spektrima ekstrakta micelijuma koji bi poticali od β-glukana u ovoj frakciji nisu mogli da budu pouzdano identifikovani.

Treba naglasiti da su signali povezani sa β -glukanima pridruženi na osnovu literaturnih podataka (Samuelson i saradnici, 2019; Ge i saradnici, 2010; Dalonso i saradnici, 2015 Synytsya & Novák, 2013); kako tačan položaj signala varira i zavisi od ulsova snimanja, uzet je u obzir pre relativni odnos signala, odnosno njihov međusobni položaj, a ne apsolutne vrednosti; takođe, korelacija dobijenih signala i onih dobijenih od strane drugih autora je pre svega vršena na osnovu protonskih signala jer su manje podložni promenama.

Treći “anomerni region” na δ 97.75/4.90 pridružen je α -vezanoj galaktozi i ukazuje na prisustvo α -galaktana u ekstraktima plodonosnih tela. Signali u regionu δ 66.4/3.6 i δ 66.4/3.9 odgovaraju signalima $\alpha(1\rightarrow6)$ vezane galaktoze pa se može zaključiti da je u uzorcima prisutan $(1\rightarrow6)$ - α -D-galaktan; ovakav tip galaktana ranije je opisan iz gljiva. Signal u regionu δ 56.0/3.4 potiče od metoksi grupe, odnosno 3-*O*-metil galaktoze; dodatno, u uzorcima su prisutni signali u regionu δ 78.7/3.5 koji odgovara C3 *O*-metilovanom atomu α -vezane galaktoze. Uz to, signal oko δ 65.0/4.2 odgovara pomeranju C4 atoma/protona $\alpha(1\rightarrow6)$ vezane 3-*O*-metilgalaktoze. U ^{13}C spektru uzoraka javljaju se dva vrlo bliska signala, na oko 97.9 i 97.7 ppm, što ponovo ukazuje na dva različita tipa vezanih jedinica galaktoze. Stepem poklapanja prisutnih signala u ^{13}C spektru, uz konstantnu razliku od oko 0.7 ppm je veliki sa onim dobijenim za ovakav tip galaktana izolovanog iz bukovači srodne vrste, *Pleurotus citrinopileatus* (He i saradnici, 2016). Na osnovu toga može se sa velikom sigurnošću pretpostaviti da se $(1\rightarrow6)$ - α -D-galaktan sastoji od galaktoze i, manjim delom od jedinica 3-*O*-metil galaktoze. Odnos površina pikova u GC-MS spektru derivatizovanog hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela koji odgovaraju galaktitol heksaacetatu i 3-*O*-metil galaktitol pentaacetatu, odnosno derivatima 3-*O*-metil galatkoze i galaktoze u je otprilike 3:1, što znači da je u proseku svaka četvrta galaktozna jedinica metilovana u položaju O3. Ovakvi galaktani opisani su iz gljiva tek nedavno, i to svega iz nekoliko vrsta. Ovo bi bila ne samo prva puhara, već i prva takva gljiva iz familije Agaricaceae. Moguće je da je njihovo rasprostranjenje u gljivljem svetu veće nego što dosadašnja istraživanja pokazuju.

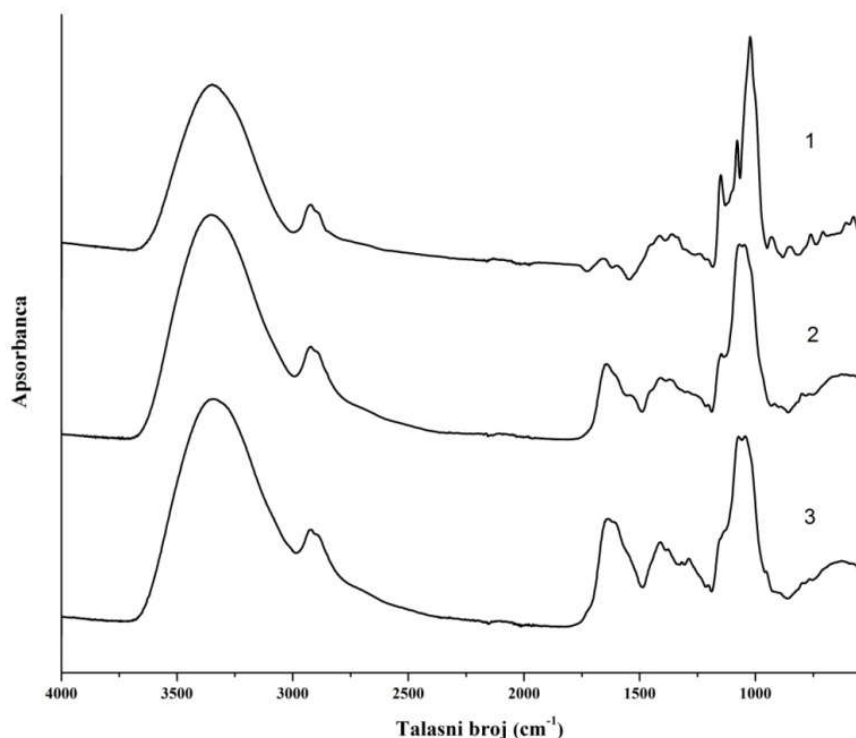
Još jedan vrlo slab signal u anomernom regionu spektara mladih i zrelih plodonosnih tela na δ 102.3/5.0 mogao bi da potiče od manoze i ukazuje na prisustvo $\alpha(1\rightarrow3)$ ili terminalno vezanih mananskih jedinica.

Signali koji ne potiču od šećera prisutni su u spektrima ekstrakata plodonosnih tela a izraženiji su u ekstraktu zrelih (slika 4.23); signal na 16.60/1.09 mogao bi npr. da se poveže sa metil grupom aminokiseline alanina koja bi mogla da nastane hidrolizom proteina prisutnih u uzorku. Signali na 21.94/1.98, 30.05/2.14, 38.56/2.63, 51.95/3.17 bi takođe bi mogli da se povežu sa alifatičnim aminokiselinama.

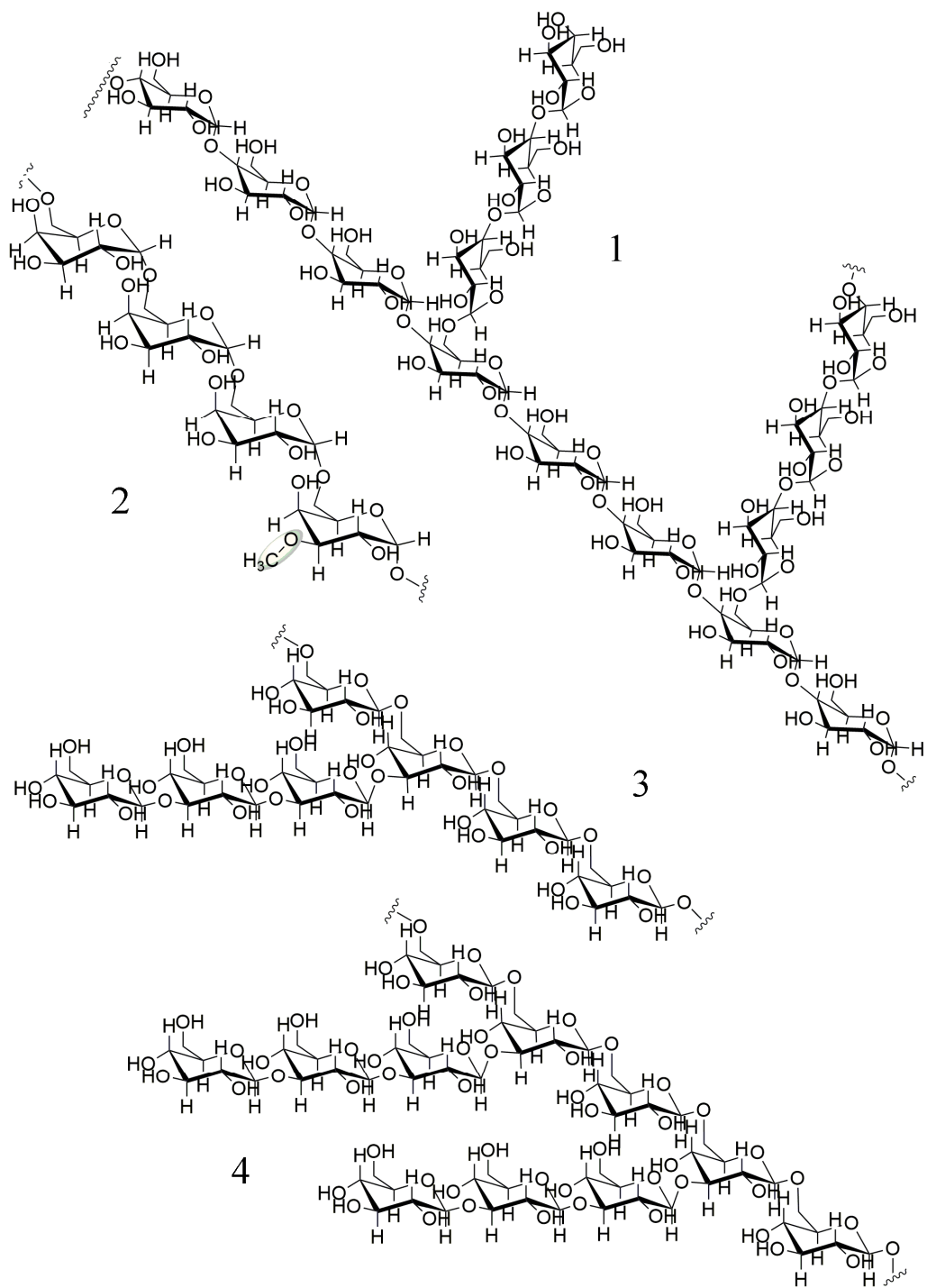
Ne postoje dokazi o kovalentnoj vezi između glukana i galaktana, kao ni o vezi bilo koje polisaharidne frakcije sa proteinima i drugim strukturama eventualno prisutnim u uzorcima. Smiderle i saradnici (2010) su međutim pokazali da α -glukan velike molekulske mase izolovan iz šampinjona (*Agaricus bisporus*) formira kompleks sa galaktanom male molekulske mase i da je razdvajanje ovih lanaca bilo moguće tek nakon tretmana kompleksa natrijum dodecil sulfatom (SDS).

FTIR-spektri su pre svega korišćeni za procenu stepena uspešnosti deproteinizacije uzoraka, ali su bili korisni i u potvrdi karakterizacije šećernog dela prečišćenih uzoraka (slika 4.25). U sva tri uzorka, pored široke trake na $\sim 3350\text{ cm}^{-1}$, koja potiče od hidroksilnih (OH-) grupa, dominantne su trake “*fingerprint*” regiona, ili “šećernog” regiona kako se nekad naziva ovaj region kada su u pitanju polisaharidi. Ove trake, koje se međusobno preklapaju i imaju pikove između 1200 i 800 cm^{-1} , uglavnom su nespecifične i potiču u najvećoj meri od C-O, C-O-C i C-C veza, ali mogu da potiču i od C-N vibracija. U polisaharidnim ekstraktima se povezuju sa šećernim strukturama koje su bogate ovakvim tipom veza i njihov međusobni odnos, odnosno intenzitet i odnos intenziteta može da ukaže na tip šećernih veza. U ekstraktu micelijuma, u ovom regionu su dominantne trake koje se povezuju sa α -glukanskim vezama, kakav je glikogen, a to su trake koje se nalaze na 1150, 1023, 930, 850 i 761 cm^{-1} (Synytsya i Novak, 2014). Traka na 850 cm^{-1} je specifična za α -glikozidne veze, ali je traka slabog intenziteta, pa je vidljiva samo pri većoj koncentraciji α -glukana (Dalonso i saradnici, 2015). S druge strane, ovaj region izgleda dosta drugačije kod ekstrakata plodonosnih tela. Kod oba uzoraka jasno se izdvajaju pikovi na 1147, 1070,

1043, 917 i 882 cm^{-1} , koji se povezuju sa β -glikozidnim vezama i karakteristične su za gljivlje β -glukane (Synytsya i Novak, 2014; Kawagishi i saradnici, 1989). Traka na 850 cm^{-1} nije prisutna, ali to ne isključuje prisustvo α -veza, jer, kao što je napomenuto, ova traka je slabog intenziteta i postaje vidljiva pri većoj koncentraciji α -glukana. Trake i pikovi koji bi bili povezani specifično sa galaktanskim strukturama nisu mogli da budu utvrđeni zbog nedostatka literaturnih podataka; najveći broj FTIR studija galaktana rađen je na sulfonovanim galaktanima iz morskih organizama. Većina traka je nespecifična, jer su isti tipovima veza prisutni u svim polisaharidima. FTIR analiza je svakako potvrdila razliku u glukanskom sastavu ovih uzoraka, tj. prisustvo velike količine α -glukana u ekstraktu micelijuma, i prisustvo β -glukana, kao i odsustvo α -glukana u ekstraktima plodonosnih tela. Položaj i intenzitet traka u šećernom regionu ekstrakata plodonosnih tela je vrlo sličan, što potvrđuje i ranije određen sličan šećerni sastav.



Slika 4.26. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3)



Slika 4.27. Pretpostavljene strukture polisaharida prisutnih u ekstraktima; 1 – $(1\rightarrow4),(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D}$ -glukan, 2 – parcijalno metilovani $(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D}$ -galaktan, 3 – $(1\rightarrow6),(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glukan iz ekstrakta mladih plodonosnih tela, 4 - $(1\rightarrow6),(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D}$ -glukan iz ekstrakta zrelih plodonosnih tela

4.2.2.3. Nešećerne komponente

Proteini su glavna „sporedna“ makromolekulska frakcija koja se može naći u polisaharidnim ekstraktima; deo proteina ostaje rastvoran u vodeno-etanolnom supernatantu ali određeni deo se taloži, naročito ako je vezan za polisaharide. Dijaliza i enzimaska deproteinizacija smešom proteinaza iz bakterije *Streptomyces griseus* su zato korišćene za odstranjivanje/smanjivanje količine proteina u uzorcima. Analizom proteina po Bradfordu uz FTIR spektroskopiju praćena je efikasnost prečišćavanja. Prema analizi po Bradford-u, vreli vodeni ekstrakt micelijuma je sadržao oko 2% proteina, što je nakon dijalize smanjeno ispod 1% (0.8%). Dalja enzimaska deproteinizacija je dovela do smanjenja udela proteina u prečišćenom uzorku na svega 0.5%. Kod mladih plodonosnih tela situacija je slična, od početnih 7%, sadržaj proteina je smanjen na 2.5% dijalizom i konačno na 1.7% deproteinizacijom i drugom dijalizom. Od početnih 4.5% proteina u ekstraktu zrelih plodonosnih tela proteini su „ukoncentrisani“ u dijalizovanom uzorku, čineći oko 9% ekstrakta. Enzimskom deproteinizacijom ovaj procenat je smanjen na oko 4%. Obzirom na relativno malu količinu slobodnih proteina u uzorku nakon dijalize i velikog gubitka u masi uzoraka nakon deproteinizacije, proističe da je deproteinizacija nepotreban korak koji dovodi do usložnjavanja procesa dobijanja aktivnih komponenti. Deproteinizacija nije potpuna čime se dalje opravdava njeno isključivanje; nepotpunost deproteinizacije relativno male količine proteina može se objasniti prisustvom proteinsko-polisaharidnih kompleksa koji sterno ometaju enzime.

Međutim, ukoliko bi ekstrakti plodonosnih tela sadržali tako malu količinu proteina, postavlja se pitanje šta čini još oko 30, odnosno 50 % makromolekulskih frakcija mladih i zrelih plodonosnih tela, redom; proteini su zato u krajnjim proizvodima, odnosno prečišćenim ekstraktima određeni i nespecifičnom metodom po Lowry-ju, koja je dala drugačije rezultate, tj. značajno veći sadržaj proteina, što je naročito izraženo u slučaju ekstrakata plodonosnih tela. Po ovoj metodi prečišćeni ekstrakt micelijuma sadrži 3.7% proteina, ekstrakt mladih plodonosnih tela 25.0, a zrelih čak 62.6% proteina, odnosno peptida. Ovako velika razlika dobijena dvema metodama može se objasniti na više načina; metodom po Bradford-u moguće je odrediti samo peptidne molekule velike molekulske

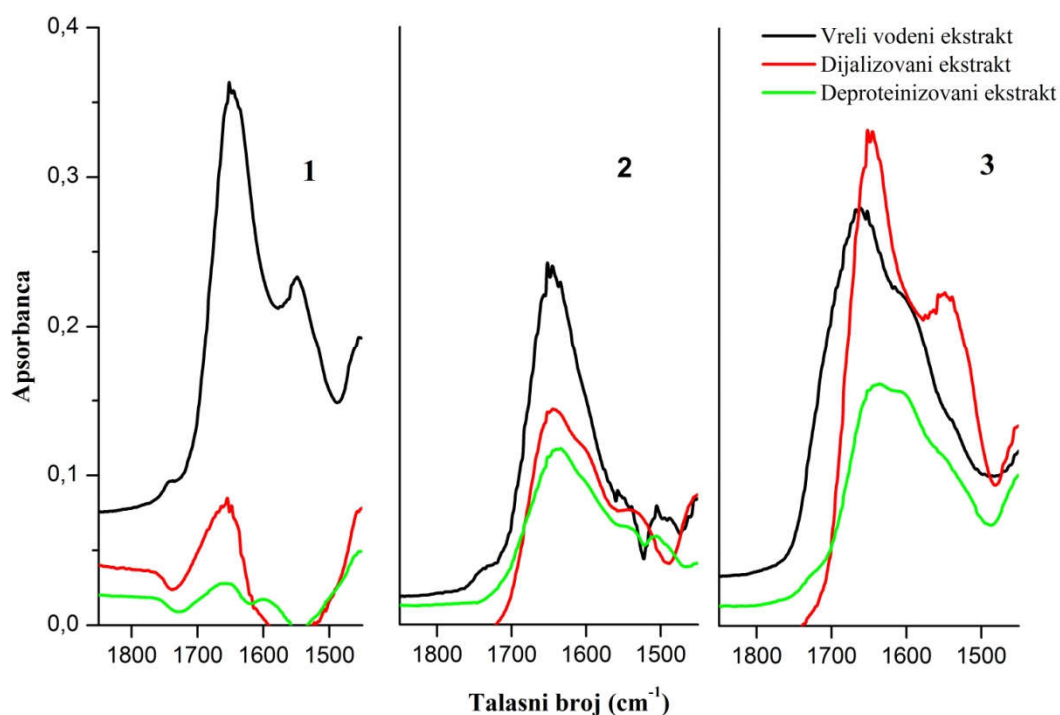
mase, čija je minimalna molekulska masa 3000 Da (Sapan i saradnici, 1999). Ukoliko polisaharidi čine kompleks sa peptidima manje molekulske mase, metodom po Bradfordu ne bi ni mogli da budu detektovani. Ranije spomenuti polisaharidopeptid (PSP), izolovan iz ćuranovog repa (*Trametes veticolor*), primer je takve strukture. S druge strane, metoda po Bradford-u se bazira na stvaranju kompleksa između trifenilmetanske boje (CB R-250) i proteina – ukoliko bi proteini već bili prisutni u stabilnijem kompleksu, npr. s polisaharidima, ne bi ni došlo do formiranja kompleksa s bojom. U metodi po Lowry-ju s druge strane može doći do interferencija i dobijanja lažno pozitivnih rezultata jer mnoge hemijske grupe mogu da redukuju bakar, a tamna boja polisaharidnih ekstrakata, a naročito onih dobijenih iz zrele glebe, ukazuje na prisustvo pigmenata, melanina koji bi mogli da reaguju s reagensima koji se u metodi koriste.

Melanini su sekundarni metaboliti i predstavljaju obojene hidrofobne biopolimere koji se formiraju oksidativnom polimerizacijom fenolnih ili indolskih molekula i široko su rasprostranjeni u živom svetu; iako nastaju od različitih prekursora, oni ispoljavaju zajedničke fizičko-hemijske osobine. Njihova tačna struktura međutim još uvek nije poznata. U gljivama su prisutni svi tipovi melanina, eumelanini (crni i tamno braon), feomelanini (žuti i crveni), kao i heterogene alomelanine, koji uključuju i rastvorne, egzogene piomelanine. U bazidiomicetama koje proizvode pečurke su poznati DOPA melanini (eu- i feomelanini) čiji prekursor je L-3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) (mada je po nekim autorima njihovo prisustvo u gljivama kontroverzno), kao i GHB melanini (jedan od tipova alomelanina), koji se nazivaju i GHDB melanini, a čiji prekursor je glutaminil-4-hidroksibenzen (GHB) koji se konvertuje u glutaminil-3,4-dihidroksibenzen (GDHB). Oksidacijom GDHB nastaje γ -glutaminil-3,4-benzohinon koji dalje polimerizuje. Smatra se da je ovaj tip melanina prisutan samo u bazidiomicetama; upravo ovaj tip melanina se akumulira u sporama šampinjona (*Agaricus bisporus*) tokom sazrevanja plodonosnih tela i daje im crnu boju (Stüssi & Rast, 1981; Bell & Wheeler, 1986; Weijn i saradnici, 2013, Belozerskaya i saradnici, 2015).

Melanini u gljivama mogu da budu vezani za polisaharide i/ili proteine (gradeći melanoproteine ili melanoglikoproteine) (Belozerskaya i saradnici, 2015) pa postoji velika

mogućnost o postojanju melanoproteinsko-polisaharidnih kompleksa u makromolekularnoj frakciji plodonosnih tela, naročito zrelih; ukoliko su proteini melanizovani mogli bi da budu otporniji prema proteinazama što bi objasnilo prisustvo proteina u uzorcima koji su podvrgnuti enzimskoj deproteinizaciji. Almendros i saradnici (1987) bavili su se obojenim, melaninskim frakcijama ekstrahovanih iz zrelih plodonosnih tela puhare *Lycoperdon perlatum* i okarakterisali ih kao komplekse koji se sastoje od alifatičnih i aromatičnih struktura i velikog udela proteina, pa i masnih kiselina. Autori su naveli i da melanini kod gljiva često predstavljaju glavnu komponentu biomase u završnim stadijumima razvoja.

FTIR i elementalna analiza (EDX) su korišćene u proceni oprečnih rezultata dobijenih dvema metodama za određivanje proteina i pokušaju da se eventualno okarakteriše nešećerni deo makromolekulskih frakcija koji ne čine proteini.



Slika 4.28. Peptidni region FTIR spektara polisaharidnih ekstrakata različitog stepena prečišćavanja micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3)

Obzirom da su proteini polipeptidi, FTIR spektroskopija, tj. trake koje potiču od peptidnih veza, tj. amida, naročito amid I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) i amid II ($\sim 1550\text{ cm}^{-1}$) traka mogu da se koriste za procenu menjanja sadržaja proteina u uzorcima tokom prečišćavanja. Kod sva tri uzorka vidljiva je promena u veličini traka koje odgovaraju amid I i amid II trakama, u odnosu na trake koje se povezuju sa šećernim strukturama, tj. C-O i C-C vezama, u regionu od 1200-800, nakon dijalize/deproteinizacije. U slučaju micelijuma, promena intenziteta amidskih traka nakon dijalize je drastična, i pored male promene u ukupnom sadržaju proteina (smanjenje s 2 na 0.8%), što ukazuje na prisustvo peptidnih molekula manje molekulske mase, pored proteina. Nakon deproteinizacije, promena veličine trake je jedva vidljiva. Obzirom da su peptidne trake kod ovog uzorka izuzetno slabog intenziteta, FTIR analiza se dobro koreliše sa obe metode za određivanje proteina i ukazuje na njihov sadržaj u tragovima.

U slučaju ekstrakta zrele glebe, intenzitet peptidnih traka se povećava nakon dijalize, a zatim smanjuje nakon deproteinizacije (u skladu sa analizom po Bradford-u). Međutim, njihovi intenziteti su daleko veći nego što bi se očekivalo, s obzirom da je njihov sadržaj, po Bradford-u, svega 4%. I u slučaju ekstrakta mladih plodonosnih tela, FTIR analiza se donekle koreliše sa rezultatima dobijenim u analizi po Bradford-u; amidske trake najintenzivnije su u vrelom vodenom ekstraktu, dok se intenzitet ovih traka smanjuje u dijalizovanom i deproteinizovanom ekstraktu. Ipak, i u ovom slučaju ove trake su izraženije nego što bi se očekivalo, ako se uporede sa spektrom ekstrakta micelijuma. Takođe, manje su izražene nego kod ekstrakata zrelih plodonosnih tela, što ukazuje da je sadržaj peptida u njima zaista manji i da se on u makromolekularnoj frakciji povećava tokom sazrevanja. Ova razlika se ogleda u odnosu intenziteta traka u peptidnom i šećernom regionu; kod oba uzorka vidljive su amidne trake I i II (na 1640 i 1540 cm^{-1} , redom), ali su kod ekstrakta zrelih plodonosnih tela ove trake izraženije, dok su trake šećernog regiona manjeg intenziteta u odnosu na ekstrakt mladih plodonosnih tela. Ovo se koreliše i sa ukupnim šećerima u ova dva uzorka, jer, kako je pokazano, ekstrakt mladih plodonosnih tela ima više šećera. Kod oba uzorka vidljiva je i intenzivna traka na 1600 cm^{-1} , koja se pre svega može povezati s karboksilnim grupama, tačnije karboksilnim anjonom. Ove grupe mogu

poticati od proteina/peptida, odnosno od bočnih ostataka kiselih aminokiselina, pošto je prisustvo kiselih šećera u uzorcima skoro u potpunosti isključeno. Oko 1600 cm^{-1} takođe su vidljive aromatične grupe, koje ponovo mogu poticati od aromatičnih aminokiselina, ili pak melaninskih struktura. Aromatične grupe takođe daju traku na oko 1500 cm^{-1} , koja je u uzorcima vidljiva, kao “rame” na amidnoj traci II (1550 cm^{-1}) i vrlo je slabog intenziteta, što ukazuje na to da traka na 1600 cm^{-1} potiče pre svega od karboksilnih grupa. Kawagishi i saradnici (1989) utvrdili su da je protein iz kompleksa sa (1→6)- β -D-glukanom, izolovanog iz vrste šampinjona *Agaricus brasiliensis* bogat kiselim aminokiselinama, glutaminskom i asparaginskom kiselinom. Karboksilne grupe međutim sadrže i GHB i DOPA melanini pa prema tome FTIR analiza ukazuje na veći sadržaj peptidnih molekula u uzorcima nego što analiza po Bradford-u pokazuje, ali u slučaju ekstrakta zrelih plodonosnih tela i na manji od sadržaja dobijenog metodom po Lowry-ju jer su trake povezane sa šećernim strukturama ipak dominantne. FTIR analiza takođe niti isključuje, niti potvrđuje prisustvo melanina u uzorcima.

Elementalna analiza prečišćenih polisaharidnih ekstrakata namenski je sprovedena da bi se utvrdio sadržaj azota u uzorcima. Ekstrakt micelijuma sadrži očekivano najmanje azota, 0.98% što je u skladu sa veoma niskim sadržajem proteina u ovom uzorku, utvrđenim ranije opisanim metodama. Azot čini nešto veći maseni udeo u ekstraktima plodonosnih tela, oko 3.2% u ekstraktu mladih i 4.84% u ekstraktu zrelih plodonosnih tela. Ukoliko bi celokupni udeo azota poticao od proteina, u kojima se sadržaj azota kreće od 13-19% (prosečno 16%), u zavisnosti od količine baznih aminoakiselina, onda bi sadržaj azota u ekstraktu micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela bio 5.2-7.5 (6.1), 16.7-24.5 (19.9) i 25.5-37.2 (30.3) %, redom. Dok se sadržaj proteina procenjen preko ukupnog azota dobro koreliše sa proteinima određenim po Lowry-ju u slučaju ekstrakta micelijuma i mladih plodonosnih tela, za zrela plodonosna tela daje značajno manji sadržaj proteina, što ponovo ukazuje da u metodi po Lowry-ju postoje značajne interferencije od strane neidentifikovane frakcije. Sadržaj proteina u uzorcima može da se proceni i na osnovu određenog sadržaja sumpora, ako se pretpostavi da sumpor takođe potiče isključivo od proteina, koji ga prosečno sadrže 4.5%. Nađeno je da je sadržaj sumpora u ekstraktu micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih

tela 0.75, 1.07 i 1.39 %, redom, pa bi sadržaj proteina bio 16.7, 23.8 i 30.9 %, redom. U slučaju ekstrakata plodonosnih tela postoji dobro poklapanje sa procenjenim sadržajem azota na osnovu ukupnog azota, a u slučaju ekstrakta mladih plodonosnih tela postoji odlično poklapanje i sa sadržajem proteina određenim metodom po Lowry-ju. U slučaju ekstrakta micelijuma je procenjen sadržaj proteina nemoguć, ali je moguće npr. da je proteinska frakcija u micelijumu bogata sumpornim aminokiselinama kao i da određen sadržaj sumpora nije pouzdan.

Tabela 4.13. Elementalni sastav polisaharidnih ekstrakata, isključujući kiseonik

	HUMIC	HUI	HUM
C (%)	39.01	38.08	34.63
N (%)	0.98	3.18	4.84
H (%)	6.43	6.32	6.00
S (%)	0.75	1.07	1.39

S druge strane, ako se pretpostavi da je sadržaj proteina jednak onom dobijenom korišćenjem metode po Bradford-u, tj. da je sadržaj proteina u ekstraktima mladih i zrelih plodonosnih tela 1.7 i 4%, redom, ukupni azot koji bi poticao od proteina bio bi oko 0.27 i 0.64 %, za ekstrakte zrelih i mladih puhara, redom. Ukoliko se pretpostavi da je ostatak azota organskog porekla, tj. da uzorci ne sadrže nitrate, azot bi mogao da potiče od melaninskih struktura vezanih za polisaharidne lance/proteine, čije je prisustvo indikovano tamnom bojom uzoraka. Ukoliko se dalje pretpostavi da se radi o poznatom tipu tamno smeđih melanina koji sadrže azot, a to su DOPA eumelanini i GHB melanini (čije prisustvo bi bilo verovatnije), u kojima je sadržaj azota 6-9 %, odnosno oko 10%, redom (Belozerskaya i saradnici, 2015; Stüssi & Rast, 1981), to bi značilo da je sadržaj melanina u uzorcima 29-49, odnosno 42-74 %, što je malo verovatno čak i za niže procenjene vrednosti, jer bi u oba slučaja ovoliki sadržaj vodonerstvom melanina morao značajno da utiče na rastvorljivost uzoraka. Zato se kao zaključak nameće da je sadržaj peptida/proteina

značajno veći od onog koji je moguće odrediti metodom po Bradford-u, i da je bliži onom dobijenom metodom po Lowry-ju, naročito u slučaju ekstrakta micelijuma i mladih plodonosnih tela. U slučaju ekstrakta zrelih plodonosnih tela s druge strane sadržaj proteina određen metodom po Lowry-ju je nemoguć, jer bi u tom slučaju sadržaj azota u uzorku trebalo da bude čak dvostruko veći. Pretpostavka je da se nešećerna frakcija ovog uzorka sastoji iz proteina i melaninskih struktura, ali je njihov odnos nemoguće odrediti. Moguće je da je sadržaj melanina obrnuto proporcionalan sadržaju šećera, odnosno da sa smanjenjem udela šećera u makromolekulskoj frakciji zrelih plodonosnih tela raste udeo melanina.

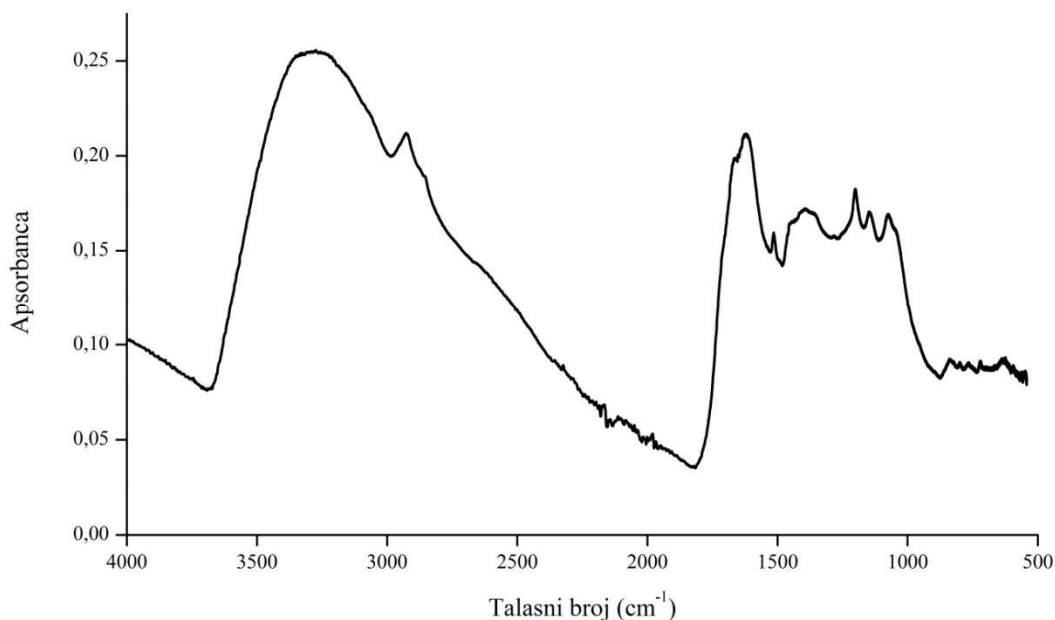
Tabela 4.14. Peptidi/proteini i fenoli u polisahardinim ekstraktima izračunati/procenjeni korišćenjem više metoda

	HUMIC	HUI	HUM
Proteini (Bradford)(%)	0.8	1.7	4.0
Peptidi (Lowry)(%)	3.7±0.2	25.0±0.9	62.6±2.1
Peptidi (ukupni azot)*(%)	6.1	19.9	30.3
Peptidi (ukupni sumpor)*(%)	16.7	23.8	30.9
Fenoli (Folin- Ciocalteu) (mgGAE/g)	2.6±0.03	13.0±0.7	38.0±1.5

*Procenjeno na osnovu prosečnog sadržaja u proteinima

Dodatni dokaz o značajnom udelu melanina u ekstraktu zrelih plodonosnih tela pokazalo je i ispitivanje vodonerastvornog precipitata nastalog usled hidrolize trifluorosirćetnom kiselinom; naime, i u ekstraktu mladih i zrelih plodonosnih tela nakon viščasovne hidrolize sa 4M TFA došlo je do stvaranja tamnog, vodonerastvornog taloga; više taloga

nastalo je prilikom hidrolize ekstrakta zrelih plodonosnih tela (~9%) zbog čega je on podvrgnut FTIR spektroskopiji i elementalnoj analizi, kao i NMR analizi. Elementalna analiza pokazala je maseni odnos C:H:N:S od 22.5:2.5:2.9:1, koji se relativno dobro koreliše sa odnosom ovih elemenata određenih u melaninskom ekstraktu spora šampinjona (*Agaricus bisporus*), 18.7:1.2:2.8:1 (Stüssi & Rast, 1981). FTIR spektar precipitata je veoma sličan onom koji su Stüssi & Rast (1981) dobili kako za sintetski GHB melanin, tako i za pomenuti melaninski ekstrakt. U spektru je vrlo izražena traka na 1514 cm^{-1} , koja se može povezati sa aromatičnim strukturama. NMR spektroskopija je bila ograničena slabom rastvorljivošću ovog precipitata u deuterisanom DMSO-u, ali je protonski spektar potvrdio prisustvo aromatičnih grupa, na šta ukazuju signali vidljivi na oko 8 ppm.



Slika 4.29. ATR-FTIR spektar vodonerastvornog ostatka hidrolizata polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela

U karbonilnom regionu FTIR spektra preklapa se više traka, od kojih je najdominantnija traka na 1615 cm^{-1} koja može da potiče od aromatičnih struktura, ali i karboksilnih grupa, odnosno karboksilatnih anjona, kao i traka na 1621 cm^{-1} koja može da se poveže sa dvostrukim C=C vezama. Takođe, vidljiva je traka na oko 1650 cm^{-1} , koja ukazuje na

prisustvo peptidnih struktura. Prisustvo izraženih aromatičnih (1510 cm⁻¹) i peptidnih traka (1650 cm⁻¹) u melaninskim strukturama puhare *Lycoperdon perlatum* utvrdili su i Almendros i saradnici (1987). Ove grupe sadrže i proteini i GHB melanini, međutim, da se precipitat sastoji (samo) od proteina, trake najjačeg intenziteta bi poticale od peptidnih veza, što nije slučaj; precipitat dakle sadrži strukture koje se ne mogu povezati ni sa polisaharidnom ni proteinskom frakcijom, već najverovatnije melaninskom, što potvrđuje kompleksnu strukturu makromolekulske frakcije izolovane iz plodonosnih tela, naročito zrelih.

I analiza ukupnih fenolnih jedinjenja bi mogla da dodatno podrži ove zaključke; sadržaj ukupnih fenola praćen je u svim stadijuma prečišćavanja ekstrakata; utvrđeno je da polisaharidni ekstrakti micelijuma sadrže zanemarljivo male količine fenolnih jedinjenja; od blizu 5 mgGAE/g u vrelom vodenom ekstraktu i da njihova količina opada prilikom prečišćavanja do svega 2.6 mgGAE/g u prečišćenom polisaharidnom ekstraktu. Sadržaj fenolnih jedinjenja se dobro koreliše sa sadržajem proteina pa najverovatnije predstavljaju tirozinske ostatke proteina. Neprečišćeni i dijalizovani ekstrakti mladih plodonosnih tela sadrže istu količinu fenolnih jedinjenja (oko 20 mgGAE/g ekstrakta) a nakon deproteinizacije dolazi do smanjenja udela fenolnih jedinjenja u prečišćenim polisaharidima (oko 13 mgGAE/g), slično kao kod micelijuma, što se ponovo koreliše sa sadržajem proteina određenog po Bradford-u i FTIR spektrima. Kod ekstrakta zrelih puhara s druge strane dolazi do ukoncentrisavanja fenolne frakcije, koja čini manji deo neprečišćenog ekstrakta (oko 20 mgGAE/g) i skoro dvostruko veći kod dijalizovanoog i deproteinizovanog (36 i 38 mgGAE/g, redom). Kod ovog uzorka smanjenje sadržaja slobodnih proteina nakon deproteinizacije ne dovodi do smanjenja fenolne frakcije, što indikuje prisustvo i drugih fenolnih vrsta, pre svega melaninskih. Prečišćena polisaharidna frakcija zrele glebe sadrži čak više fenolnih jedinjenja nego metanolni ekstrakt.

Analiza polisaharidnih ekstrakata micelijuma i plodonosnih tela pokazala je da se makromolekulska frakcija koja se može dobiti iz micelijuma i plodonosnih tela bitno razlikuje. Ekstrakt micelijuma se sastoji gotovo isključivo od glikogena, odnosno (1→4)(1→6)- α -D-glukana, sa, kako je utvrđeno, visokim stepenom grananja. Manji deo

uzorka čine β -glukani i proteini. S druge strane, “polisahardini ekstrakti” plodonosnih tela mogu se pre nazvati makromolekulskim frakcijama pošto su heterogene strukture. Šećerna frakcija se i kod mladih i zrelih plodonosnih tela sastoji većinski iz β -glukana, koji je okarakterisan kao $(1\rightarrow6),(1\rightarrow3)$ - β -D-glukan, a njen manji deo čini α -galaktan sa povremeno metilovanim galaktoznim jedinicama u položaju O-3. Udeo šećerne frakcije se kod ovih uzoraka međutim značajno razlikuje; dok u slučaju ekstrakta mladih plodonosnih tela ona čini ~60-70 %, ekstrakt zrelih plodonosnih tela sadrži ~40-46 % šećera. Ostatak makromolekulske frakcije mladih plodonosnih tela najverovatnije čine većinski proteini, jer se metodom po Lowry-ju, kao i procenom ukupnih proteina na osnovu sadržaja azota i sumpora dobija sličan procenat, od 25-30%. U slučaju ekstrakta zrelih plodonosnih tela, pored proteina značajan udeo, po svemu sudeći, čine tamni pigmenti, odnosno melaninske strukture, koje su možda kovalentno vezane za proteine i/ili polisaharide. Proteinska frakcija uzoraka je relativno stabilna prema proteinazama, možda zbog formiranja kompleksa sa polisaharidima i/ili melaninima. S obzirom da su ranije opisani glukansko-proteinski kompleksi iz nekih vrsta gljiva, veća je verovatnoća da proteini čine komplekse sa β -glukanima iz uzoraka.

α -glukani pre svega predstavljaju depo glukoze, odnosno energije, ali su prisutni i kao gradivne strukture ćelijskih zidova bar nekih gljiva (Synytsya & Novák, 2013, Synytsya & Novák, 2014) zbog čega i čine veliki udeo glukanske frakcije micelijuma. Plodonosna tela su, s druge strane, kratkog veka i služe za razmnožavanje zbog čega nema potrebe za nagomilavanjem depoa energije u njima. Smanjenje količine ukupnih polisaharida u zrelih puharama (što se vidi iz prinosa ekstrakcije) i manji udeo glukana u njima ukazuje na to da pri autolizi dolazi do hidrolize ovih gradivnih makromolekula, ali i njihove modifikacije, odnosno “melanizacije” i smanjenja ukupnih šećera u makromolekulskoj vodorastvornoj frakciji.

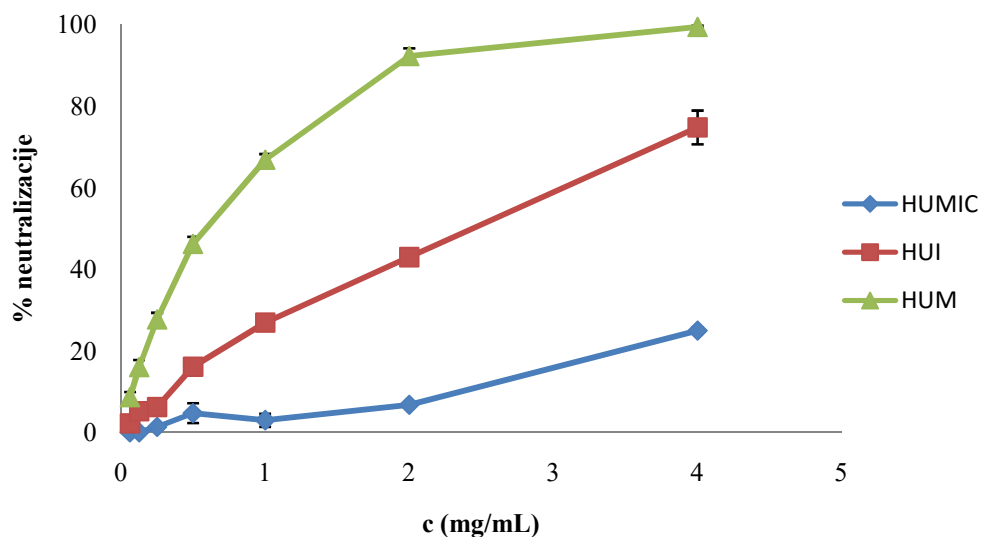
Iako je najveći prinos glukana dobijen iz micelijuma, β -glukani, koji važe za nosioce imunomodulatorne aktivnosti gljiva, čine mnogo manju frakciju, zbog čega micelijum ne predstavlja adekvatnu zamenu za plodonosna tela; ipak, usled mogućnosti proizvodnje micelijuma, ovo bi moglo da se nadomesti, ali uz dodatnu enzimsku eliminaciju α -glukana.

S druge strane glikogen, kao depo energije, ne samo u gljivljim, već i u animalnim ćelijama mogao bi da ima ulogu u proizvodima na bazi polisaharidnih ekstrakata, s obzirom na to da se koristi u kozmetičkim proizvodima, kao humektans/emolijent, ali i komponenta u tretmanu starenja kože.

4.2.3. Biološka karakterizacija polisaharidnih ekstrakata

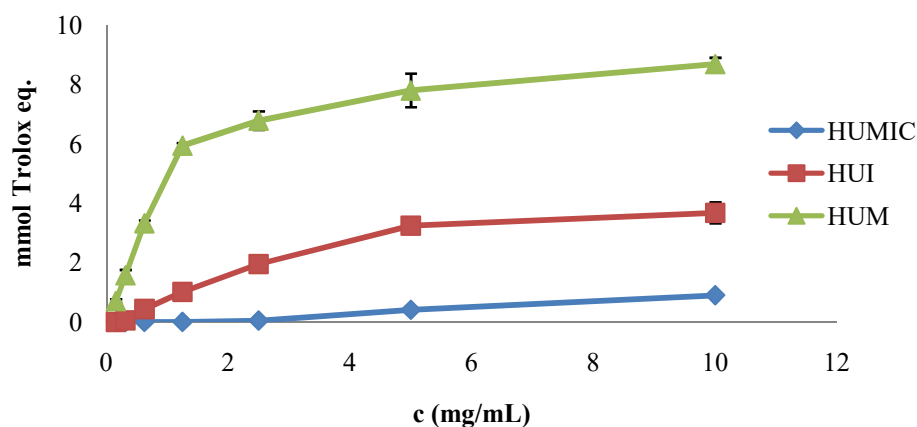
4.2.3.1. Antioksidativna analiza

Iako primarno šećeri, prečišćeni polisaharidni ekstrakti sadrže i proteine, kao i melanine. Zbog toga pokazuju i antioksidativnu aktivnost, koja se značajno razlikuje između uzoraka i koja se jasno koreliše sa fenolnim strukturama. Micelijum, koji sadrži najmanje fenola, pokazuje i najslabiju aktivnost koja je merljiva tek pri najvišoj koncentraciji (24%, $c=4$ mg/mL). Polisaharidna frakcija mladih plodonosnih tela pokazuje mnogo bolju aktivnost ($EC_{50}=2.6$ mg/mL), dok polisaharidi zrele glebe, najbogatiji fenolima, pokazuju najbolju aktivnost ($EC_{50}=0.6$ mg/mL), pri čemu dovode do potpune neutralizacije ABTS radikala pri najvišoj koncentraciji (4 mg/mL).



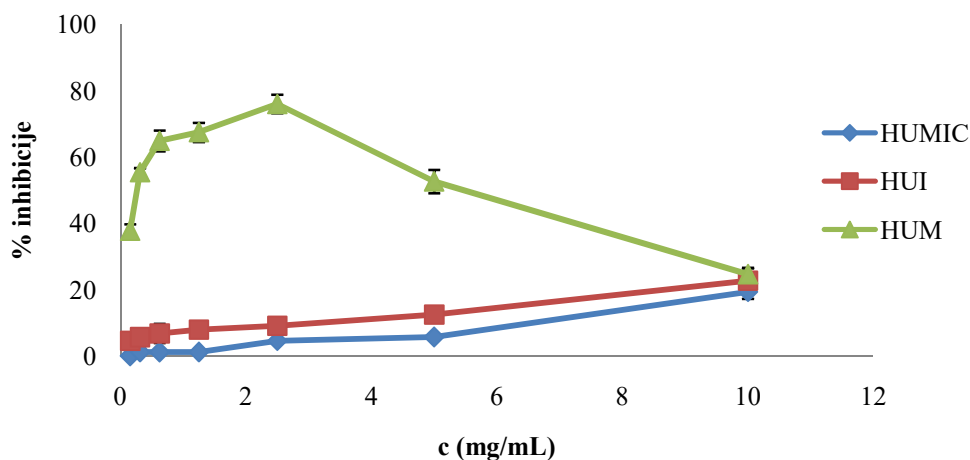
Slika 4.30. Antiradikalska sposobnost polisaharidnih ekstrakata (ABTS)

Sposobnost redukovanja jona bakra takođe jasno zavisi od sadržaja fenolnih jedinjenja; dok micelijum pokazuje vrlo slabu aktivnost, polisaharidi mladih i zrelih puhara vrlo su potentni redukujući agensi. Polisaharidna frakcija zrele glebe, pri najvišoj koncentraciji (10 mg/mL) pokazuje aktivnost ekvivalentnu čak 8.7 mM Troloksa (tj. 2,2 mg/mL), što se može okarakterisati kao značajna aktivnost, s obzirom na to da se poredi makromolekulska i tokoferolna struktura. Ovaj uzorak dovodi do značajnog efekta i pri mnogo nižim koncentracijama.



Slika 4.31. Sposobnost polisaharidnih ekstrkata da redukuju Cu^{2+} jone (CUPRAC)

Očekivano, vodorastvorni polisaharidi imaju vrlo slab učinak u prevenciji oksidacije linoleinske kiseline, odnosno β -karotena; vrlo slab učinak (15% inhibicije) vidljiv je tek pri najvišoj koncentraciji (10 mg/mL). Iako polisaharidi mladih plodonosnih tela sadrže više fenolnih komponenti, one izgleda nisu dovoljno efikasne u inhibiciji oksidacije, uz merljivu aktivnost tek pri 2.5 mg/mL (svega 3.6%) i maksimalnu aktivnost pri 10 mg/mL od svega 18%. S druge strane, polisaharidna frakcija zrelih puhara pokazuje izuzetnu aktivnost u sprečavanju oksidacije linoleinske kiseline ($\text{EC}_{50}=0.3$ mg/mL), uz izraženu aktivnost od preko 30% već pri najmanjoj koncentraciji (0.156 mg/mL). Aktivnost međutim dostiže plato pri 2.5 mg/mL (63%), posle čega je prisutan nagli pad aktivnosti. Ovo se može objasniti prooksidativnom aktivnošću pri višim koncentracijama, s obzirom na to da je uzorak bogat fenolnim jedinjenjima.



Slika 4.32. Test inhibicije oksidativne degradacije β -karotena

Tabela 4.15. Antioksidativna aktivnost polisaharidnih ekstrakata

	HUMIC	HUI	HUM
ABTS (EC ₅₀ , mg/mL)	>4.00	2.53±0.08 ^{a1}	0.56±0.03 ^b
CUPRAC (mM Trolox eq.; c=10 mg/mL)	0.90±0.04 ^c	3.68±0.35 ^b	8.69±0.21 ^a
Test inhibicije oksidativne degradacije β-karotena (EC ₅₀ , mg/mL)	>10.00	>10.00	0.27±0.04

¹ Različita slova u redovima označavaju statistički različite vrednosti (p=0.05)

4.2.3.2. Antimikrobna aktivnost

Obzirom da predstavljaju višekomponentne sisteme, polisaharidni ekstrakti su testirani i protiv patogenih mikroorganizama. Polisaharidni ekstrakti micelijuma i mladih plodonosnih tela nisu pokazali aktivnost na rast bakterijskih sojeva; s druge strane,

polisaharidni ekstrakt zrele glebe pokazao je inhibitornu aktivnost na sve testirane bakterijske sojeve. Aktivnost je bila relativno slaba, odnosno inhibicija rasta je postignuta tek pri najvećoj koncentraciji u svim slučajevima (20 mg/mL). Obzirom na sličan šećerni sastav ovih polisaharida sa polisaharidima mladih plodonosnih tela, aktivnost verovatno potiče od komponenti vezanih za ove šećere, melanina i proteina, kojih ima znatno više u ekstraktu zrele glebe. S druge strane, oba ekstrakta plodonosnih tela pokazala su inhibitornu aktivnost na rast kandidate, pri čemu je aktivnost polisaharida mladih plodonosnih tela čak bila bolja (MIK=5 mg/mL), dok je u slučaju ekstrakta zrelih plodonosnih tela bila identična onoj koju je ovaj uzorak pokazao i prema bakterijama (20 mg/mL). Hemijska razlika između ekstrakata plodonosnih tela, odnosno veći sadržaj proteina i melaninskih/fenolnih komponenti u ekstraktu zrelih plodonosnih tela verovatno je ključan za bolju aktivnost prema bakterijama. Razlog boljeg delovanja ekstrakta mladih plodonosnih tela na kandidu nije jasan.

Tabela 4.16. Antimikrobna aktivnost polisaharidnih ekstrakata

	HUMIC		HUI		HUM	
	MIK ¹	MMK ²	MIK	MMK	MIK	MMK
<i>S. aureus</i>	- ³	-	-	-	20	-
MRSA	-	-	-	-	20	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	20	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	20	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	20	-
<i>C. albicans</i>	-	-	5	-	10	-

¹Minimalna inhibitorna koncentracija

²Minimalna mikrobicidna koncentracija

³Nema aktivnosti

4.2.3.3. Imunomodulatorna aktivnost

HUI i HUN stimulisali su produkciju IL-1b i u THP-1 i U937 diferenciranim makrofagama, dozno zavisno, dok nakon inkubacije ćelija sa ekstraktom micelijuma nije bilo nikakvog efekta. THP-1 ćelije pokazale su se kao potentniji proizvođači ovog interleukina, u poređenju sa U937 linijom. Tretman sa LPS/IFN γ doveo je do značajnog povećanja produkcije ovog citokina u obe ćelijske linije, koja je bila značajno stimulisana pretretmanom uzorcima HUI i HUM, posebno pri većoj dozi. Dodatno, veća koncentracija uzorka HUI (200 μ g/mL) imala je bolji efekat od HUM-a, na obe ćelijske linije. HUMIC je ispoljio slab efekat stimulacije lučenja IL-1b samo kod LPS/IFN γ stimulisanim U937 ćelijama.

Produkcija IL-6 takođe je stimulisana značajno tretmanom ekstraktima plodonosnih tela, pri obe koncentracije, kod oba tipa ćelija a aktivnost je bila izraženija na THP-1 ćelijama. Dozna zavisnost je tako mogla da bude uočena samo kod U937 ćelija, jer je već pri manjoj koncentraciji (20 µg/mL) kod THP-1 ćelija došlo do dostizanja platoa produkcije. HUMIC je doveo do stimulacije produkcije IL-6 samo kod THP-1, pri većoj koncentraciji, ali ne u meri kao HUI i HUM; nakon LPS/IFN γ stimulacije, dostignut je plato u produkciji citokina kako kod kontrole, tako i kod uzorcima tretiranih ćelija obe linije, odnosno, u slučaju THP-1 ćelija tretiranih ekstraktima plodonosnih tela, nije došlo do daljeg potenciranja produkcije citokina. Produkcija IL-6 je po svemu sudeći vrlo osetljiva na polisahardne ekstrakte plodonosnih tela, naročito u slučaju THP-1, ali i na LPS/IFN γ -stimulaciju.

Sličan efekat uzorci su pokazali na produkciju TNF- α ; HUI i HUM značajno su povećali produkciju ovog citokina, pri obe doze, kod oba tipa nestimuliranih, diferenciranih ćelija. Veća doza HUMIC-a takođe je stimulirala produkciju TNF- α , što je bilo izraženije u slučaju THP-1, ali ponovo s daleko manjim efektom nego druga dva uzorka. Nakon dodatka LPS/IFN γ nije došlo do dodatne potencijacije produkcije TNF- α kod ćelija prethodno tretiranih uzorcima, u poređenju sa LPS/IFN γ -stimulisanom kontrolom, osim kod U937 ćelija stimuliranih većom dozom uzorka HUI, ali i u ovom slučaju povećanje je bilo relativno malo. Produkcija TNF- α se pokazala, slično kao IL-6, veoma osetljiva na ekstrakte plodonosnih tela, kao i na samu LPS/IFN γ stimulaciju.

Do pozitivne regulacije produkcije imunoregulatornog citokina IL-27 došlo je kod THP-1 ćelija tretiranih uzorcima; efekat je uporediv kod sva tri uzorka, ali aktivnost prati redosled HUI>HUM>HUMIC. Kod U937 ćelija došlo je suprotnog efekta, tj. do negativne regulacije, posebno izražene pri većoj dozi uzoraka; HUMIC je čak doveo do blagog povećanja koncentracije IL-27 pri nižoj koncentraciji, a izraženiji efekat niže doze primećen je i kod THP-1 ćelija za ovaj uzorak. Slično, tretman kontrolnih THP-1 i U937 ćelija sa LPS/IFN γ doveo je do povećanja, odnosno smanjenja produkcije ovog citokina, redom. Pretretman THP-1 ćelija višim koncentracijama uzoraka HUI i HUM doveo je do supresije produkcije IL-27 u odnosu na kontrolu odnosno do manje izražene pozitivne regulacije. Isti slučaj može se uočiti i kod U937 ćelija tretiranih višom dozom uzorka HUM. HUMIC nije

imao efekta na produkciju IL-27 nakon LPS/INF γ stimulacije, ni na jednoj ćelijskoj liniji. Ovi rezultati sugerišu da je odgovor na stimulaciju ekstraktima, odnosno LPS/INF γ različit za THP-1 i U937 ćelijske linije, ali i da ekstrakti plodonosnih tela teže da smanje produkciju IL-27 nakon LPS/INF γ stimulacije, za razliku od ekstrakta micelijuma.

THP-1 i U937 ćelije pokazale su veliku razliku u sposobnosti produkcije imunoregulatornog IL-10; THP-1 ćelije produkovale su značajno manje ovog citokina u odnosu na U937. Svi uzorci su snažno stimulisali produkciju IL-10 kod THP-1 ćelija pri višoj dozi, a HUI se pokazao kao najpotentniji uzorak, pri obe doze. HUI i HUM takođe su stimulisali produkciju IL10 kod U937 ćelija, za razliku od HUMIC-a. Iako su vrednosti koncentracija IL-10 bile u proseku više kod U937 ćelija stimulisanih uzorkom HUI, nije bilo statističke razlike od vrednosti postignutih tretmanom uzorkom HUM. Nakon LPS/INF γ stimulacije, kod THP-1 ćelija prethodno tretiranih ekstraktima nije došlo do povećanja produkcije IL-10, za razliku od U937 ćelija kod kojih je došlo do blagog, ali značajnog povećanja proizvodnje ovog citokina, pri dodatku sva tri uzorka.

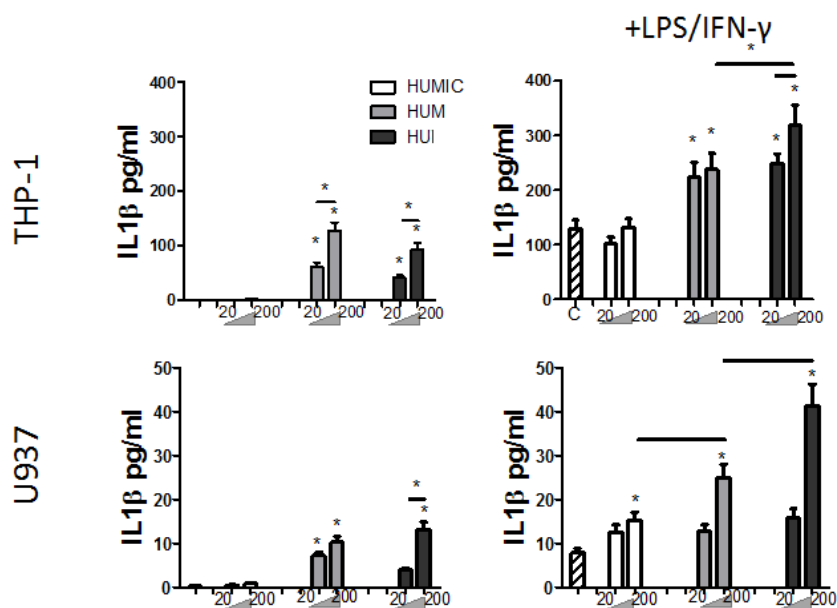
U zaključku, same THP-1 i U937 ćelije razlikovale su se po kapacitetu produkcije proinflamatornog IL-1b, kao i imunoregulatornih citokina (IL-27 i IL-10), pa je i odgovor ćelija na tretman uzorcima bio očekivano drugačiji za ove dve ćelijske linije. S druge strane, njihov kapacitet produkcije TNF α i IL-6 bio je sličan, kao i, ponovo, odgovor na tretman uzorcima.

Ekstrakt micelijuma je pokazao daleko slabiju sposobnost stimulacije produkcije proinflamatornih citokina, kada se uporedi sa ekstraktima plodonosnih tela, ali je zato imao značajan uticaj na produkciju imunomodulatornih citokina i to skoro isključivo na THP-1 ćelije. Ovaj uzorak se u najvećoj meri sastoji iz (1 \rightarrow 4)(1 \rightarrow 6)- α -D-glukana nalik glikogenu, uz malu količinu β -glukana, verovatno slične strukture onim koji se nalaze u plodonosnim telima. Aktivnost uzorka mogla bi da potiče od β -glukanske frakcije, ali je velika verovatnoća da je α -glukanska frakcija nosilac aktivnosti; naime, iako je osnovna funkcija glikogena skladištenje energije, skorašnja istraživanja su pokazala da neki prirodni i sintetski glikogeni pokazuju imunomodulatornu aktivnost (Masuda i saradnici, 2017). Kakutani i saradnici (2012) utvrdili su da je enzimski sintetisan glikogen, s istim

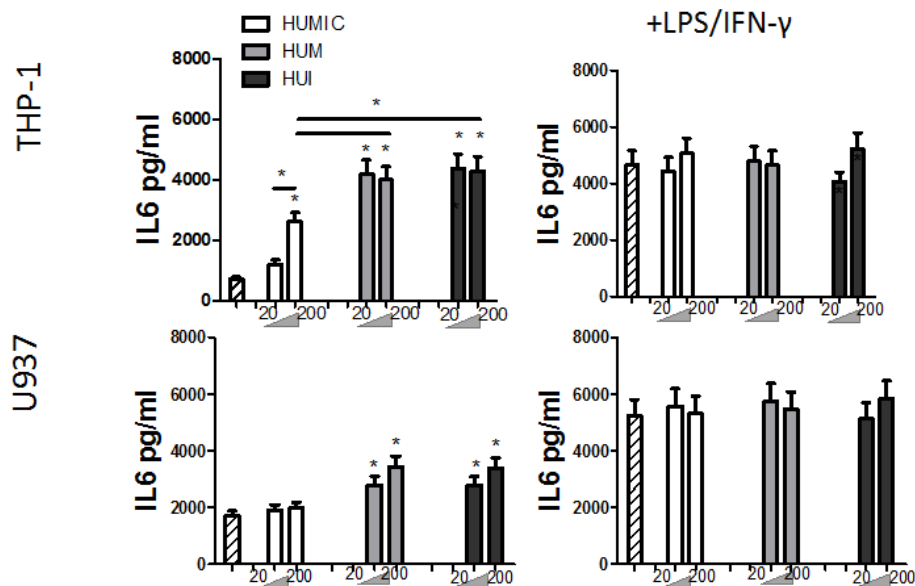
karakteristikama kao prirodni glikogen, nakon oralne administracije miševima s implantiranim tumorima indukovao potencijaciju njihovog imunog odgovora kroz aktivaciju NK ćelija. Za razgranati (1→4),(1→6)- α -D-glukan nalik glikogenu, koji je izolovan iz maitake (*Grifola frondosa*), “YM-2A”, Masuda i saradnici (2017) utvrdili su da potencira imuni antitumorski i antivirusni odgovor kod miševa, aktivirajući dendritične ćelije i makrofage i posledično indukujući sistemski antitumorski odgovor preko T-limfocita. Pokazano je da je glukan aktivan kada se daje oralno i da je zbog velikog stepena grananja otporniji na dejstvo enzima digestivnog trakta. Autori su u studiji ispitivali aktivnost i drugih prirodnih glikogena i, iako su pokazali da je glikogen iz zečje jetre slične strukture, on nije pokazao aktivnost. Autori su određivali i *in vitro* stimulativnu aktivnost YM-2A na peritonealnim makrofagama ELISA metodom i ustanovili da ovaj α -glukan dovodi do povećanja produkcije proinflamatornih citokina; u studiji međutim nisu određivane koncentracije imunoregulatornih/antiinflamatornih citokina. Produkciju TNF- α u kulturi makrofaga RAW264.7 takođe je indukovao (1→4),(1→6)- α -D-glukanska frakcija dobijena iz šitake (*Lentinula edodes*), a slična α -glukanska frakcija izolovana iz šampinjona *Agaricus brasiliensis* (kao *A. blazei*) dovela je do povećanja ćelijske populacije CD4⁺ i CD8⁺ limfocita kod miševa kojima je oralno davana (Kojima i saradnici, 2009; Mizuno i saradnici, 1998). Ohno i saradnici (1986) su s druge strane pokazali da (1→4)- α -D-glukani, konkretno skrob, može negativno da utiče na antitumorsku aktivnost β -glukana grifolana, kada se zajedno injektuju intraperitonealno obolelim miševima; neaktivan. Nijedna studija se međutim nije bavila *in vitro* uticajem α -glukana na produkciju imunoregulatornih i antiinflamatornih citokina (IL-27, IL-10), pa je nemoguće pretpostaviti kakvu bi aktivnost α -glukanska frakcija iz micelijuma *H. utrififormis*, imala *in vivo*, s obzirom na nešto ujednačeniju stimulaciju produkcije proinflamatornih i regulatornih citokina, od druga dva uzorka, kao i na činjenicu da je pokazala selektivnije dejstvo prema THP-1 ćelijama, odnosno monocitima.

Ekstrakti plodonosnih tela, sa značajno većim sadržajem β -glukana (37 i 25%, redom) pokazali su jako stimulatивно dejstvo na lučenje proinflamatornih citokina, već pri kocentraciji od 20 μ g/mL, a uticaj na produkciju imunoregulatornih citokina bio je sličan

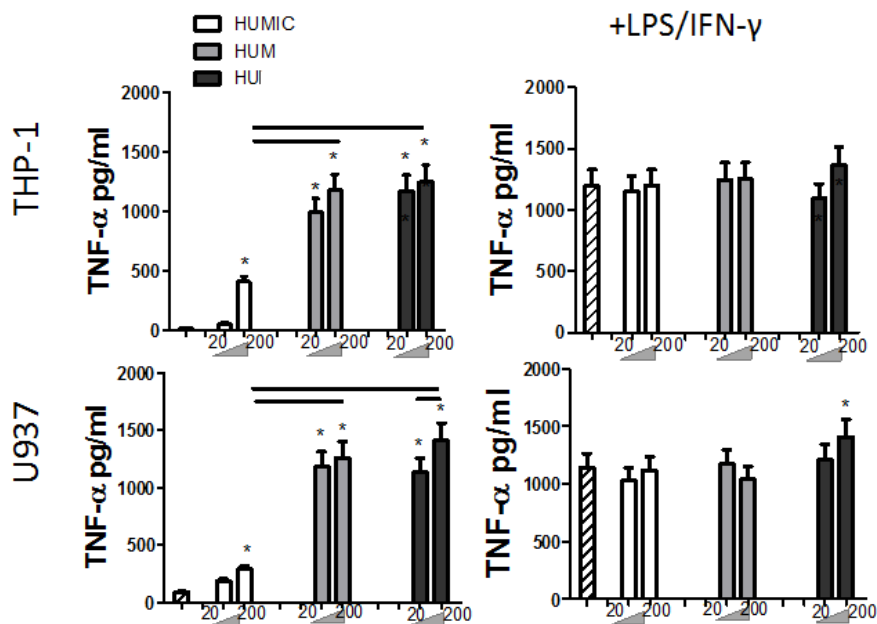
ekstraktu micelijuma. Ekstrakt mladih plodonosnih tela je imao najveći uticaj na produkciju proinflamatornog IL-1 β kod oba ćelijska tipa, ali i antiinflamatornog IL-10, u svim slučajevima (oba tipa ćelija, sa LPS/IFN γ stimulacijom i bez nje). Ekstrakt zrelih plodonosnih tela je imao gotovo identičan efekat na lučenje ostalih proinflamatornih citokina (TNF α i IL-6), ali slabiji efekat na lučenje IL10; ukupan efekat delovanja uzoraka mogao bi da se okarakteriše kao imunostimulatoran, mada su oba uzorka pokazala stimulišuću aktivnost na lučenje i imunomodulatornog IL-27 kod antigenom-nestimulisanih THP-1ćelija i IL-10 kod nestimulisanih U937 ćelija, tako da bi “neto” efekat *in vivo* mogao da bude funkcija više faktora. Nešto veći sveukupan efekat ekstrakta mladih plodonosnih tela mogao bi da se poveže sa većim sadržajem β -glukana u ovom uzorku u odnosu na ekstrakt zrelih (37% naspram 25%, redom).



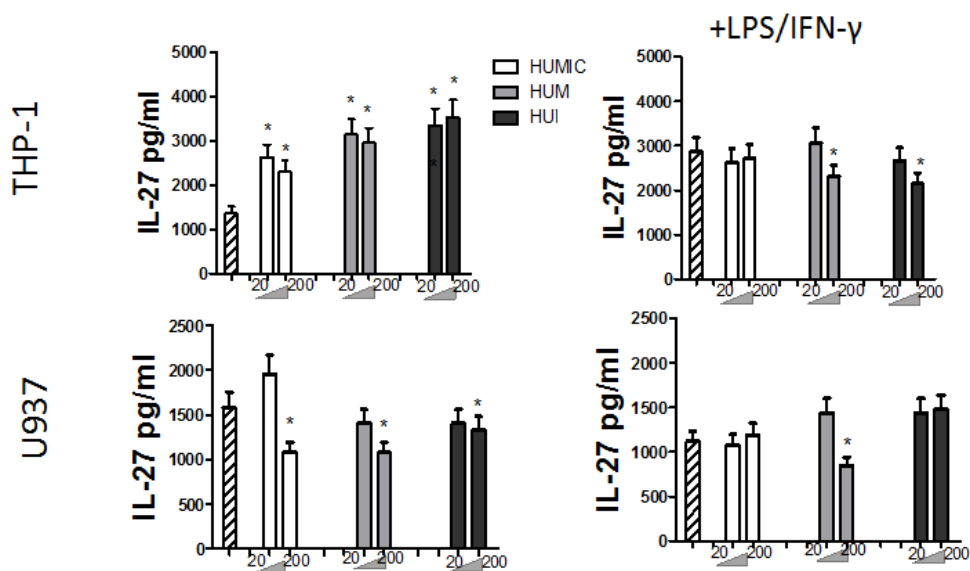
Slika 4.33. Uticaj ekstrakata na produkciju IL-1 β ; značajna razlika indikovana je */linijom



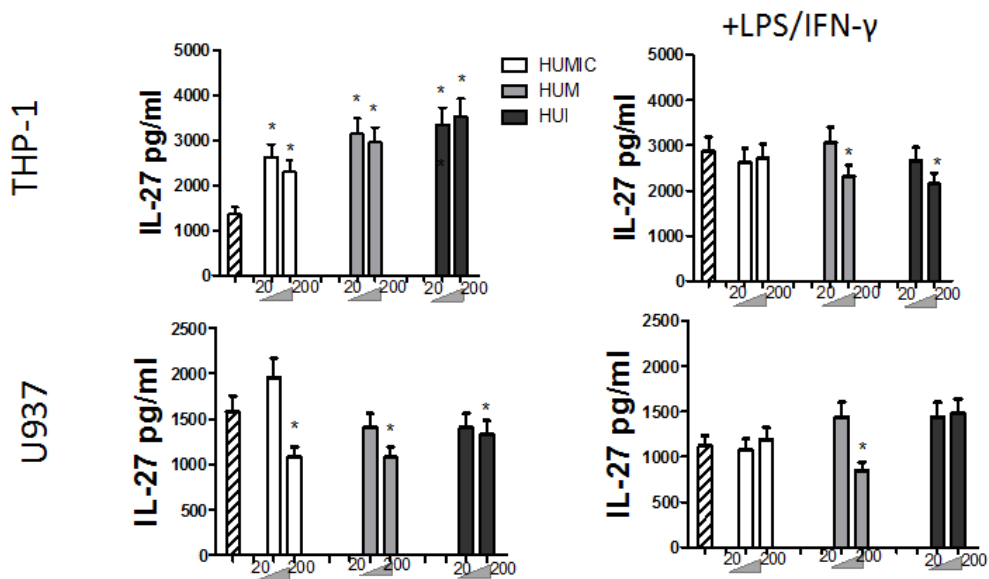
Slika 4.34. Uticaj ekstrakata na produkciju IL-6; značajna razlika indikovana je */linijom



Slika 4.35. Uticaj ekstrakata na produkciju TNF- α ; značajna razlika indikovana je */linijom



Slika 4.36. Uticaj ekstrakata na produkciju IL-27; značajna razlika indicovana je */linijom



Slika 4.37. Uticaj ekstrakata na produkciju IL-10; značajna razlika indicovana je */linijom

Međutim, kako je ekstrakt zrelih plodonosnih tela pokazao slabiju aktivnost na lučenje imunoregulatornog i antiinflamatornih citokina IL-27, odnosno IL-10, mogla bi se očekivati čak veća imunostimulacija u slučaju primene ovog uzorka nego ekstrakta mladih plodonosnih tela. Neophodna su dalja *in vivo* istraživanja da bi se utvrdio pun potencijal ovih kompleksnih makromolekulskih frakcija.

Imunološka/antitumorska istraživanja na glukanimi gljiva su najviše bila fokusirana na razgranatim (1→3)-β-D-glukanima i najveći broj okarakterisanih glukana sa imunomodulatornom/antitumorskom aktivnošću su upravo (1→3),(1→6)-β-D-glukani. Među njima su najviše istraživani lentinan (šitake, *Lentinula edodes*), skleroglukan (*Sclerotium* spp.), sklerotinan/sklerotan (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Sparassis crispa*), šizofilan (*Schizophyllum commune*), grifolan (*Grifola frondosa*), kao i glukani izolovani iz muhare (*Amanita muscaria*), bukovače i srodnih vrsta (*Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus tuber-regium*, *Pleurotus ostreatus*), hrastove sjajnice (*Ganoderma lucidum*), hrastove brade (*Hericium erinaceus*), kordicepsa (*Cordyceps sinensis*) žučare (*Tylophilus felleus*), pivskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) i mnogih drugih (Dalonso i saradnici, 2015; Novak & Vetvicka, 2008; Bashir & Choi, 2017). β-glukani sa (1→6) osnovicom, čije prisustvo je na osnovu fizičko-hemijskih analiza ekstrakata pretpostavljeno, manje su poznati, kao i biološka istraživanja na njima. Iz pominjanog somatskog hibrida gljiva *Pleurotus florida* i *Volvariella volvacea* izolovan je najpre linearni (1→6)-β-D-glukan, a zatim i razgranati (1→6),(1→3)-β-D-glukan, sa po jednom glukoznom reziduom u bočnom lancu, i oba glukana pokazala su *in vitro* sposobnost aktivacije makrofaga, dovodeći do povećane produkcije NO (Das i saradnici, 2010; Maity i saradnici, 2013); (1→6),(1→3)-β-D-glukan slične strukture kao što je ona predložena za glukan iz mladih plodonosnih tela *H. utrififormis* izolovana je iz šampinjona *Agaricus brasiliensis* (kao *A. blazei*) ali nisu ispitivana njegova biološka svojstva (Dong i saradnici, 2002). Međutim Mizuno i saradnici (1990) su ranije izolovali nekoliko polisaharidnih frakcija iz šampinjona *Agaricus brasiliensis* (kao *A. blazei*) sa antitumorskim delovanjem kod miševa sa implantiranim sarkoma-180 tumorom i među njima je bila i frakcija koju su takođe okarakterisali kao (1→6),(1→3)-β-D-glukan; frakciju je u manjoj meri činio i fukogalaktan, za koji je

pretpostavljeno da je iste veličine kao i glukan i da zbog toga njihovo razdvajanje nije bilo moguće. Kawagishi i saradnici (1989) su iz iste vrste izolovali kompleks proteina i linearnog (1→6)-β-D- glukana ("FIII-2-b") koji je pokazivao antitumorsku aktivnost kod miševa i potpunu regresiju sarkoma-180 u roku 6 nedelja nakon implantacije tumora kod 8 od 10 testiranih životinja. Proteini su određivani metodom po Lowry-ju, a određen je i relativni aminokislinski sastav, međutim, one nisu zasebno kvantifikovane. Protein iz kompleksa bio je otporan na dejstvo proteinaza, zbog ograničene rastvornosti ovog vodonerastvornog kompleksa. Kawagishi i saradnici (1990), nastavljajući istraživanja na ovoj frakciji, razdvojili su kompleks i utvrdili da se aktivnost pojedinačnih komponenti, tj. proteina i (1→6)-β-D-glukana smanjuje i da su aktivni pre svega u kompleksu. I dok ove studije ne povezuju eksplicitno *in vivo* antitumorsku aktivnost sa potencijalnom imunostimulirajućom aktivnošću ovih glukanskih frakcija, što se na osnovu istraživanja mehanizama dejstva β-glukana može pretpostaviti, za (1→6),(1→3)-β-D-glukansko-proteinski kompleks izolovanu iz maitake (*Grifola frondosa*) („frakcija D“) dokazano je da antitumorsku aktivnost *in vivo* pokazuje stimulacijom imunog sistema povećavajući koncentraciju TNF-α u krvi, ali i vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF); iako je VEGF odgovoran za neoangiogenezu u tumorskom tkivu i rast tumora, predloženo je da bolja prokrvljenost malignog tkiva omogućava bolje citotoksično delovanje TNF-α na tumorske ćelije (Matsui i saradnici, 2001). Međutim, za frakciju D je nedavno pokazano i da ima sposobnost direktnog uticaja na tumorske ćelije sisara, modulacijom njihovih ćelijskih procesa čime ih čini manje agresivnim (Alonso i saradnici, 2016). Obzirom na to da makromolekulski kompleksi izolovani iz plodonosnih tela *H. utrififormis* sadrže slične pretpostavljene strukture kao kompleksi izolovani iz relativno srodnog šampinjona *Agaricus brasiliensis* i maitake (*Grifola frondosa*), obećavajući su kandidati za dalju karakterizaciju njihovog imunomodulatornog dejstva. Novoizolovani polisaharidni makromolekulski kompleksi mogli bi da nađu primenu u terapiji stanja u kojima je aktivacija imunog odgovora neadekvatna; kod osoba sklonim virusnim i/ili bakterijskim/gljivičnim infekcijama ili pak obolelima od kancera. Stimulacija lučenja određenih citokina, pre svega TNF-α, ključna je u odbrani organizma od ćelija raka, a β-glukani gljiva *in vivo* pokazuju antitumorsku aktivnost. TNF-α je takođe ključan citokin u

ranoj fazi zarastanja rana, pa bi prema tome upotreba ovakvih proizvoda bila opravdana i za primenu na koži, uz adekvatan nosač aktivnih principa. Upravo zbog proširenja načina i mesta primene glukana, ispitana je i mogućnost inkapsuliranja ovih makromolekula u liposome za potencijalnu upotrebu na koži, ali i *per os*, za omogućavanje modifikovanog oslobađanja.

4.2.4. Inkapsulacija i karakterizacija lipozoma

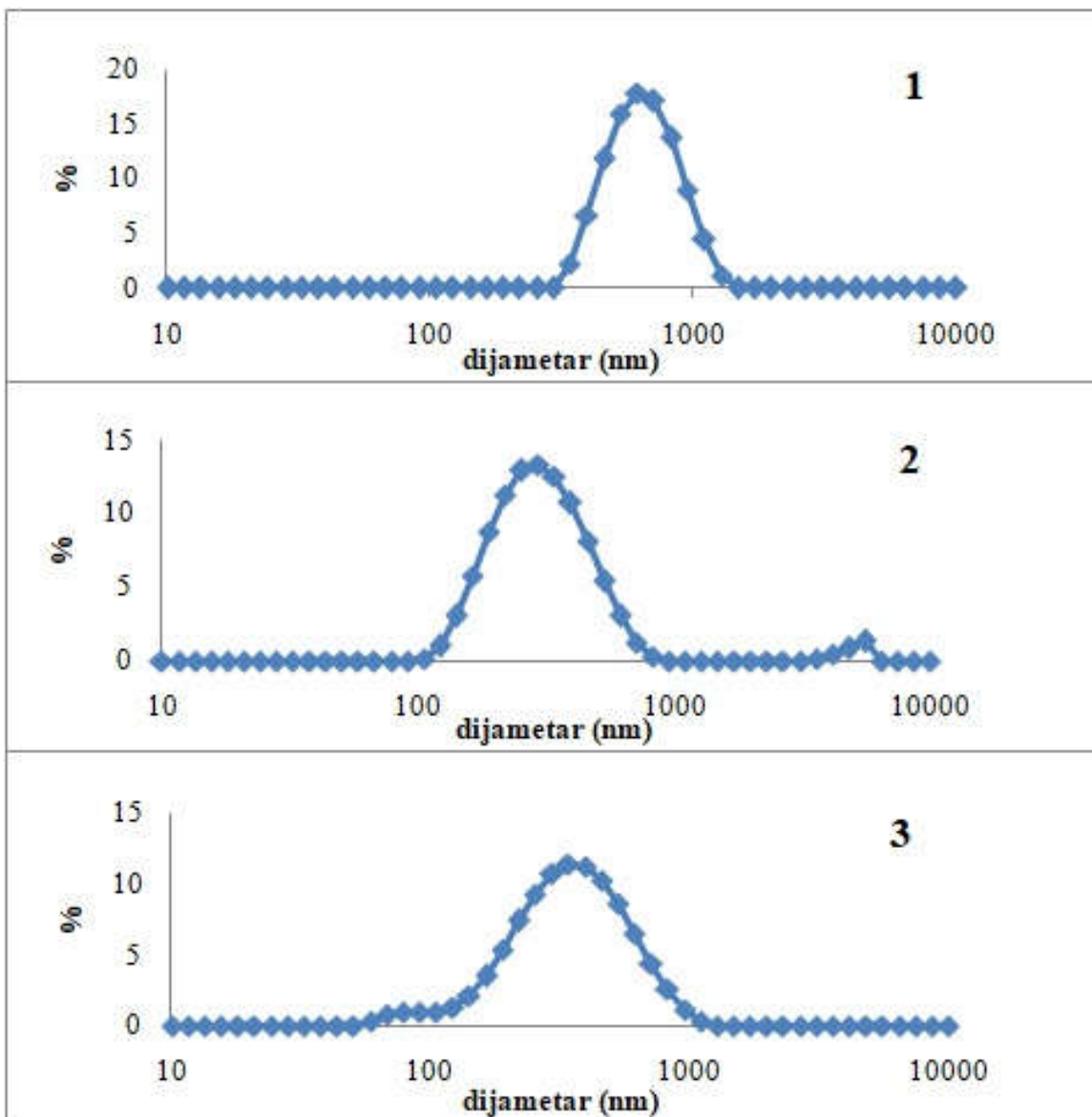
4.2.4.1. Karakterizacija lipozoma

Lipozomi su pripremljeni prolipoznom metodom u cilju ispitivanja mogućnosti inkapsulacije dobijenih aktivnih polisaharidnih ekstrakata. Kako je imunomodulatorna aktivnost izražena pri veoma niskim koncentracijama (<20 µg/mL), a uzorci su generalno slabo rastvorni pri koncentracijama većim od 10 mg/mL, koncentracija uzoraka podešena je na 2 mg/mL u lipozomalnim preparatima. Obzirom na drugačiju strukturu uzoraka, očekivani su različiti rezultati u pogledu veličine lipozoma, stepena inkapsulacije i Zeta-potencijala, odnosno stabilnosti, pre svega zbog razlike u sastavu polisaharidne frakcije, količine prisustnih proteina, količine kiselih i bazni grupa, kao i fenolnih komponenti/melaninskih struktura, koje bi eventualno dovele do promene stabilnosti sistema.

Lipozomi dobijeni inkapsulacijom polisaharida mladih i zrelih puhara slične su veličine, raspona veličina po intenzitetu od 60-1000 nm, sa najvećim procentom čestica u rasponu od 200-500 nm. Lipozomi sa polisaharidnim ekstraktom mladih plodonosnih tela pokazuju raspodelu veličina po intenzitetu od 100-800 nm, sa blizu 90% čestica u rasponu od 160-530 nm i "pikom" distribucije na 295.3 nm (13.3% čestica). Lipozomi sa ekstraktom zrelih plodonosnih tela su nešto veći i manje uniformni, sa rasponom distribucije po intenzitetu od 60-1000 nm, oko 90% lipozoma u rasponu od 160-700 nm i "pikom" distribucije na 342 nm (11.4% čestica). S druge strane, lipozomi sa inkapsuliranim polisaharidnim ekstraktom micelijuma značajno su veći, distribucije veličina po intenzitetu u rasponu od 340-1280 nm, sa nešto više od 90% lipozoma u rasponu od 400-950 nm i "pikom" distribucije na 615 nm (~18%). Sami polisaharidi u vodenom rastvoru formiraju koloidne čestice koje u slučaju ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela pokazuju raspodelu veličina po intenzitetu većih od

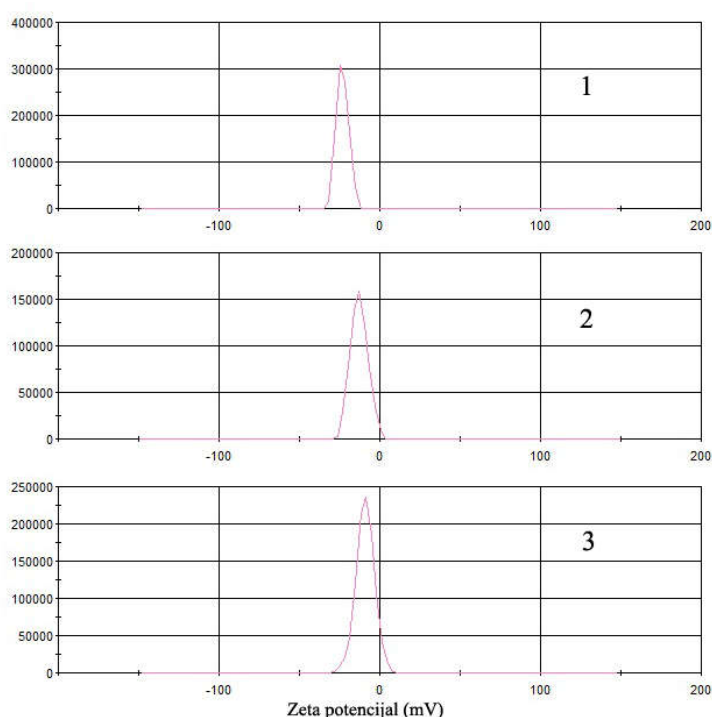
samih lipozoma u koje su inkapsulirani; tako rastvor HUI-a pokazuje raspodelu veličina koloidnih čestica sa pikom na 700-800 nm, a rastvor HUM-a na 530-615 nm. Pomeranje raspodele veličine nakon sinteze lipozoma takođe ukazuje na uspešnost inkapsulacije; s druge strane, HUMIC ponovo pokazuje drugačije ponašanje, sa raspodelom veličina po intenzitetu koja se kreće od 30-150 nm i značajno većim lipozomima. Zbog prisustva proteina i balastnih materija (melanina) moguće je da HUI i HUM mogu bolje da se emulguju u toku pripreme, pri čemu se “razbija” koloidna struktura njihovih rastvora i omogućava nastanak malih lipozoma. HUMIC ne sadrži takve strukture, pa možda dolazi do agregacije rastvorenih čestica u toku pripreme i stvaranje većih koloidnih čestica, a samim tim i većih lipozoma.

Zeta-potencijal sva tri lipozomolna sistema ima relativno malu apsolutnu vrednost što ukazuje na dugoročnu nestabilnost. Sveži lipozomi sa ekstraktom micelijuma imali su najveću apsolutnu vrednost Zeta potencijala od -22 mV, što je vrlo slično vrednosti Zeta potencijala praznih lipozoma, sintetisanih istom metodom (-23 mV). Zeta potencijal samog rastvora HUMIC-a je skoro neutralan, oko -4 mV, što ukazuje na to da ekstrakt ne interaguje sa membranama lipozoma već se nalazi u unutrašnjosti čestica. Zeta potencijal lipozoma sa ekstraktima mladih i zrelih plodonosnih tela imaju veće vrednosti Zeta potencijala, odnosno manje apsolutne vrednosti, -12, odnosno -8 mV, redom. Obzirom da su vrednosti Zeta potencijala za ove uzorke -6.5 i -12.8 mV, redom, promena u vrednosti Zeta potencijala u odnosu na prazne lipozome, kao i same rastvore uzoraka ukazuje na interakciju sa samim membranama lipozoma, tj. drugačiju strukturu lipozoma i drugačiji mehanizam inkapsulacije u odnosu na HUMIC.



Slika 4.38. Raspodela veličina lipozoma po intenzitetu sa polisaharidnim ekstraktima micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3)

Procenat inkapsulacije izračunat je indirektno, korišćenjem supernatanta nakon precipitiranja lipozoma iz suspenzije. S pretpostavkom da HUI i HUM predstavljaju relativno homogenu makromolekulsku frakciju i uz činjenicu da pokazuju UV-VIS apsorpciju (posebno HUM) količina ekstrakata u supernatantu mogla je da bude preračunata na osnovu apsorpcije u UV oblasti (na 253 nm), korišćenjem standardne krive konstruisane korišćenjem serijskih razblaženja uzoraka. Procenat inkapsulacije određivan je i preko ukupnih šećera, a u slučaju micelijuma morao je da bude određivan samo na osnovu ukupnih šećera pošto ekstrakt micelijuma pokazuje vrlo slabu apsorpciju u UV oblasti.



Slika 4.39. Zeta potencijal lipozoma sa polisaharidnim ekstraktima micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3)

Najbolja inkapsulacija postignuta je u slučaju micelijuma, oko 60%, nešto je slabija u slučaju polisaharida zrele glebe, oko 50%, a najslabija u slučaju polisaharida mladih puhara, oko 40%. U sva tri slučaja, međutim, može se reći da je stepen inkapsulacije zadovoljavajući, ako se uzme u obzir da je stepen inkapsulacije u liposome uopšte često i ispod 30%, naročito ako su male veličine.

4.2.4.2. *Studija stabilnosti lipozoma*

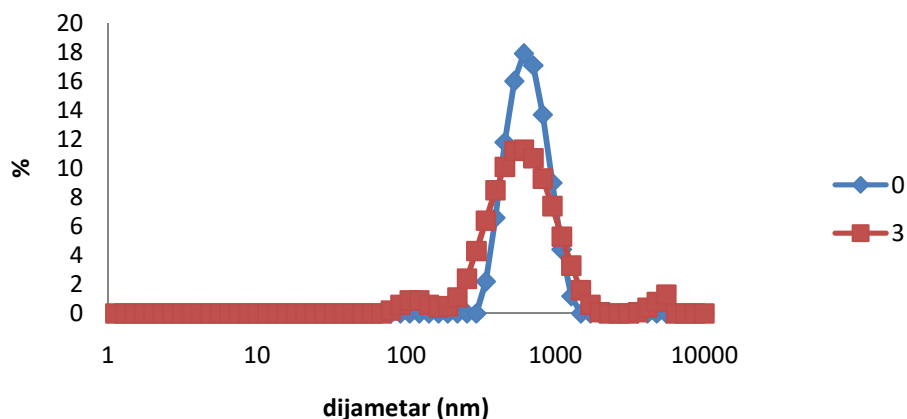
Veličina i Zeta potencijal lipozoma praćeni su tokom 3 meseca, pri ćemu su ćuvani u frižideru, na 4 °C.

Nakon 3 meseca uzorci su pokazali razlićit stepen (ne)stabilnosti; lipozomi sa polisahardinim ekstraktima plodonosnih tela generalno su se pokazali stabilnijim od onih sa ekstraktom micelijuma. Kod lipozoma s ekstraktom mladih plodonosih tela došlo je do blagog pomeranja raspodele velićina po intenzitetu ka većim velićinama, uz pomeranje i pika distribucije na oko 400 nm. Uz to, došlo je do povećanja frakcije veće od 1000 nm sa 2.6 na ćak 17.5%, što se povezuje sa stvaranjem aglomerata i/ili koalescencijom. Zeta potencijal uzorka je s druge strane ostao nepromenjen (-12 mV). Lipozomi sa polisaharidnim ekstraktom zrelih plodonosnih tela pokazali su se znaćajno stabilnijim, sa praktićno nepromenjenom distribucijom velićina po intenzitetu; i u ovom uzorku došlo je do stvaranja aglomerata, s pojavom ćestica većim od 1000 nm, ali ova frakcija ćinila je svega 1.2% raspodele. Zeta potencijal je takođe ostao praktićno nepromenjen (-9 mV). Kod lipozoma sa ekstraktom micelijuma došlo je do vidljivog proširenja opsega raspodele velićine ćestica, sa stvaranjem frakcija većih, ali i manjih velićina, uz zadrćavanje istog “pika” distirbucije (615 nm, 11.3% ćestica). Pojava frakcije veće od 4000 nm (2.6%) ukazuje na aglomeraciju lipozoma, ali frakcija ćestica velićine od 70-150 nm (3.2%) poklapa se sa raspodelom velićina koloidnog rastvora polisaharidnog ekstrakta micelijuma što ukazuje na postepeno otpuštanje ekstrakta iz lipozoma. Pri tom, došlo je do povećanja vrednosti zeta potencijala ovog uzorka (odnosno smanjenja apsolutne vrednosti), na -17 mV.

Od svih uzoraka, lipozomi sa ekstraktom zrelih plodonosnih tela pokazali su najbolju kratkoroćnu stabilnost; formulacije druga dva uzorka bilo bi neophodno modifikovati da bi se obezbedila zadovoljavajuća stabilnost sistema. Lipozomi sa ekstraktom micelijuma, iako sintetisani istom metodom, bili su znaćajno veći nego oni sa ekstraktima plodonosnih tela; sama velićina, uz nedovoljno veliki apsolutni zeta potencijal je destabilišući faktor. Druga dva lipozomalna sistema imala su ćestice manjih velićina, ali sa znaćajno manjim

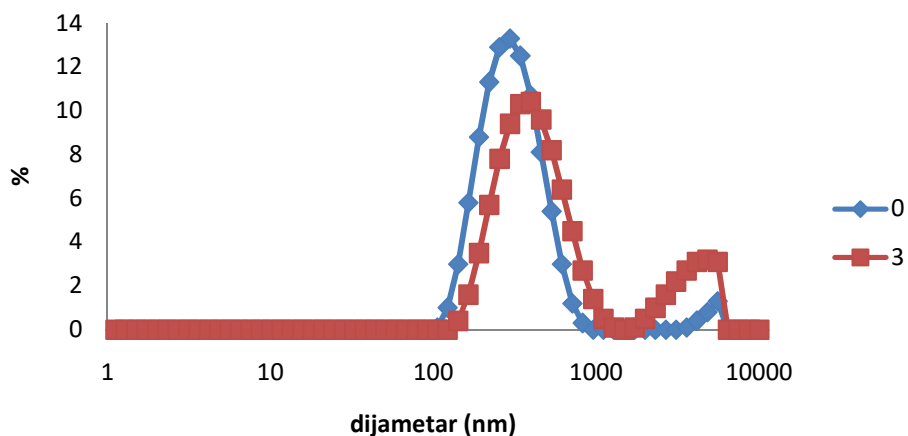
apsolutnim vrednostima zeta potencijala. Lipozomi sa ekstraktom zrelih puhara bili su čak nešto veći od onih sa ekstraktom mladih plodonosnih tela i uz to imali nešto manji apsolutni zeta potencijal, ali su se pokazali stabilnijim. Zeta potencijal nije faktor koji je ključan za opisivanje stabilnosti ovih sistema, a ni veličina, već je to možda pre način organizacije lipozoma, tj. interakcija samih makromolekula sa membranom i njihov raspored u lipozomima. Polisaharidi gljiva su voluminozni i skloni hidrataciji i ako se delom nalaze na spoljnoj strani membrane, mogli bi da spreče bliski kontakt lipidnih membrana i njihovu fuziju. Veći sadržaj proteina (i melanina), mogao bi isto da ima veliku ulogu u postizanju veće stabilnosti. Frakcija izolovana iz zrelih puhara je heterogenija nego ona izolovana iz mladih, pa prisustvo proteina i drugih molekulskih grupa verovatno doprinosi stabilizaciji sistema. Neinkapsulirani deo takođe može da učestvuje u stabilizaciji, s obzirom na to da i sami polisaharidi formiraju stabilne koloidne rastvore; oni bi mogli da učestvuju u “održavanju” lipozoma u rastvoru.

Studija stabilnosti - HUMIC



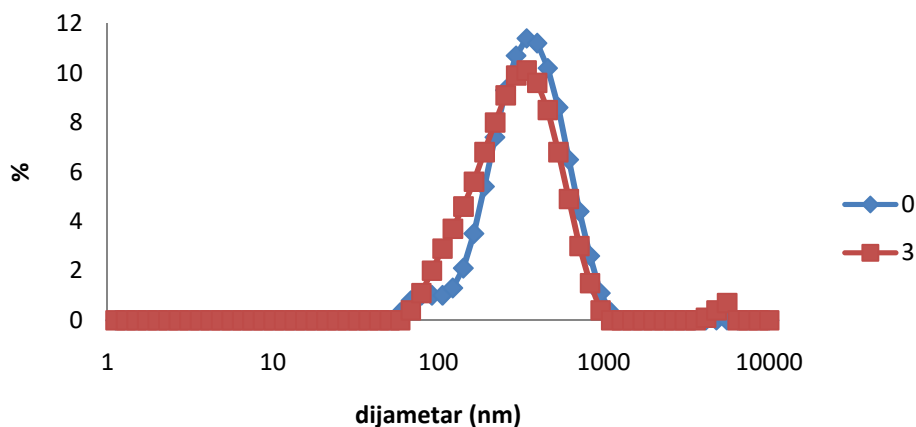
Slika 4.40. Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom micelijuma; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3)

Studija stabilnosti - HUI



Slika 4.41 Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom mladih plodonosnih tela; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3)

Studija stabilnosti - HUM

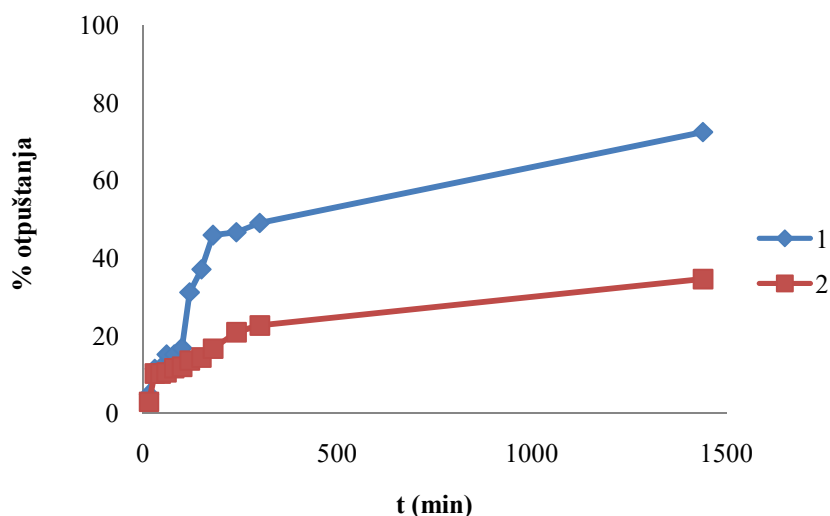


Slika 4.42. Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom zrelih plodonosnih tela; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3)

4.2.4.3. Kinetika otpuštanja aktivnih komponenata

Otpuštanje polisaharidnih ekstrakata iz pračeno je tokom 24h. Kinetika otpuštanja aktivnih komponenti se razlikuje među uzorcima, ali je u sva tri slučaja inkapsulacijom u lipozome dobijeno usporeno/produženo oslobađanje aktivnih komponenti.

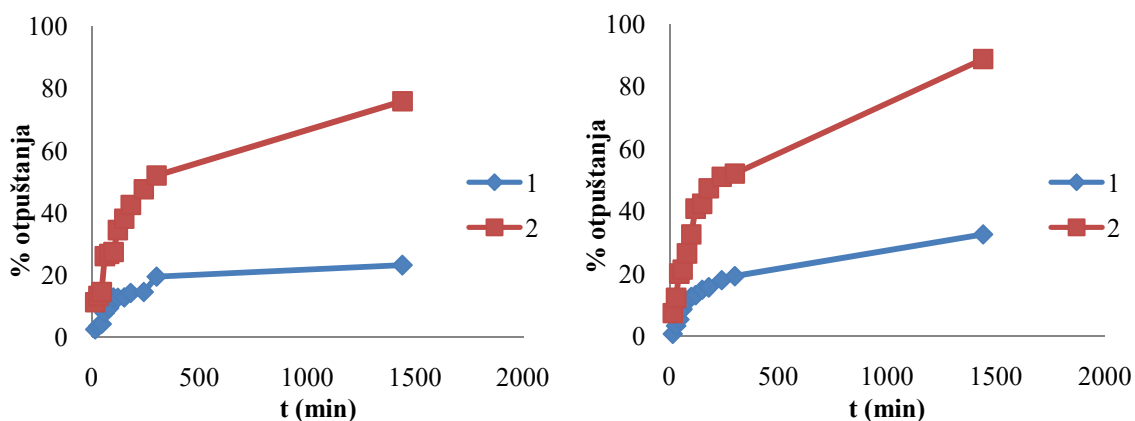
Polisaharidni ekstrakt micelijuma pri rastvaranju, po svemu sudeći, formira stabilan koloid tako da je i prolazak samih polisaharida iz rastvora kroz sintetičku membranu relativno spor, pa je nakon 24h koncentracija polisaharida u akceptorskom delu iznosila oko 72.5%. Inkapsulacijom u lipozome otpuštanje polisaharida je dodatno usporeno, tako da je svega oko 35% uzorka otpušteno nakon 24h. Otpuštanje je u početku relativno brzo, sa oko 10% otpuštenog uzorka nakon 1h, što ukazuje na prisustvo polisaharida koji su vezani na površini i/ili u samoj membrani čestice. Ako se uporedi brzina oslobađanja uzorka iz lipozoma i rastvora, primećuje se da tokom prvih 45 min praktično nema razlike u koncentraciji uzorka u akceptorskom sudu – što bi moglo da se objasni, kako je rečeno, slabo vezanim polisaharidima u lipozomnoj formulaciji i prisustvu neinkapsuiranog uzorka. Međutim već nakon 1h dolazi do vidljive razlike, i usporavanja ukupnog oslobađanja uzorka iz lipozoma za oko 33% u odnosu na rastvor (10.5 i 15.2%, redom).



Slika 4.43. Uporedna studija otpuštanja polisaharidnog ekstrakta micelijuma iz rastvora i iz lipozoma.

Polisaharidni ekstrakti mladih i zrelih puhara pored šećera sadrže i proteine i melaninske komponente, koji sadrže fenolne grupe zbog čega i pri relativno niskim koncentracijama intenzivno apsorbiraju u UV oblasti; zbog toga je otpuštanje ovih uzoraka moglo da se prati dvema metodama, merenjem ukupnih šećera, ali i preko apsorpcije u UV oblasti, na 255 nm, što je daleko jednostavnije jer ne zahteva derivatizaciju šećera upotrebom opasnih i toksičnih reagenasa. Potencijalni problem je (ne)homogenost uzoraka; ne može se pouzdano znati da li su komponente koje pokazuju UV apsorpciju ravnomerno vezane za polisaharidne komponente.

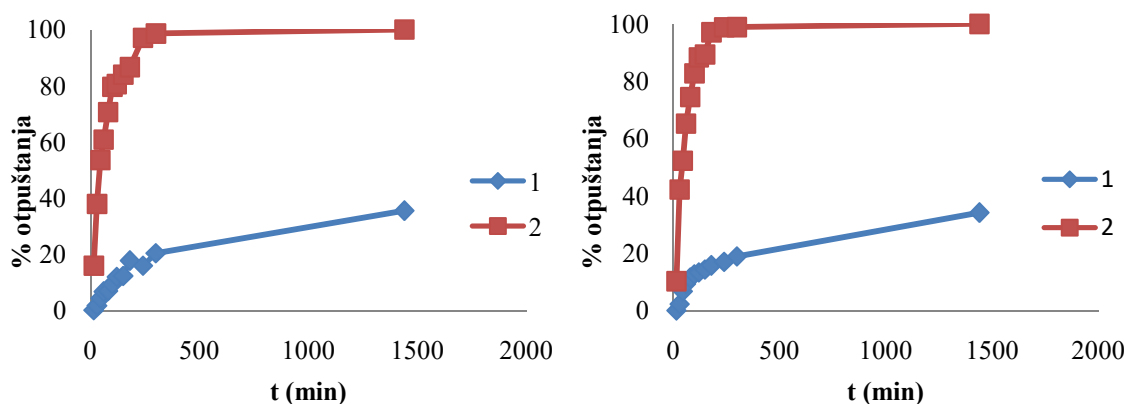
Polisaharidi mladih puhara pokazuju istu kinetiku prolaska kroz membranu, bilo da se radi o čistom rastvoru ili lipozomima, što je potvrđeno obema metodama određivanja uzorka. Sadržaj šećera određivan fenol-sumpornom metodom ili UV-spektrometrijom nakon 24 h dostiže 75.9%, odnosno 88.8%, redom. Procenat otpuštenog uzorka određivan dvema metodama je sličan do 80. min, a nakon toga procenat otpuštenog uzorka je značajno veći ako se određuje UV-metodom, u odnosu na fenol-sumpurnu metodu. Ta razlika se održava na oko 4-6% i dostiže svoj maksimum nakon 24h, od čak 13%. Ovo ukazuje na nedovoljnu homogenost uzorka i na brži prolazak makromolekulske frakcije koja pokazuje apsorpciju u UV oblasti, tj. one koja sadrži proteine/melanine. S obzirom na to da su glukani nosioci biološke funkcije, relevantnije je pratiti otpuštanje uzorka preko ukupnih šećera. Praćenje otpuštanja uzorka dvema metodama dalo je međusobno sličnije rezultate u slučaju lipozoma; oko 10% uzorka oslobađa se nakon 80 min, dok se 20% uzorka oslobađa nakon 5h, prateći logaritamsku kinetiku. Razlika je međutim očigledna nakon 24h kada se, računajući preko ukupnih šećera dolazi do brojke od 23.1% otpuštenog uzorka i oko 32.7% ako se računa preko UV-apsorpcije. U svakom slučaju, ostvareno je značajno produžavanje otpuštanja, oko 3 puta.



Slika 4.44. Studija otpuštanja polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela (1) i odgovarajućih lipozoma (2), urađena fenol-sumpornom metodom (levo) i direktnim merenjem apsorbance na 254 (desno).

Polisaharidi zrele puhare, za razliku od polisaharida micelijuma i mladih plodonosnih tela značajno brže difunduju iz rastvora i kompletno difunduju kroz membranu u roku od 24h. Nešto više od 50% uzorka prolazi membranu već nakon 45 min, a oko 90% između 2.5 i 3h i blizu 99% uzorka nakon 5h, mereno obema metodama. Razlike pri određivanju stepena prolaska preko ukupnih šećera i UV-apsorpcijom postoje i u ovom slučaju i u proseku iznose oko 4%, s tim što su procenti ponovo nešto veći pri određivanju UV metodom – verovatno je i u ovom slučaju uzorak nedovoljno homogen i dolazi do bržeg prolaska komponenti koje značajnije apsorbuju u UV oblasti. Značajno brži prolazak uzorka kroz membranu se može pripisati boljom rastvorljivošću, koja je verovatno posledica prisustva veće količine proteina i kiselih grupa, imajući u vidu da je FT-IR analiza ukazala na veće prisustvo karboksilnih grupa i da je zeta potencijal ovog uzorka negativan, s većom apsolutnom vrednošću nego zeta potencijal druga dva uzorka. Takođe, pretpostavljena struktura β -glukanske frakcije ovog uzorka je razgranatija, a razgranati polisaharidi su rastvoroživiji. Ekstrakt mladih plodonosnih tela sadrži i veći udeo linearnog galaktana, koji sadrži i metilovane monosaharidne jedinice i čija bi rastvorljivost verovatno bila manja od β -glukana, ali to je samo pretpostavka. Konformacija koju potencijalno prisutni kompleksi polisaharida i proteina/melanina zauzimaju bi takođe mogla da utiče na rastvorljivost.

Inkapsulacijom u lipozome ostvaren je značajan efekat usporavanja difuzije, a procenat otpuštenog uzorka je vrlo sličan pri određivanju obema metodama. U prvih 30 min oslobađa se svega oko 2% uzorka, što je približno 20x manje u odnosu na prolazak uzorka iz rastvora. Ovo ukazuje na čvrste veze između uzorka i nosača, verovatno jačih nego što je to slučaj kod druga dva uzorka. Nakon 2h iznosi dolazi do oslobađanja oko 10% uzorka, a nakon 5h ukupno 20% uzorka. Posle 24h, oslobađa se ukupno 35% uzorka, oko 3x manje nego iz čistog rastvora.



Slika 4.45. Studija otpuštanja aktivnih komponenti polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela, urađena fenol-sumpornom metodom (1) i direktnim merenjem apsorbance na 254 nm (2)

U zaključku, sve tri makromolekulske frakcije uspešno su inkapsulirane u lipozome, sa zadovoljavajućim stepenom inkapsulacije i produženim oslobađanjem. Lipozomi su kratkoročno relativno stabilni, ali je neophodna optimizacija uslova inkapsulacije, ne bi li se dobili još manji lipozomi, sa većim stepenom inkapsulacije, koji bi mogli da prodru u dublje slojeve kože. Produženo oslobađanje obezbedilo bi dopremanje aktivnih polisaharida do mesta delovanja, tj. imunih ćelija u dermisu. Uz to, treba napomenuti da ekstrakt zrelih plodonosnih tela pokazuje i izrazitu antioksidativnu aktivnost, uz mogućnost sprečavanja (per)oksidacije linoleinske kiseline, što može da produži stabilnost ovih preparata.

5. Zaključci

- Ispitivane vrste puhara relativno su dobar izvor fiziološki aktivnih komponenti i pokazuju različite biološke aktivnosti
- Metanolni ekstrakti mladih plodonosih tela bogati su šećerima, antioksidansima/polifenolnim jedinjenjima i lovastatinom
- Metanolni ekstrakti zrelih plodonosnih tela sadrže značajno manje neutralnih šećera i lovastatina, ali su uglavnom značajno bogatiji antioksidansima/fenolnim jedinjenjima, α -tokoferolom, ergosterolom, slobodnim masnim kiselinama i sadrže slobodni *N*-acetilglukozamin
- Autoliza evidentno dovodi do povećanja sadržaja/olakšavanja ekstrakcije nekih biološki aktivnih komponenti, kao što su ergosterol i α -tokoferol, ali i do sinteze značajno aktivnijih jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću. Hitinoliza dovodi do oslobađanja fiziološki aktivnog *N*-acetilglukozamina
- Metanolni ekstrakti zrelih plodonosnih tela su naročito bogati komponentama uključenim u regeneraciju kože
- Metanolni ekstrakt zrelih plodonosnih tela *H. utrififormis* u većini slučajeva se pokazao kao najbolji izvor ispitivanih biološki aktivnih komponenata
- Metanolni ekstrakt micelijuma bogat je šećerima i predstavlja vrlo dobar izvor industrijski važnog šećera trehaloze, obzirom da daje najveći prinos ekstrakcije a može da se lako uzgaja u laboratorijskim uslovima
- Metanolni ekstrakti zrelih plodonosnih tela bili su superiorniji u pogledu antioksidativne aktivnosti, što je u korelaciji sa većim sadržajem fenolnih komponenata
- Metanolni ekstrakti zrelih puhara takođe su pokazali značajno bolju inhibitornu aktivnost na tirozinazu, kao i na acetyl- i butirilholinesterazu, α -amilazu i α -glukozidazu, dok su prema HMG-CoA reduktazi bolju aktivnost pokazali ekstrakti mladih plodonosnih tela

- Metanolni ekstrakti su pokazali antimikrobnu aktivnost, koja je bila značajno bolja kod ekstrakata mladih plodonosnih tela i ekstrakta micelijuma, što ukazuje na to da autoliza vodi degradaciji jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću
- Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata *H. utriformis* i, naročito, *H. excipuliformis* bila je selektivnija prema kancerskim ćelijskim linijama, a aktivnost ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela bila je uporediva
- Polisaharidni ekstrakti micelijuma i plodonosnih tela strukturno su se značajno razlikovali; α -glukani, okarakterisani kao (1→4),(1→6)- α -D-glukani, činili su većinski sadržaj ekstrakta micelijuma. Šećerni sastav ekstrakata mladih i zrelih plodonosnih tela bio je sličan (glukoza, galaktoza i manoz), ali se sadržaj ukupih šećera i β -glukana značajno razlikovao i bio veći u ekstraktu mladih plodonosnih tela, kao i zastupljenost određenih tipova glikozidnih veza; prisustvo β (1→6) i β (1→3) veza utvrđeno je u oba uzorka, ali su β (1→3) veze bile zastupljenije u polisaharidnoj frakciji zrelih plodonosnih tela. Glukani plodonosnih tela okarakterisani su kao razgranati (1→6),(1→3)- β -D-glukani. U oba uzorka bio je prisutan i parcijalno metilovani (1→6)- α -D-galaktan, koji je pored galaktoznih jedinica, sadržao i 3-O-metilgalaktozne jedinice. Ovi uzorci su takođe sadržali i nešećerne komponente, proteine i potencijalno melaninske strukture, posebno ekstrakt zrelih plodonosnih tela, ali ove komponente nisu mogle da budu u potpunosti kvalitativno i kvantitativno okarakterisane. Deproteinizacija se pokazala kao nepotreban korak u prečišćavanju, jer je dovela do značajnog gubitka uzoraka, a neproporcionalnom, neznačajnom smanjenju sadržaja proteina, koji nisu mogli da budu u potpunosti uklonjeni. Ovo ukazuje na prisustvo polisaharidno-protenskih kompleksa, kakvi su već ranije opisani iz nekih vrsta gljiva.
- Polisaharidni ekstrakt zrelih plodonosnih tela pokazao je najbolju antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost, što se koreliše sa većim sadržajem proteina
- Polisaharidni ekstrakti plodonosnih tela pokazali su značajno bolju imunomodulatornu aktivnost nego ekstrakt micelijuma, a polisaharidni ekstrakt mladih plodonosnih tela imao je nešto izraženiju aktivnost, što se korelisalo sa ukupnim β -glukanima

- Polosaharidni ekstrakti plodonosnih tela doveli su do snažne stimulacije lučenja proinflammatoryh citokina kod makrofaga i monocita, što ih čini potencijalno efikasnim imunostimulirajućim agensima
- Ostvaren je zadovoljavajući stepen inkapsulacije u liposome za sva tri uzorka (40-60%) i zadovoljavajuća stabilnost ovih preparata u kratkoročnoj studiji stabilnosti. Lipozomi sa ekstraktima plodonosnih tela bili su značajno manji, ali je neophodna optimizacija sinteze da bi se dobili dovoljno mali lipozomi za efikasan prolazak u dublje slojeve kože. Ostvareno je i značajno produženo oslobađanje u sva tri slučaja.
- Mlada plodonosna tela, koja su jestiva, dobar su izvor antioksidanasa, lovastatina kao i imunomodulatornih polisaharida, pa mogu da budu okarakterisana kao funkcionalna namirnica
- Zrela plodonosna tela odličan su izvor antioksidanasa i fiziološki aktivnih komponenata, naročito onih uključenih u regeneraciju tkiva, pa su potencijalno dobar izvor za dobijanje preparata za kozmetičke proizvode ili dijetetske suplemente
- Micelijum ne može da zameni plodonosna tela, ali je odličan izvor trehaloze i glikogena pa može da nađe upotrebu takođe u kozmetičkim proizvodima

Literatura

- Adeyeye, S. A. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1).
- Agrahar-Murugkar, D., & Subbulakshmi, G. (2005). Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89(4), 599-603.
- Akata, I., Zengin, G., Picot, C., & Mahomoodally, M. (2018). Enzyme inhibitory and antioxidant properties of six mushroom species from the Agaricaceae family. *South African Journal of Botany*.
- Akatin, M. Y. (2013). Characterization of a β -Glucosidase from an Edible Mushroom, *Lycoperdon pyriforme*. *International Journal of Food Properties*, 16(7), 1565-1577.
- Akatin, M., Colak, A., & Saglam Ertunga, N. (2011). Characterization of an esterase activity in *Lycoperdon pyriforme*, an edible mushroom. *Journal of Food Biochemistry*, 37(2), 177-184.
- Alam, N., Yoon, K. N., Lee, J. S., Cho, H. J., & Lee, T. S. (2012). Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(1), 111-118.
- Almendros, G., Martín, F., González-Vila, F., & Martínez, A. (1987). Melanins and lipids in *Lycoperdon perlatum* fruit bodies. *Transactions of the British Mycological Society*, 89(4), 533-537.

- Alonso, E. N., Ferronato, M. J., Gandini, N. A., Fermento, M. E., Obiol, D. J., López Romero, A., ... Curino, A. C. (2016). Antitumoral Effects of D-Fraction from *Grifola frondosa* (Maitake) Mushroom in Breast Cancer. *Nutrition and Cancer*, 69(1), 29-43.
- Alonso, J., Garcia, M. A., Perez-Lopez, M., & Melgar, M. J. (2003). The Concentrations and Bioconcentration Factors of Copper and Zinc in Edible Mushrooms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(2), 180-188.
- Altuner, E. M., Akata, I., & Canli, K. (2012). In vitro Antimicrobial Activity Screening of *Bovista nigrescens* Pers. *Kastamonu Univ., Journal of Forestry Faculty*, 12(1), 90-96.
- Alves, M., Ferreira, I., 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.
- Amirullah, N. A., Zainal Abidin, N., & Abdullah, N. (2018). The potential applications of mushrooms against some facets of atherosclerosis: A review. *Food Research International*, 105, 517-536.
- Antonini, G., Pitari, G., Caccuri, A. M., Ricci, G., Boschi, D., Fruttero, R., ... Ascenzi, P. (1997). Inhibition of Human Placenta Glutathione Transferase Pl-1 by the Antibiotic Calvatic Acid and its Diazocyanide Analogue. Evidence for Multiple Catalytic Intermediates. *European Journal of Biochemistry*, 245(3), 663-667.

- Ariff, A., Salleh, M., Ghani, B., Hassan, M., Rusul, G., & Karim, M. (1996). Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* link. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(7), 545-550.
- Arumugam, R., Kirkan, B., & Sarikurkcü, C. (2018). Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of methanolic extracts from different parts of *Astragalus ponticus* Pall. *South African Journal of Botany*, *120*, 268-273.
- Baker, T. (1989). Fungal styptics. *Mycologist*, *3*(1), 19-20.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Baptista, P., & Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(6), 1076-1079.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2008). Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A Comprehensive Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(10), 3856-3862.
- 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.
- Bashir, K. M., & Choi, J. (2017). Clinical and Physiological Perspectives of β -Glucans: The Past, Present, and Future. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9), 1906.

- Bates, S. T., Roberson, R. W., & Desjardin, D. E. (2009). Arizona gasteroid fungi I: Lycoperdaceae (Agaricales, Basidiomycota). *Fungal Diversity*, 37, 153-207.
- Bell, A. & Wheeler M. (1986). Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 411-451.
- Belozerskaya, T. A., Gessler, N. N., & Aver'yanov, A. A. (2015). Melanin Pigments of Fungi. *Fungal Metabolites*, 1-29.
- Beneke, E. S. (1963). Calvatia, Calvacin and Cancer. *Mycologia*, 55(3), 257-270.
- Bentley, R., Lavate, W., & Sweeley, C. C. (1964). Lipid components of two basidiomycetes—Calvatia gigantea and Clitocybe illudens. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 11(3), 263-268.
- Bills, G. F., & Gloer, J. B. (2016). Biologically Active Secondary Metabolites from the Fungi. *Microbiol Spectrum*, 4(6), 1-32.
- Blair, L. M., & Sperry, J. (2013). Natural Products Containing a Nitrogen–Nitrogen Bond. *Journal of Natural Products*, 76(4), 794-812.
- Boa, E. R. (2004). *Wild Edible Fungi: A Global Overview of Their Use and Importance to People*. Rome, Italy: Food & Agriculture Org.
- Boual, Z., Kemassi, A., Khelil, A. O., Michaud, P., & Hadj, M. D. (2012). Partial Characterization and Hydrolysis Procedure of Water Soluble Polysaccharides Extracted from Onesaharian Medicinal Plant: Malvaegyptiaca L. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 100-103.

- Bradford, 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.
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1986). *Fungi of Switzerland: Non-gilled fungi: Heterobasidiomycetes, Aphyllophorales, Gasteromycetes*. Lucerne, Switzerland: Verlag Mykologia
- Brzin, B., & Dežman, B. (1978). The effect of the fungus *Clavatia utriformis* on the morphological picture and physiological behaviour of bacteria. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 133(7-8), 738-744.
- Burk, W. R. (1983). Puffball Usages Among North American Indians. *Journal of Ethnobiology*, 3(1), 55-62.
- Butkhup, L., Samappito, W., & Jorjong, S. (2017). Evaluation of bioactivities and phenolic contents of wild edible mushrooms from northeastern Thailand. *Food Science and Biotechnology*, 27(1), 193-202.
- Calvino, R., Fruttero, R., Gasco, A., Miglietta, A., & Gabriel, L. (1986). Chemical and biological studies on calvatic acid and its analogs. *The Journal of Antibiotics*, 39(6), 864-868.
- Camelini, C. M., Maraschin, M., De Mendonça, M. M., Zucco, C., Ferreira, A. G., & Tavares, L. A. (2005). Structural Characterization of β -glucans of *Agaricus*

- brasiliensis in Different Stages of Fruiting Body Maturity and their Use in Nutraceutical Products. *Biotechnology Letters*, 27(17), 1295-1299.
- Chakraborty, I., Mondal, S., Rout, D., & Islam, S. S. (2006). A water-insoluble (1→3)-β-d-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydrate Research*, 341(18), 2990-2993.
- Chen, S., Ho, K., Hsieh, Y., Wang, L., & Mau, J. (2012). Contents of lovastatin, γ-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT*, 47(2), 274-278.
- Chen, Y., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C., & Xie, M. (2014). Acetylation and carboxymethylation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food Chemistry*, 156, 279-288.
- Cheung, L., Cheung, P. C., & Ooi, V. E. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249-255.
- Choi, H., Cho, H., Yang, H., Ra, K., & Suh, H. (2001). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Research International*, 34(2-3), 177-182.
- Christakopoulos, P., Tzia, C., Kekos, D., & Macris, B. (1992). Production and characterization of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(2).
- CLSI (2005). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 15th informational supplement. CLSI document M100-S15PA, USA: Wayne.
- Coetzee, J., & van Wyk, A. (2009). The genus *Calvatia* ("Gasteromycetes", Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential. *African Journal Of Biotechnology*, 8(22), 6007-6015.

- Dalonso, N., Goldman, G. H., & Gern, R. M. (2015). β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(19), 7893-7906.
- Das, D., Mondal, S., Roy, S. K., Maiti, D., Bhunia, B., Maiti, T. K., ... Islam, S. S. (2010). A (1 \rightarrow 6)- β -glucan from a somatic hybrid of *Pleurotus florida* and *Volvariella volvacea*: isolation, characterization, and study of immunoenhancing properties. *Carbohydrate Research*, 345(7), 974-978.
- De Pauw, B. E. (2011). What Are Fungal Infections? *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 3(1).
- Demoliner, F., De Britto Policarpi, P., Vasconcelos, L. F., Vitali, L., Micke, G. A., & Block, J. M. (2018). Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess) and its by-products: A promising and underutilized source of bioactive compounds. Part II: Phenolic compounds profile. *Food Research International*. 112, 434-442.
- Demoulin, V. (1968). Gasteromycetes de Belgique: Sclerodermatales, Tulostomatales, Lycoperdales. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique / Bulletin van de National Plantentuin van België*, 38(1), 1-101.
- Demoulin, V., & Rebriev, Y. (2017). On *Calvatiella*, *Bovistella*, and the Taxonomic Position of *Calvatia utriformis* (*Lycoperdon utriforme*, *Handkea utriformis*). *Lejeunia*, 197, 1-12.
- Deng, Z., Sun, L., Ji, M., & Yuan, Y. (2007). Steroids from *Bovistella radicata* (Mont.) Pat. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(10), 700-703.

- Dey, A., & De, J. N. (2015). Neuroprotective therapeutics from botanicals and phytochemicals against Huntington's disease and related neurodegenerative disorders. *Journal of Herbal Medicine*, 5(1), 1-19.
- Dijkstra, F. Y. (1976). Studies on mushroom flavours 3. Some flavour compounds in fresh, canned and dried edible mushrooms. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 160(4), 401-405.
- Dong, Q., Yao, J., Yang, X., & Fang, J. (2002). Structural characterization of a water-soluble β -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research*, 337(15), 1417-1421.
- Du Souich, P., Roederer, G., & Dufour, R. (2017). Myotoxicity of statins: Mechanism of action. *Pharmacology & Therapeutics*, 175, 1-16.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356.
- Dulger, B. (2005). Antimicrobial activity of ten Lycoperdaceae. *Fitoterapia*, 76(3-4), 352-354.
- Elsayed, E. A., El Enshasy, H., Wadaan, M. A., & Aziz, R. (2014). Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediators of Inflammation*, 2014, 1-15.
- Eroğlu, C. S., Seçme, M., Atmaca, P., Kaygusuz, O., Gezer, K., Bağcı, G., & Dodurga, Y. (2016). Extract of *Calvatia gigantea* inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells. *Cytotechnology*, 68(5), 2075-2081.

- Fadaeinasab, M., Hadi, A., Kia, Y., Basiri, A., & Murugaiyah, V. (2013). Cholinesterase Enzymes Inhibitors from the Leaves of *Rauvolfia reflexa* and Their Molecular Docking Study. *Molecules*, *18*(4), 3779-3788.
- Feizizadeh, S., Salehi-Abargouei, A., & Akbari, V. (2014). Efficacy and Safety of *Saccharomyces boulardii* for Acute Diarrhea. *Pediatrics*, *134*(1), 176-191.
- Fugmann, B., Arnold, S., Steglich, W., Fleischhauer, J., Repges, C., Koslowski, A., & Raabe, G. (2001). Pigments from the Puffball *Calvatia rubro-flava* – Isolation, Structural Elucidation and Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, *2001*(16), 3097.
- Froufe, H. J., Abreu, R. M., & Ferreira, I. C. (2011). QCAR models to predict wild mushrooms radical scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *109*(2), 192-196.
- Gadd, G. M., & Gadd, G. M. (2001). *Fungi in Bioremediation*. Cambridge, England: Cambridge University Press.
- Gadoni, E., Gabriel, L., Olivero, A., Bocca, C., & Miglietta, A. (1995). Antimicrotubular effect of calvatic acid and of some related compounds. *Cell Biochemistry and Function*, *13*(4), 231-238.
- Gadoni, E., Miglietta, A., Olivero, A., & Gabriel, L. (1989). Phenylazoxycyanide damages microtubular protein more than its reference antibiotic, calvatic acid. *Biochemical Pharmacology*, *38*(7), 1121-1124.
- Galiotou-Panayotou, M., & Macris, B. J. (1986). Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *23*(6), 502-506.

- Galiotou-Panayotou, M., Rodis, P., Macris, B., & Stathakos, D. (1988). Purification of a novel enzyme involved in catechin degradation by *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 28(6).
- Gao, J., Wang, L. W., Zheng, H. C., Damirin, A., & Ma, C. M. (2015). Cytotoxic constituents of *Lasiosphaera fenzlii* on different cell lines and the synergistic effects with paclitaxel. *Natural Product Research*, 30(16), 1862-1865.
- Gasco, A., Serafino, A., Mortarini, V., Menziani, E., Bianco, M., & Ceruti Scurti, J. (1974). An antibacterial and antifungal compound from *Calvatia lilacina*. *Tetrahedron Letters*, 15(38), 3431-3432.
- Ge, Q., Zhang, A., & Sun, P. (2010). Isolation, Purification and Structural Characterization of a Novel Water-Soluble Glucan from the Fruiting Bodies of *Phellinus Baumii* Pilát. *Journal of Food Biochemistry*, 34(6), 1205-1215.
- Gill, M. (2004). Pigments of Fungi (Macromycetes). *ChemInform*, 35(11).
- Gil-Ramírez, A., Clavijo, C., Palanisamy, M., Ruiz-Rodríguez, A., Navarro-Rubio, M., Pérez, M., ... Soler-Rivas, C. (2013). Screening of edible mushrooms and extraction by pressurized water (PWE) of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitors. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 244-250.
- Goud, J. V., Bindu, N. S., Samatha, B., Prasad, M. R., & Charya, M. A. (2011). Lignolytic enzyme activities of wood decaying fungi from Andhra Pradesh. *Journal of the Indian Academy of Wood Science*, 8(1), 26-31.

- Goud, M., Suryam, A., Lakshmipathi, V., & Charya, M. (2009). Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basidiomycetes. *African Journal of Biotechnology*, 8(3), 354-360.
- Grangeia, C., Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*, 44(4), 1029-1035.
- Gray, A. C., Kremp, G., Naisby, T. W., Petry, T., Simon, W., Wilkin, J., & Wood, W. W. (2001). Calvatic Acid and Its Analogues as Agricultural Fungicides. *ACS Symposium Series*, 292-302.
- Grover, A., & Joshi, A. (2014). An Overview of Chronic Disease Models: A Systematic Literature Review. *Global Journal of Health Science*, 7(2), 210-227
- Gubański, M., & Saniewski, M. (1967). Próby izolowania i indentyfikacji inhibitora wirusa mozaiki tytoniowej (WMT) z niektórych gatunków purchawek (*Lycoperdon*) [Attempts at isolation and identification of TMV inhibitor from some species of *Lycoperdon*]. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 36(3), 441-448.
- Gulati, K., Gutathakurta, S., Joshi, J., Rai, N., & Ray, A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunology*, 4(2).
- Han, C., Yuan, J., Wang, Y., & Li, L. (2006). Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(3), 191-196.

- Harish Prashanth, K., & Tharanathan, R. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(3), 117-131.
- Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B., & Stone, B. A. (1984). An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *127*(1), 59-73.
- Hasnat, M., Pervin, M., & Lim, B. (2013). Acetylcholinesterase Inhibition and *in vitro* and *in Vivo* Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Grown on Germinated Brown Rice. *Molecules*, *18*(6), 6663-6678.
- Hassoun, A., Linden, P. K., & Friedman, B. (2017). Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Critical Care*, *21*(1).
- He, P., Zhang, A., Zhou, S., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Sun, P. (2016). Structural elucidation of polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from fruiting bodies of *Pleurotus citrinopileatus*. *Carbohydrate Research*, *434*, 72-76.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *119*(4), 1443-1450.
- Heleno, S. A., Prieto, M., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of ergosterol from *Agaricus bisporus* L. by-products using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, *100*, 25-35.

- Hobson, R. (2014). Vitamin E and wound healing: an evidence-based review. *International Wound Journal*, 13(3), 331-335.
- Horner, W. E., Helbling, A., Salvaggio, J. E., & Lehrer, S. B. (1995). Fungal allergens. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2), 161-179.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437-456.
- Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A., & Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 181-189.
- Iwase, K. (1997). XIII. Cultivation of mycorrhizal mushrooms. *Food Reviews International*, 13(3), 431-442.
- Jach, M. E., & Serefko, A. (2018). Nutritional Yeast Biomass: Characterization and Application. *Diet, Microbiome and Health*, 237-270.
- Jameel, G. H., & Al-Ezzy, A. I. (2017). Evaluation of Antifungal Activity of *Calvatia craniiformis* and Ivermectin as Novel Alternative Therapies for *Aspergillus niger* Associated Acute Otitis Media with Special Refer to Socio Demographic Factors Among Rural Children of Diyala Province-Iraq. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(08).
- Jarić, S., Mitrović, M., Djurdjević, L., Kostić, O., Gajić, G., Pavlović, D., & Pavlović, P. (2011). Phytotherapy in medieval Serbian medicine according to the

- pharmacological manuscripts of the Chilandar Medical Codex (15–16th centuries). *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 601-619.
- Jasinghe, V. J., & Perera, C. O. (2005). Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D₂ by UV irradiation. *Food Chemistry*, 92(3), 541-546.
- Jayachandran, M., Xiao, J., & Xu, B. (2017). A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1934.
- Jin, Y., Zhang, L., Chen, L., Chen, Y., Keung Cheung, P. C., & Chen, L. (2003). Effect of culture media on the chemical and physical characteristics of polysaccharides isolated from *Poria cocos* mycelia. *Carbohydrate Research*, 338(14), 1507-1515.
- Jo, W., Hossain, M. A., & Park, S. (2014). Toxicological Profiles of Poisonous, Edible, and Medicinal Mushrooms. *Mycobiology*, 42(3), 215-220.
- Jonathan, S., & Fasidi, I. (2010). Antimicrobial activities of two Nigerian edible macrofungi-*Lycoperdon pusillum*(Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.)). *African Journal of Biomedical Research*, 6(2).
- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(1), 23-28.
- Kakutani, R., Adachi, Y., Kajiura, H., Takata, H., Kuriki, T., & Ohno, N. (2012). The effect of orally administered glycogen on anti-tumor activity and natural killer cell activity in mice. *International Immunopharmacology*, 12(1), 80-87.

- Kalač, P. (2010). Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: A review for the period 2000–2009. *Food Chemistry*, *122*(1), 2-15.
- Kalač, P. (2012). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(2), 209-218.
- Kalač, P. (2016). *Edible Mushrooms: Chemical Composition and Nutritional Value*. Cambridge, MA: Academic Press.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, *113*(1), 9-16.
- Kamo, T., Kashiwabara, M., Tanaka, K., Ando, S., Shibata, H., & Hirota, M. (2006). Plant growth inhibitory activity of azo- and azoxyformamides from *Calvatia craniiformis* and *Lycoperdon hiemale*. *Natural Product Research*, *20*(5), 507-510.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, *56*(2).
- Kaur, R., Dhakad, M. S., Goyal, R., Bhalla, P., & Dewan, R. (2016). Spectrum of Opportunistic Fungal Infections in HIV/AIDS Patients in Tertiary Care Hospital in India. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, *2016*, 1-7.
- Kawagishi, H., Inagaki, R., Kanao, T., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., ... Nakamura, T. (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-in-soluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Research*, *186*(2), 267-273.

- Kawagishi, H., Kanao, T., Inagaki, R., Mizuno, T., Shimura, K., Ito, H., ... Nakamura, T. (1990). Formolysis of a potent antitumor (1 → 6)-β-d-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydrate Polymers*, *12*(4), 393-403.
- Kawahara, N., Sekita, S., & Satake, M. (1993). A Novel Dimeric Steroid, Calvasterone from the Fungus *Calvatia cyathiformis*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, *41*(7), 1318-1320.
- Kawahara, N., Sekita, S., & Satake, M. (1994). Steroids from *Calvatia cyathiformis*. *Phytochemistry*, *37*(1), 213-215.
- Kawahara, N., Sekita, S., & Satake, M. (1995). Two steroids from *Calvatia cyathiformis*. *Phytochemistry*, *38*(4), 947-950.
- Kekos, D., Galiotou-Panayotou, M., & Macris, B. J. (1987). Some nutritional factors affecting α-amylase production by *Calvatia gigantea*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *26*(6), 527-530.
- Kim, B. K., Kwun, J. Y., Park, Y. I., Bok, J. W., & Choi, E. C. (1992). Antitumor components of the cultured mycelia of *Calvatia craniformis*. *Journal of Korean Cancer Research Association*, *24*, 1-18.
- Kivrak, I., Kivrak, S., & Harmandar, M. (2016). Bioactive Compounds, Chemical Composition, and Medicinal Value of the Giant Puffball, *Calvatia gigantea* (Higher Basidiomycetes), from Turkey. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *18*(2), 97-107.

- Kivrak, I., Kivrak, Ş., & Harmandar, M. (2014). Free amino acid profiling in the giant puffball mushroom (*Calvatia gigantea*) using UPLC–MS/MS. *Food Chemistry*, *158*, 88-92.
- 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.
- Kocak, M., Uren, M., Calapoglu, M., Tepe, A. S., Mocan, A., Rengasamy, K., & Sarikurkcu, C. (2017). Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Stachys annua* subsp. *annua* var. *annua*. *South African Journal of Botany*, *113*, 128-132.
- Kojima, H., Akaki, J., Nakajima, S., Kamei, K., & Tamesada, M. (2009). Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *Journal of Natural Medicines*, *64*(1), 16-23.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., ... Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*, *20*(10), 19489-19525.
- Köpcke, B., Mayer, A., Anke, H., & Sterner, O. (1999). Bioactive Azo- and Azoxyformamides From *Lycoperdon pyriforme* (Schaeff. Ex Pers.)1. *Natural Product Letters*, *13*(1), 41-46.
- Köppel, C. (1993). Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. *Toxicon*, *31*(12), 1513-1540.

- Krupodorova, T., Rybalko, S., & Barshteyn, V. (2014). Antiviral activity of Basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture. *Virologica Sinica*, 29(5), 284-290.
- Kubicek, C. P. (2013). Chapter 2. In *The actors: Plant biomass degradation by fungi*, In: *Fungi and Lignocellulosic Biomass* (pp. 29-44). Iowa, USA: John Wiley and sons, Inc.
- Kulshreshtha, A., & Piplani, P. (2016). Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 37(9), 1403-1435.
- Kumar, A., Pintus, F., Di Petrillo, A., Medda, R., Caria, P., Matos, M. J., ... Fais, A. (2018). Novel 2-phenylbenzofuran derivatives as selective butyrylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 8(1).
- Kuo, C., Hsieh, C., & Lin, W. (2011). Proteomic response of LAP-activated RAW 264.7 macrophages to the anti-inflammatory property of fungal ergosterol. *Food Chemistry*, 126(1), 207-212.
- Lam, Y., Ng, T., & Wang, H. (2001). Antiproliferative and Antimitogenic Activities in a Peptide from Puffball Mushroom *Calvatia caelata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(3), 744-749.
- Larsson, E., & Jeppson, M. (2008). Phylogenetic relationships among species and genera of Lycoperdaceae based on ITS and LSU sequence data from north European taxa. *Mycological Research*, 112(1), 4-22.

- Lee, S., Lee, D., Lee, J. C., Kang, K. S., Ryoo, R., Park, H., & Kim, K. H. (2018). Bioactivity-Guided Isolation of Anti-Inflammatory Constituents of the Rare Mushroom *Calvatia nipponica* in LPS-Stimulated RAW264.7 Macrophages. *Chemistry & Biodiversity*, 15(9), e1800203.
- Lee, S., Park, J. Y., Lee, D., Seok, S., Kwon, Y. J., Jang, T. S., ... Kim, K. H. (2017). Chemical constituents from the rare mushroom *Calvatia nipponica* inhibit the promotion of angiogenesis in HUVECs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(17), 4122-4127.
- León-González, A. J., Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2015). Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 98(3), 371-380.
- Li, Y., & Shetlar, M. (1964). Occurrence of α -galactosidase in higher fungi: Isolation of α -galactosidase from *Calvatia cyathiformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 108(3), 523-530.
- Lim, H., & Choi, H. T. (2009). Enhanced expression of chitinase during the autolysis of mushroom in *Coprinellus congregatus*. *The Journal of Microbiology*, 47(2), 225-228.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H., & Jülich, W. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285-299.
- Lisec, B., Radež, I., & Žilnik, L. F. (2012). Solvent extraction of lovastatin from a fermentation broth. *Separation and Purification Technology*, 96, 187-193.

- Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., ... White, W. (2004). Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 486(1), 9-17.
- Liu, Y., Sun, J., Rao, S., Su, Y., & Yang, Y. (2013). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 39-45.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, A. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lukša, J., Podolankaitė, M., Vepškaitė, I., Strazdaitė-Žielienė, Ž., Urbonavičius, J., & Servienė, E. (2015). Yeast β -1,6-Glucan Is a Primary Target for *the Saccharomyces cerevisiae* K2 Toxin. *Eukaryotic Cell*, 14(4), 406-414.
- Læssøe, T., & Spooner, B. (1994). The uses of 'Gasteromycetes'. *Mycologist*, 8(4), 154-159.
- Lü, W., Gao, Y., Su, M., Luo, Z., Zhang, W., Shi, G., & Zhao, Q. (2013). Isoindolones from *Lasiosphaera fenzlii* Reich. and Their Bioactivities. *Helvetica Chimica Acta*, 96(1), 109-113.
- Maity, K. K., Patra, S., Dey, B., Bhunia, S. K., Mandal, S., Bahera, B., ... Islam, S. S. (2013). A β -glucan from the alkaline extract of a somatic hybrid (PfloVv5FB) of *Pleurotus florida* and *Volvariella volvacea*: structural characterization and study of immunoactivation. *Carbohydrate Research*, 370, 13-18.

- Man-Fan Wan, J. (2013). Polysaccharide Krestin (PSK) and Polysaccharopeptide PSP. *Handbook of Biologically Active Peptides*, 180-184.
- Masuda, Y., Nakayama, Y., Tanaka, A., Naito, K., & Konishi, M. (2017). Antitumor activity of orally administered maitake α -glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. *PLOS ONE*, *12*(3), e0173621.
- Matsui, K., Kodama, N., & Nanba, H. (2001). Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer Letters*, *172*(2), 193-198.
- Mehta, A., Zitzmann, N., Rudd, P. M., Block, T. M., & Dwek, R. A. (1998). α -Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters*, *430*(1-2), 17-22.
- Meng, J., Fan, Y., Su, M., Chen, C., Ren, T., Wang, J., & Zhao, Q. (2014). WLIP derived from *Lasiosphaera fenzlii* Reich exhibits anti-tumor activity and induces cell cycle arrest through PPAR- γ associated pathways. *International Immunopharmacology*, *19*(1), 37-44.
- Meng, X., Liang, H., & Luo, L. (2016). Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, *424*, 30-41.
- Min Chang, T. (2012). Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors. *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*, *01*(02).
- Miyake, M., Yamamoto, S., Sano, O., Fujii, M., Kohno, K., Ushio, S., ... Fukuda, S. (2010). Inhibitory Effects of 2-Amino-3H-phenoxazin-3-one on the Melanogenesis

- of Murine B16 Melanoma Cell Line. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(4), 753-758.
- Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K., & Tsuchida, H. (1998). Polysaccharides from *Agaricus blazei* Stimulate Lymphocyte T-Cell Subsets in Mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(3), 434-437.
- Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., ... Asakura, A. (1990). Antitumor Activity and Some Properties of Water-insoluble Heteroglycans from "Himematsutake," the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(11), 2897-2905.
- Moradali, M., Mostafavi, H., Ghods, S., & Hedjaroude, G. (2007). Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology*, 7(6), 701-724.
- Mouafi, F. E., Ibrahim, G. S., & Abo Elsoud, M. M. (2016). Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(2), 253-259.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., & Foster, M. S. (Eds.). (2011). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Muramatsu, Y., Yoshida, S., & Sumiya, M. (1991). Concentrations of radiocesium and potassium in basidiomycetes collected in Japan. *The Science of The Total Environment*, 105, 29-39.

- Nanba, H., Hamaguchi, A., & Kuroda, H. (1987). The Chemical Structure of an Antitumor Polysaccharide in Fruit Bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35(3), 1162-1168.
- Nedelcheva, D., Antonova, D., Tsvetkova, S., Marekov, I., Momchilova, S., Nikolova-Damyanova, B., & Gyosheva, M. (2007). TLC and GC-MS Probes into the Fatty Acid Composition of some Lycoperdaceae Mushrooms. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(18), 2717-2727.
- Needs, P., & Selvendran, R. (1993). Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate Research*, 245(1), 1-10.
- Ng, T. (1998). A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology: The Vascular System*, 30(1), 1-4.
- Ng, T. B., Lam, Y. W., & Wang, H. (2003). Calcaelin, a New Protein with Translation-Inhibiting, Antiproliferative and Antimitogenic Activities from the Mosaic Puffball Mushroom *Calvatia caelata*. *Planta Medica*, 69(3), 212-217.
- Nitschke, J., Altenbach, H., Malolepszy, T., & Mölleken, H. (2011). A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. *Carbohydrate Research*, 346(11), 1307-1310.

- Novak, M., & Vetvicka, V. (2008). β -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology*, 5(1), 47-57.
- Ogawa, K., Yamaura, M., & Maruyama, I. (1994). Isolation and Identification of 3-O-Methyl-D-galactose as a Constituent of Neutral Polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5), 942-944.
- Ohno, N., Hayashi, M., Iino, K., Suzuki, I., Oikawa, S., Sato, K., ... Yadomae, T. (1986). Effect of glucans on the antitumor activity of grifolan. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34(5), 2149-2154.
- Ohtake, S., & Wang, Y. J. (2011). Trehalose: Current Use and Future Applications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(6), 2020-2053.
- Oliveira, G. K., Silva, E. V., Ruthes, A. C., Lião, L. M., Iacomini, M., & Carbonero, E. R. (2018). Chemical structure of a partially 3-O-methylated mannofucogalactan from edible mushroom *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers*, 187, 110-117.
- Oliveira, K. S., Di Bastiani, M., Cordeiro, L. M., Costa, M. F., Toledo, K. A., Iacomini, M., ... Nascimento, V. M. (2015). (1 \rightarrow 6)- and (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -glucans from *Lasiodiplodia theobromae* MMBJ: Structural characterization and pro-inflammatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 133, 539-546.
- Ortonne, J., & Bissett, D. L. (2008). Latest Insights into Skin Hyperpigmentation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 13(1), 10-14.
- Padmavathi, M. (2013). Chronic Disease Management with Nutraceuticals. *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 2(4), 1-11.

- Park, K. M., Kwon, K. M., & Lee, S. H. (2015). Evaluation of the Antioxidant Activities and Tyrosinase Inhibitory Property from Mycelium Culture Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-7.
- Paun, G., Neagu, E., Albu, C., & Radu, G. L. (2016). *Verbascum phlomoides* and *Solidago virgaureae* herbs as natural source for preventing neurodegenerative diseases. *Journal of Herbal Medicine*, 6(4), 180-186.
- Pedrali, A., Bleve, M., Capra, P., Jonsson, T., Massolini, G., Perugini, P., & Marrubini, G. (2015). Determination of N-acetylglucosamine in cosmetic formulations and skin test samples by hydrophilic interaction liquid chromatography and UV detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107, 125-130.
- Pereira, L. M., Hatanaka, E., Martins, E. F., Oliveira, F., Liberti, E. A., Farsky, S. H., ... Pithon-Curi, T. C. (2008). Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 26(2), 197-204.
- Popović-Djordjević, J. B., Jevtić, I. I., Grozdanić, N. D., Šegan, S. B., Zlatović, M. V., Ivanović, M. D., & Stanojković, T. P. (2017). α -Glucosidase inhibitory activity and cytotoxic effects of some cyclic urea and carbamate derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 298-303.
- Popper, Z. A., Sadler, I. H., & Fry, S. C. (2001). 3-O-Methyl-d-galactose residues in lycophyte primary cell walls. *Phytochemistry*, 57(5), 711-719.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

- Rhugenda-Banga, N., Welter, A., Jadot, J., & Casimir, J. (1979). Un nouvel acide amine isole de *Lycoperdon perlatum*. *Phytochemistry*, *18*(3), 482-484.
- Rosado, F. (2002). A partially 3-O-methylated (1→4)-linked α -Dgalactan and α -D-mannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *FEMS Microbiology Letters*, *212*(2), 261-265.
- Rosado, F. R., Carbonero, E. R., Claudino, R. F., Tischer, C. A., Kimmelmeier, C., & Iacomini, M. (2003). The presence of partially 3-O-methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. *FEMS Microbiology Letters*, *221*(1), 119-124.
- Rowan, N. J., & Smith, J. E. (2002). *Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. Cancer Research Institute UK, University of Strathclyde.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., & Iacomini, M. (2015). β -D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, *117*, 753-761.
- Saini, R. K., & Keum, Y. (2016). Tocopherols and tocotrienols in plants and their products: A review on methods of extraction, chromatographic separation, and detection. *Food Research International*, *82*, 59-70.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., & Jabbar, A. (2010). Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Nat. Prod. Rep*, *27*(2), 238-254.

- Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., Magalhães, P. O., & Silveira, D. (2012). α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 141.
- Samuelsen, A. B., Rise, F., Wilkins, A. L., Teveleva, L., Nyman, A. A., & Aachmann, F. L. (2019). The edible mushroom *Albatrellus ovinus* contains a α -l-fuco- α -d-galactan, α -d-glucan, a branched (1 \rightarrow 6)- β -d-glucan and a branched (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan. *Carbohydrate Research*, 471, 28-38.
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2017). Bioactive Products from Fungi. *Food Bioactives*, 59-87.
- Sapan, C., Lundblad, R., & Price, N. (1999). Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 99–108.
- Sawangwan, T., Wansanit, W., Pattani, L., & Noysang, C. (2018). Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. *Agriculture and Natural Resources*, 52(6), 519-524.
- Schneider, W. J., & Roehr, M. (1976). Purification and properties of penicillin acylase of *Bovista plumbea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 452(1), 177-185.
- Schüffler, A. (2018). Secondary Metabolites of Basidiomycetes. *Physiology and Genetics*, 231-275.
- Schüffler, A., & Anke, T. (2009). Secondary Metabolites of Basidiomycetes. *Physiology and Genetics*, 209-231.

- Seenivasan, A., Venkatesan, S., & Panda, T. (2018). Cellular Localization and Production of Lovastatin from *Monascus purpureus*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 80(01).
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Shen, B. (2015). A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell*, 163(6), 1297-1300.
- Silva, J. R., Burger, B., Kühn, C. M., Candreva, T., Dos Anjos, M. B., & Rodrigues, H. G. (2018). Wound Healing and Omega-6 Fatty Acids: From Inflammation to Repair. *Mediators of Inflammation*, 2018, 1-17.
- Singh, P., Singh, A., D'Souza, L., Roy, U., & Singh, S. (2012). Chemical constituents and antioxidant activity of the Arctic mushroom *Lycoperdon molle* Pers. *Polar Research*, 31(1), 17329.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2017). Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*, 101, 1-16.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54.

- Smiderle, F. R., Sasaki, G. L., Arkel, J. V., Iacomini, M., Wichers, H. J., & Griensven, L. J. (2010). High Molecular Weight Glucan of the Culinary Medicinal Mushroom *Agaricus bisporus* is an α -Glucan that Forms Complexes with Low Molecular Weight Galactan. *Molecules*, *15*(8), 5818-5830.
- Sorba, G., Bertinaria, M., Di Stilo, A., Gasco, A., Scaltrito, M. M., Brenciaglia, M. I., & Dubini, F. (2001). Anti- *Helicobacter pylori* agents endowed with H₂ -antagonist properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *11*(3), 403-406.
- Spooner, B., & Læssøe, T. (1994). The folklore of 'gasteromycetes'. *Mycologist*, *8*(3), 119-123.
- Stoppok, E., Schömer, U., Segner, A., Mayer, H., & Wagner, F. (1981). Production of 6-aminopenicilleanic acid from penicillin V and G by *Bovista plumbea* NRRL 3824 and *Escherichia coli* 5K (pHM 12). *Fermentation Products*, 547-552.
- Strand, R. D., Neuhauser, E. B., & Sornberger, C. F. (1967). Lycoperdonosis. *New England Journal of Medicine*, *277*(2), 89-91.
- Struyf, N., Van der Maelen, E., Hemdane, S., Verspreet, J., Verstrepen, K. J., & Courtin, C. M. (2017). Bread Dough and Baker's Yeast: An Uplifting Synergy. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(5), 850-867.
- Stüssi, H., & Rast, D. M. (1981). The biosynthesis and possible function of γ -glutaminy-4-hydroxybenzene in *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, *20*(10), 2347-2352.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Cabello, M. A., Díez, M. T., ... Vicente, M. F. (2000). Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, *78*, 129-139.

- Synytsya, A., & Novak, M. (2014). Structural Analysis of Glucans. *Annals of Translational Medicine*, 2(2), 17.
- Synytsya, A., & Novák, M. (2013). Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 792-809.
- Szwajgier, D., & Borowiec, K. (2012). Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(1), 40-48.
- Szwengiel, A., & Stachowiak, B. (2016). Deproteinization of water-soluble β -glucan during acid extraction from fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate Polymers*, 146, 310-319.
- Takaishi, Y., Murakami, Y., Uda, M., Ohashi, T., Hamamura, N., Kidota, M., & Kadota, S. (1997). Hydroxyphenylazoformamide derivatives from *Calvatia craniformis*. *Phytochemistry*, 45(5), 997-1001.
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2016). Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics - A review. *Industrial Crops and Products*, 90, 38-48.
- Tepliyakova, T. V., Psurtseva, N. V., Kosogova, T. A., Mazurkova, N. A., Khanin, V. A., & Vlasenko, V. A. (2012). Antiviral Activity of Polyporoid Mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14(1), 37-45.
- Terashima, Y., Ogiwara, K., Seki, A., Kojima, M., Kubo, C., & Fujiie, A. (2002). Primers based on specific ITS sequences of rDNAs for PCR detection of two fairy ring

- fungi of turfgrass, *Vascellum pratense* and *Lycoperdon pusillum*. *Mycoscience*, *43*(3), 261-265.
- Turkekul, I., Elmastas, M., & Tüzen, M. (2004). Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry*, *84*(3), 389-392.
- Umezawa, H., Takeuchi, T., Iinuma, H., Ito, M., Ishizuka, M., Kurakata, Y., ... Tanabe, O. (1975). A new antibiotic, calvatic acid. *The Journal of Antibiotics*, *28*(1), 87-90.
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Morais, J. S., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(1), 343-346.
- Vellinga, E. C. (2004). Genera in the family Agaricaceae: evidence from nrITS and nrLSU sequences. *Mycological Research*, *108*(4), 354-377.
- Vinogradov, E., & Wasser, S. P. (2005). The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes). *Carbohydrate Research*, *340*(18), 2821-2825.
- Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Petrovic, P., Zizak, Z., Niksic, M., & Van Griensven, L. J. (2015). Did the Iceman Know Better? Screening of the Medicinal Properties of the Birch Polypore Medicinal Mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *17*(12), 1113-1125.
- Vuong, Q. V., Hirun, S., Roach, P. D., Bowyer, M. C., Phillips, P. A., & Scarlett, C. J. (2013). Effect of extraction conditions on total phenolic compounds and

- antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 3(3), 104-111.
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30.
- Wasser, S. P. (2010). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1323-1332.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 258-274.
- Wasser, S. P. (2017). Medicinal Properties and Clinical Effects of Medicinal Mushrooms. *Edible and Medicinal Mushrooms*, 503-540.
- 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), 31-62.
- Weijn, A., Van den Berg-Somhorst, D. B., Slootweg, J. C., Vincken, J., Gruppen, H., Wichers, H. J., & Mes, J. J. (2013). Main Phenolic Compounds of the Melanin Biosynthesis Pathway in Bruising-Tolerant and Bruising-Sensitive Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8224-8231.
- Wiemken, A. Q. (1990). Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek*, 58(3), 209-217.

- Xiao, C., Wu, Q., Tan, J., Cai, W., Yang, X., & Zhang, J. (2011). Inhibitory effects on α -glucosidase and hypoglycemic effects of the crude polysaccharides isolated from 11 edible fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(32), 6963-6967.
- Yang, Y., Zhang, J., Liu, Y., Tang, Q., Zhao, Z., & Xia, W. (2007). Structural elucidation of a 3-O-methyl-d-galactose-containing neutral polysaccharide from the fruiting bodies of *Phellinus igniarius*. *Carbohydrate Research*, 342(8), 1063-1070.
- Ye, Y., Liu, K., Zeng, Q., & Zeng, Q. (2017). Antimicrobial activity of puffball (*Bovistella radicata*) and separation of bioactive compounds. *AMB Express*, 7(1).
- Yeh, C., Yang, S., & Chen, C. (2011). *Calvatia lilacina* protein extract induces apoptosis through endoplasmic reticulum stress in human colon carcinoma cells. *Process Biochemistry*, 46(8), 1599-1606.
- Yokokawa, H. (1992). Fatty Acid and Sterol Compositions of Fruit Bodies in Thirty Nine Species of Higher Fungi in Switzerland. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 41(12), 1215-1219.
- Yoshida, S., Muramatsu, Y., & Ogawa, M. (1994). Radiocesium concentrations in mushrooms collected in Japan. *Journal of Environmental Radioactivity*, 22(2), 141-154.
- Yousefi, F., Mahjoub, S., Pouramir, M., & Khadir, F. (2013). Hypoglycemic activity of *Pyrus bioessieriana* Buhse leaf extract and arbutin: Inhibitory effects on alpha amylase and alpha glucosidase. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 4(4), 763–767.

- Zaman, S. B., Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*.
- Zhang, A., Zhang, J., Tang, Q., Jia, W., Yang, Y., Liu, Y., ... Pan, Y. (2006). Structural elucidation of a novel fucogalactan that contains 3-O-methyl rhamnose isolated from the fruiting bodies of the fungus, *Hericium erinaceus*. *Carbohydrate Research*, 341(5), 645-649.
- Zengin, G., Uysal, S., Ceylan, R., & Aktumsek, A. (2015). Phenolic constituent, antioxidative and tyrosinase inhibitory activity of *Ornithogalum narbonense* L. from Turkey: A phytochemical study. *Industrial Crops and Products*, 70, 1-6
- Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2016). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, 52, 275-288.
- Zied, D. C., & Pardo-Giménez, A. (2017). *Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2011). The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.

Sadržaj slika

Slika 1.1. Raznovrsnost β -glukana; linearni (1 \rightarrow 3)- α - (a), (1 \rightarrow 4)- α - (b), (1 \rightarrow 6)- α - (c) i (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- α - (d) D-glukani, razgranati (1 \rightarrow 4),(1 \rightarrow 6)- α -D-glukan (e), linearni (1 \rightarrow 3)- β - (f), (1 \rightarrow 6)- β - (g) i (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 4)- β - (h) glukani, razgranati (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)- β - (i) i (1 \rightarrow 6),(1 \rightarrow 3)- β - (j) D-glukani (Synytsya & Novák, 2013).....	12
Slika 1.2. Mehanizam imunomodulatorog dejstva β -glukana (Meng i saradnici, 2016).....	13
Slika 1.3. Filogenetsko stablo puhara i najbližih srodnika (Bates i saradnici, 2009).....	17
Slika 1.4. Morfologija plodonosnog tela puhara; A) Plodonosno telo; B) Spore; C) Kapilicijum; D) Poprečni presek plodonosnog tela; gl – gleba; su – subgleba; en – endoperidijum; ex – egzoperidijum; rh – rizomorf; os – osteola (Larsson & Jeppson, 2009).....	19
Slika 1.5. Životni ciklus puhara (<i>Handkea utriformis</i>); micelijum (1), mlado (2) i zrelo plodonosno telo (3). Foto: P. Petrović	20
Slika 1.6. <i>Handkea utriformis</i> ; odozgo nadole: mlado plodonosno telo, plodonosno telo u fazi autolize i zrelo, otvoreno plodonosno telo iz koga vetar raznosi spore. Foto: P. Petrović, 2013.....	22
Slika 1.7. <i>Handkea utriformis</i> , mlado (levo) i zrelo plodonosno telo (desno). Foto: P. Petrović, 2014.....	23
Slika 1.8. <i>Handkea excipuliformis</i> ; izdužena (gore) i kruškasta (dole) forma plodonosnih tela. Foto: P. Petrović, 2014.....	24
Slika 1.9. <i>Vascellum pratense</i> ; plodonosna tela. Foto: P. Petrović, 2014.....	25
Slika 1.10. Kalvatinska kiselina i njeni analozi (Blair & Sperry, 2013).....	38
Slika 3.1. Proizvodnja micelijuma <i>H. utriformis</i> ; uzgajanje na čvrstom (levo) i u tečnom medijumu (desno).....	46
Slika 3.2. Shema dobijanja deproteinizovanog polisaharidnog ekstrakta.....	49
Slika 4.1. ABTS antiradikalska aktivnost ekstrakata.....	80

Slika 4.2. Test inhibicije oksidativne degradacije β -karotena	81
Slika 4.3. CUPRAC antioksidativna analiza.....	82
Slika 4.4. Inhibicija tirozinaze.....	85
Slika 4.5. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE).....	87
Slika 4.6. Inhibicija butirilholinesteraze (BuChE).....	88
Slika 4.7. Inhibicija HMG-CoA-reduktaze.....	89
Slika 4.8. Inhibicija α -glukozidaze.....	91
Slika 4.9. Inhibicija α -amilaze.....	92
Slika 4.10. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na tumorske ćelijske linije.....	97
Slika 4.11. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na ćelije periferne krvi.....	99
Slika 4.12. Deproteinizovanih polisaharidni ekstrakti micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, sleva nadesno (gore) i odgovarajući vodeni rastvori (c=2 mg/mL)(dole).....	103
Slika 4.13. Gel-ekskluzioni hromatogram polisaharidnog ekstrakta micelijuma.....	104
Slika 4.14. Gel-ekskluzioni hromatogrami polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela.....	105
Slika 4.15. Gel-ekskluzioni hromatogrami polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela.....	106
Slika 4.16. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta micelijuma.....	109
Slika 4.17. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela.....	109
Slika 4.18. ^{13}C NMR spektar hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela..	110
Slika 4.19. GC-MS hromatogram alditol acetata, dobijenih derivatizacijom hidrolizata polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela; pikovi su redom pridruženi 3-O-metil	

galaktozi, manozi, glukozi i galaktozi, odnosno njihovim derivatima.....	111
Slika 4.20. Maseni spektar mono-metil alditol acetata, identifikovanog kao 3- <i>O</i> -metil galaktoza; poklapanje spektra sa sintetskim derivatom 3- <i>O</i> -metil galaktoze je skoro savršeno (Ogawa i saradnici, 1993).....	112
Slika 4.21. HPLC hromatogrami hidrolizovanih polisaharidnih ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, odozgo nadole; TFA - trifluoroacetna kiselina, GLU - glukoza, GAL+MAN - galaktoza+manoza, 3- <i>O</i> -Me-GAL - 3- <i>O</i> -metilgalaktoza.....	115
Slika 4.22. GC-MS hromatogrami parcijalno metilovanih alditol acetata dobijenih derivatizacijom ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela (odozgo nadole).....	119
Slika 4.23. HSQC NMR spektri polisaharidnih ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, redom, odozgo nadole.....	123
Slika 4.24. Anomerni regioni HSQC NMR spektara, redom, ekstrakta micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela.....	124
Slika 4.25. Regioni karakterističnih veza u HSQC NMR spektrima polisaharidnih ekstrakata micelijuma, mladih i zrelih plodonosnih tela, odozgo nadole, redom.....	125
Slika 4.26. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3).....	130
Slika 4.27. Pretpostavljene strukture polisaharida prisutnih u ekstraktima; 1 – (1→4),(1→6)- α -D-glukan, 2 –parcijalno metilovani (1→6)- α -D-galaktan, 3 – (1→6),(1→3)- β -D-glukan iz ekstrakta mladih plodonosnih tela, 4 - (1→6),(1→3)- β -D-glukan iz ekstrakta zrelih plodonosnih tela	131
Slika 4.28. Peptidni region FTIR spektara polisaharidnih ekstrakata različitog stepena prečišćavanja micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3).....	134
Slika 4.29. ATR-FTIR spektar vodonerastvornog ostatka hidrolizata polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela.....	139
Slika 4.30. Antiradikalska sposobnost polisaharidnih ekstrakata (ABTS).....	142

Slika 4.31. Sposobnost polisaharidnih ekstrkata da redukuju Cu^{2+} jone (CUPRAC).....	143
Slika 4.32. Test inhibicije oksidativne degradacije β -karotena.....	144
Slika 4.33. Uticaj ekstrkata na produkciju IL-1 β ; značajna razlika indikovana je */linijom	150
Slika 4.34. Uticaj ekstrkata na produkciju IL-6; značajna razlika indikovana je */linijom	151
Slika 4.35. Uticaj ekstrkata na produkciju TNF- α ; značajna razlika indikovana je */linijom	151
Slika 4.36. Uticaj ekstrkata na produkciju IL-27; značajna razlika indikovana je */linijom	152
Slika 4.37. Uticaj ekstrkata na produkciju IL-10; značajna razlika indikovana je */linijom	152
Slika 4.38. Raspodela veličina lipozoma po intenzitetu sa polisaharidnim ekstraktima micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3).....	157
Slika 4.39. Zeta potencijal lipozoma sa polisaharidnim ekstraktima micelijuma (1), mladih (2) i zrelih plodonosnih tela (3).....	158
Slika 4.40. Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom micelijuma; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3).....	160
Slika 4.41 Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom mladih plodonosnih tela; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3).....	161
Slika 4.42. Studija stabilnosti suspenzije lipozoma sa polisaharidnim ekstraktom zrelih plodonosnih tela; raspodele veličina po intenzitetu odmah nakon pripreme lipozoma (0) i nakon 3 meseca (3).....	161

Slika 4.43. Uporedna studija otpuštanja polisaharidnog ekstrakta micelijuma iz rastvora i iz lipozoma.....	162
Slika 4.44. Studija otpuštanja polisaharidnog ekstrakta mladih plodonosnih tela (1) i odgovarajućih lipozoma (2), urađena fenol-sumpornom metodom (levo) i direktnim merenjem apsorbance na 254 (desno).....	164
Slika 4.45. Studija otpuštanja aktivnih komponenti polisaharidnog ekstrakta zrelih plodonosnih tela, urađena fenol-sumpornom metodom (1) i direktnim merenjem apsorbance na 254 nm (2).....	165

Sadržaj tabela

Tabela 4.1. Prinosi metanolne ekstrakcije.....	69
Tabela 4.2. Sadržaj proteina i šećera u metanolnim ekstraktima	73
Tabela 4.3. Sadržaj nekih biološki aktivnih sekundarnih metabolita u metanolnim ekstraktima	75
Tabela 4.4. Sadržaj slobodnih masnih kiselina u ekstraktima (mg/g); C14 – miristinska, C15 – pentadekanska, C16:1 – palmitoleinska; C16 – palmitinska; C17:1 – cis-10-heptadecenksa, C17 – margarina; C18:2 – linoleinska, C18:1 – oleinska, C18:0 – stearinska; C20:1 – eikozenska, C20 – ekozanska; C22 – behenska, C23 – trikozanska, C24 – lignocerinska kiselina.....	77
Tabela 4.5. Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata	83
Tabela 4.6. Inhibitorna aktivnost ekstrakata na enzime, IC ₅₀ vrednosti (mg/mL).....	93
Tabela 4.7. Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata (mg/mL) i standardnih antibiotika (µg/mL); amoksicilin (AMX) korišćen je za bakterijske a flukonazol (FLU) za <i>C. albicans</i>	96
Tabela 4.8. Citotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata na zdrave i kancerske humane ćelije (mg/mL).....	100
Tabela 4.9. Prinosi polisaharidne ekstrakcije, DER ¹	103
Tabela 4.10. Šećerni sastav polisaharidnih ekstrakata <i>H. utrifomis</i>	116
Tabela 4.11. Parcijalno metilovani alditol acetati prisutni u uzorcima i njima pridružene veze, retencionna vremena i maseni fragmenti.....	118
Tabela 4.12. Približni izračunati molarni odnos glukoznih jedinica određenih tipova veze u glukanskoj frakciji uzoraka; vrednosti su dobijene deljenjem površine pikova molekulskom masom derivata; 2,3,4,6-Me ₄ -Glu – 2,3,4,6-tetrametil glucitol diacetat, 2,4,6-Me ₃ -Glu – 2,4,6-trimetil glucitol triacetat, 2,3,6-Me ₃ -Glu – 2,3,6-trimetil glucitol triacetat, 2,3,4-Me ₃ -	

Glu – 2,3,4 – trimetil glucitol triacetat, 2,4-Me ₃ -Glu – 2,4-dimetil glucitol tetraacetat, 2,6-Me ₃ -Glu – 2,6-dimetil glucitol tetraacetat.....	127
Tabela 4.13. Elementalni sastav polisaharidnih ekstrakata, isključujući kiseonik.....	137
Tabela 4.14. Peptidi/proteini i fenoli u polisaharidnim ekstraktima izračunati/procenjeni korišćenjem više metoda.....	138
Tabela 4.15. Antioksidativna aktivnost polisaharidnih ekstrakata.....	144
Tabela 4.16. Antimikrobna aktivnost polisaharidnih ekstrakata.....	146

Spisak skraćenica

2D, dvodimenzionalno

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina

ACE, eng. *angiotensin-converting enzyme* (angiotenzin-konvertujući enzim)

AChE, acetilholinesteraza

AChI, acetilholin jodid

ATR, eng. *attenuated total reflectance* (atenuirana totalna refleksija)

BSA, eng. *bovine serum albumin* (goveđi albumin)

BuChE, butirilholinesteraza

BuChI, butirilholin jodid

CBB R-250, eng. *Coomassie Brilliant Blue R-250*

CR3, eng. *Complement Receptor 3*

CUPRAC, eng. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* (kapacitet redukovanja bakarnih jona)

DAD, eng. *diode array detector*

DER, eng. *drug:extract ratio* (odnos droga:ekstrakt)

DMSO, dimetilsulfoksid

DMSO-d6, deuterisani dimetilsulfoksid

DNS, dinitrosalicilna kiselina

DTNB, 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

EC₅₀, eng. *effective concentration* (efektivna koncentracija koja pokazuje 50% aktivnosti)

ELISA, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*

FAME, eng. *fatty acid methyl-esters* (metil-estri masnih kiselina)

FBS, eng. *Fetal Bovine Serum* (fetalni goveđi serum)

FID, eng. *flame ionisation detector*

FTIR, eng. *Fourier-transform infrared spectroscopy* (infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom)

G+, gram pozitivan

G-, gram negativan

GAE, eng. *Gallic Acid Equivalents* (ekvivalenti galne kiseline)

GC-MS – eng. *gass chromatography with mass spectroscopy* (gasna hromatografija sa masenom spektroskopijom, gasno-masena hromatografija)

HeLa, eng. “*Henrietta Lacks*”, ćelijska linija raka grlića materice

HEPES, 2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il etansulfonska kiselina

HMG-CoA, eng. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A* (3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A)

HPLC, eng. *high performance liquid chromatography* (visoko-efikasna tečna hromatografija)

HPLC-MS, eng. *High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (tečna hromatografija sa masenom spektroskopijom)

HSQC, eng. *heteronuclear single quantum coherence*

IC₅₀, eng. *inhibitory concentration* (inhibitorna koncentracija koja pokazuje 50% aktivnosti)

IL-1 β , Interleukin 1 β

IL-6, Interleukin 6

IL-12, Interleukin 12

INF- γ , Interferon γ

L-DOPA, L-3,4-dihidroksifenilalanin

LC, eng. *liquid chromatography* (tečna hromatografija)

LD₅₀, letalna doza (za 50% subjekata)

LPS, lipopolisaharid

MBK, minimalna baktericidna koncentracija

MDA-MB, eng. "*M.D. Anderson - Metastasis Breast cancer*", ćelijska linija raka dojke

MFK, minimalna fungicidna koncentracija

MIK, minimalna inhibitorna koncentracija

MMK, minimalna mikrobicidna koncentracija

MS, masena spektroskopija

NLR, eng. *NOD Like Receptor* ("*Nucleotide-binding Oligomerization Domain-Like Receptors*")

NK ćelije, eng. *natural killer cells*, ćelije rođene ubice

NMR, nuklearna magnetna rezonanca

PBMC, eng. *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (mononuklearne ćelije periferne krvi)

PMA, eng. *Phorbol Myristate Acetate* (forbol miristat acetat)

PMAA, parcijalno metilovani alditol acetat

PSK, polisaharid K

PSP, polisaharopeptid

RI, refraktivni indeks

RLR, eng. *RIG-I-like receptor* ("*Retinoic acid-Inducible Gene-I-Like Receptors*")

RPMI-1640, eng. "*Roswell Park Memorial Institut*", tip medijuma koji se koristi u gajenju ćelijskih kultura

SAD – Sjedinjene američke države

TFA, eng. *trifluoroacetic acid* (trifluorosrćetna kiselina)

TLR, eng. *Toll Like Receptor*

TNF- α , Tumor-nekrozni faktor α

TTC, trifeniltetrazoliumhlorid

UV, eng *ultraviolet* (ultraljubičasto)

VEGF,eng. *Vascular Endothelial Growth Factor*, vaskularni endotelni faktor rasta

VIS, eng. *visible spectrum* (vidljivi deo spektra)

Biografija

Kandidat Predrag (Miodrag) Petrović, magistar farmacije, rođen je 14.1.1987. u Boru, Srbija. Osnovnu školu je završio u Boru, nakon čega je upisao gimnaziju „Bora Stanković“, takođe u Boru, u kojoj je maturirao 2006. godine. Iste godine upisao je Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, koji je završio 2011. godine, s prosečnom ocenom 9,53. Školske 2011/2012 godine upisao je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, na smeru Biohemijско inženjerstvo i biotehnologija, pod mentorstvom dr Branka Bugarskog, redovnog profesora. Na doktorskim studijama položio je sve ispite predviđene planom i programom, uključujući i završni ispit pod nazivom “Ispitivanje antibakterijske i antitumorske aktivnosti plodonosnih tela gljiva *Handkea utrififormis*, *Calvatia excipuliformis* i *Vascellum pratense*”, s prosečnom ocenom 9,73.

Od 2012. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta, na projektu „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“ (III 46010). U zvanje istraživača saradnika izabran je 2015. godine, a reizabran 2018. godine. Tokom ovog perioda učestvovao je u izradi više završnih i master radova, kao i u radu sa studentima iz inostranstva, preko IAESTE programa razmene.

Predrag Petrović autor je ili koautor 11 radova objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja (M20), od kojih su 2 objavljena u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), 3 rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 2 rada objavljena u istaknutim međunarodnim časopisima (M22) i 4 rada objavljena u međunarodnim časopisima (M23), kao i 2 rada objavljena u časopisima od nacionalnog značaja (M52), 1 rad štampan u celini na međunarodnom skupu (M33) i 13 radova štampanih u izvodu na međunarodnim skupovima i 2 rada štampana u izvodu na nacionalnim skupovima (M64).

Član je izvršnog odbora Mikološkog društva Srbije od 2015. godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: **Предраг М. Петровић**

Број индекса: **4066/2011**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива
Handkea utriformis (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i
Vascellum pratense (Pers.) Kreisel“**

- 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, 20.5.2019.

Предраг Петровић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Предраг М. Петровић**

Број индекса: **4066/2011**

Студијски програм: **Биохемијско инжењерство и биотехнологија**

Наслов рада: „**Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel“**

Ментори: др **Бранко Бугарски**, редовни професор Универзитета у Београду,
Технолошко-металуршки факултет

др **Анита Клаус**, ванредни професор Универзитета у Београду,
Пољопривредни факултет

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, 20. 5. 2019.

Предраг Петровић

Изјава о коришћењу

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

**„Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива
Handkea utriformis (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i
Vascellum pratense (Pers.) Kreisel“**

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, 20. 5. 2019.

Дрeгoрo Дeпeрo

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ
ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Карактеризација и инкапсулација биолошки активних компоненти из гљива *Handkea utriformis* (Bull.) Kreisel, *Handkea excipuliformis* (Bull.) Kreisel i *Vascellum pratense* (Pers.) Kreisel**”, аутора **Предрага Петровића**, констатујем да утврђено подударање текста износи 4%. Овај степен подударности последица је цитата, личних имена, библиографских података о коришћеној литератури, тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

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

Проф. др Бранко Бугарски

Проф. др Анита Клаус

У Београду, 20.5.2019.

Анита Клаус