

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

JOVANA Đ. VUNDUK

**HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA
SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA
GLJIVA *FOMES FOMENTARIUS, AURICULARIA*
AURICULA-JUDAE I SPARASSIS
*CRISPA***

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY IN BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Jovana Đ. Vunduk

**CHEMICAL CHARACTERIZATION AND
BIOLOGICAL PROPERTIES OF POLYSACCHARIDE
EXTRACTS OF FUNGI FOMES FOMENTARIUS,
AURICULARIA AURICULA-JUDAE AND SPARASSIS
CRISPA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Mentor:

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

Članovi komisije:

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

dr Dragica Jakovljević, naučni savetnik,
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Centar za hemiju, Univerzitet u
Beogradu

dr Maja Kozarski, docent
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Suzana Dimitrijević-Branković, redovni profesor
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

“Jednostavno, ovde ih niko nije tražio”, reče dečak.

...

“Ovde ih niko nije tražio”, ponovi dečak.

Ali se niko nije pomerio s mesta. Stajali su i gledali kao zapanjeni. Svuda naokolo, po ivicama proplanka, rasle su velike pečurke, odozgo sjajne i mrke kao hlebovi.

...

“Imam utisak da je zemlja još vlažna”, reče Ana i zagreba nogom sloj trulog lišća.

Ali se još niko nije pomerio da uzbere gljive. Stajali su i posmatrali ih.

Činilo im se da gledaju kako izrastaju tu pred njihovim očima. Kao da vide kako svrdlaju odnekud iz dubine, poput neke čudne gliste, zatim kako se nadima sloj trulog lišća. Onda se ispod zemlje pomalja mrka glatka kapa, kao testo koje se rumeni i nadolazi.

Prvo su ih brali pažljivo, otkopavajući pristima sloj vlažnog lišća koji je zaklanjao koren. Zatim su odjednom, jer im se učinilo da bi mogao naići neko, počeli da ih grabe, da ih lome i trpaju u džak iz kojeg su izručili šišarke. Već su čitavu jesen krstarili šumom, skupljajući šišarke koje će ložiti zimi a jedva da su nekad našli po koju pečurku.

Odlomak iz “Priča o pečurkama“ (Rani jadi, Danilo Kiš)

Posvećeno onima koji su mi bili stručna i moralna podrška, onima koji gljive vole i tu ljubav dele...

Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*

Doktorska disertacija

Jovana Vunduk

REZIME

Savremeno tržište i potrošači sve više prepoznaju sektor funkcionalne hrane. Hrana je više nego ikad energija, medicina, filozofija, trend ali i nauka. Tako više nije dovoljno tvrditi da je neka namirnica blagotvorna po zdravlje čoveka. Potrebno je identifikovati aktivne komponente, utvrditi koje biološke osobine ispoljavaju, a potom i na koji način ih je moguće izolovati, te postupak učiniti komercijalnim. Medicinske gljive predstavljaju upravo takvu namirnicu, jer sadrže brojna aktivna jedinjenja poput polisaharida, fenolnih jedinjenja, proteina, triterpena. Polisaharidi gljiva najkompleksniji su molekuli u prirodi i kao takvi modulatori imunog odgovora. Biološki odgovori polisaharida su raznovrsni što je posledica različite građe, molekulske mase, konformacije i rastvorljivosti ovih molekula. Iako mehanizmi delovanja nisu potpuno razjašnjeni uočeno je da biološki efekat polisaharida gljiva može biti umanjen zbog relativno male rastvorljivosti u vodi. Takođe, postupak ekstrakcije može se negativno odraziti na biološka svojstva ekstrakta.

Cilj ove teze bilo je dobijanje polisaharidnih ekstrakata odabranih gljiva te njihova strukturalna modifikacija primenom specifičnih enzima koji vrše hidrolizu α -D-glikozidnih veza. Zatim, hemijska karakterizacija ekstrakata, a potom ispitivanje bioloških osobina (antimikrobnih, antioksidativnih, citotoksičnosti i sposobnosti inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima (ACE)). Konačno, ekstrakti su upoređeni na osnovu rezultata primenjenih metoda, te su njihove hemijske osobine dovedene u vezu sa biološkim svojstvima. To je trebalo da omogući selekciju optimalnih uslova za dobijanje biološki aktivnih polisaharida gljiva, i tako obezbedi standardizacija postupka za njihovo najbolje iskorišćenje.

Ekstrakcija polisaharida odabranih gljiva, *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*, izvršena je postupcima vrele vodene i alkalne ekstrakcije, a sirovi vodeni ekstrakt je i naknadno prečišćen dijalizom. Sirovi polisaharidni ekstrakti modifikovani su sukcesivnim dodavanjem izoamilaze, β -amilaze, α -amilaze i pronaze. Hemijska karakterizacija ekstrakata sprovedena je primenom Megazyme glukanskog kita, spektrofotometrijskim određivanjem sadržaja ukupnih ugljenih hidrata, proteina i fenolnih jedinjenja. FT-IR spektroskopija korišćena je za

ispitivanje efikasnosti enzimske modifikacije. Za utvrđivanje monosaharidnog sastava ekstrakata primenjena je planarna hromatografija. Biološke osobine okarakterisane su na osnovu *in vitro* ispitivanja antioksidativne aktivnosti (testiranjem sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, sposobnosti redukcije jona gvožđa i bakra, sposobnosti heliranja jona gvožđa i testiranjem sposobnosti inhibicije peroksidacije lipida), antimikrobne aktivnosti (primenom disk difuzione, mikro i makrodilucione metode), sposobnosti inhibicije ACE i citotoksičnosti.

Utvrđeno je da način ekstrakcije utiče na prinos ekstrakata, te da je on viši kada je hidroliza ćelijskog zida efikasnija, mada zavisi i od hidrofilnosti polisaharida ispitivane vrste, kao što je utvrđeno kod gljive *S. crista*. Enzimska modifikacija dovela je do smanjenja prinosa ekstrakata usled eliminisanja frakcija malih molekulskih masa (proteini i fenolna jedinjenja), što je najizraženije bilo kod alkalnih ekstrakata. Vrela vodena ekstrakcija praćena dijalizom obezbedila je maksimalno koncentrisanje polisaharida, osim kod gljive *A. auricula-judae*. Isti trend zapažen je i kod sadržaja ukupnih glukana. Enzimski tretman je generalno imao negativan uticaj na sadržaj ukupnih glukana, što je bilo očekivana posledica uklanjanja α -glukana. Sirovi vodeni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakti sadržali su najviše β -glukana. Najviše α -glukana dobijeno je u sirovim alkalnim ekstraktima, a sadržaj je značajno snižen primenom enzima koji hidrolizuju α -D-glikozidne veze. Transformacije polisaharidnih komponenata, te uspešnost enzimskog tretmana potvrđeni su FT-IR analizom. Hemijska karakterizacija je pokazala da je D-glukoza dominantan monosaharid, dok su manoza, galaktoza, ksiloza, fukoza i glukuronska kiselina prisutne u manjoj količini. Primena enzima u kombinaciji sa dijalizom obezbedila je i uklanjanje fenolnih jedinjenja, čiji je sadržaj bio najviši u sirovim vodenim ekstraktima. Zapaženo je da se enzimskim tretmanom, koji podrazumeva i upotrebu pronaze, postiže i deproteinizacija ekstrakata.

Primenom metoda za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ustanovljeno je da različit stepen rastvorljivosti ekstrakata utiče na lažno negativne/slabije rezultate disk difuzione metode, što je čini nedovoljno pouzdanim parametrom za procenu antimikrobne aktivnosti ekstrakata gljiva. Mikrodilucioni metod je pokazao da ekstrakti sve tri ispitivane gljive ispoljavaju antimikrobno delovanje pri veoma niskim koncentracijama, a u mnogim slučajevima primećeno je mikrobicidno dejstvo. Alkalni ekstrakti bili su najefikasniji, dok je enzimskom modifikacijom antimikrobna aktivnost drastično smanjena, u nekim slučajevima i više od 200 puta. Kinetika rasta i inaktivacija bakterijskih ćelija praćena je pomoću makrodilucionog metoda, a ukoliko inaktivacija nije bila momentalna, najčešće je nastupala u eksponencijalnoj fazi rasta bakterija, tj. od 6-9 h. Antimikrobno dejstvo na kvasce nije uočeno ni kod jednog od ekstrakata. Pokazalo se da sirovi polisaharidni ekstrakti ispoljavaju značajan potencijal kao nova antimikrobna sredstva.

Sirovi polisaharidni ekstrakti pokazali su izraženiju antioksidativnu sposobnost u svim primenjenim metodama u odnosu na modifikovane ekstrakte. Aktivnost je rasla sa porastom koncentracije, osim kod inhibicije lipidne peroksidacije gde su više koncentracije delovale prooksidativno. Uočeno je da postoji jaka korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja i α -glukana. Sadržaj proteina i α -glukana najznačajnije je uticao na sposobnost redukcije Cu^{2+} . Naročito efikasnim antioksidantom pokazali su se ekstrakti gljive *F. fomentarius*.

Sve tri testirane gljive pokazale su se kao efikasni inhibitori ACE, a vodena ekstrakcija umanjila je dejstvo ekstrakata. Od presudnog značaja za inhibiciju ACE bio je sadržaj proteina, a u manjoj meri α - i β -glukana. Enzimski tretirani uzorci kod kojih je sadržaj proteina, ali i glukana snižen, ispoljavali su značajno slabiju sposobnost inhibicije ACE u *in vitro* uslovima.

Citotoksičnost prema 3 tumorske ćelijske linije primećena je kod većine testiranih ekstrakata pri čemu se ova sposobnost drastično smanjivala nakon enzimskog tretmana. Kako su ovi uzorci bili i slabije rastvorljivi u vodi potvrđen je značaj ove osobine za antitumornu aktivnost. Rezultati su pokazali da je sadržaj α -glukana najznačajnije uticao na citotoksičnost ekstrakata.

U ovom radu demonstriran je značaj postupka ekstrakcije za biološke osobine ekstrakata gljiva. Osim toga, utvrđeno je da pored karakteristika koje se navode u literaturi (molekulske mase, sadržaja β -glukana, njihove konformacije i rastvorljivosti), na biološka svojstva gljiva značajno utiče i sadržaj α -glukana. Istraživanje je pokazalo da su gljive *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crispa* dobar izvor novih antimikrobnih jedinjenja, kao i antioksidanata koji primenu mogu naći kao sastojci funkcionalnih formulacija, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Ključne reči: *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae*, *Sparassis crispa*, polisaharidni ekstrakti, biološka aktivnost, enzimska modifikacija

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK: 561.284: 615.451. 1 (043. 3)

Chemical characterization and biological properties of polysaccharide extracts of fungi *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* and *Sparassis crispa*

Doctoral Dissertation

Jovana Vunduk

ABSTRACT

Sector of functional food is more and more appreciated by modern market and consumers. Food is energy, medicine, philosophy, trend and science, now more than ever. Claiming that some type of food has beneficial effect on human health without proving it is past. Active components have to be identified, as well as their biological properties. Furthermore, those components have to be extracted, and the extraction procedure has to be economically justified. Medicinal mushrooms fulfill all listed characteristics, since they contain active compounds like polysaccharides, proteins, triterpene, and phenolic compounds. Polysaccharides isolated from mushrooms are marked as the most complex molecules in nature, which makes them excellent immune response modulators. Biological effects of mushrooms polysaccharides are various due to the differences in their structure, molecular mass, conformation, and water solubility. Although the mechanisms of their action are not completely clear, it was noticed that the ability to dissolve in water strongly affects mushroom's polysaccharides biological activity. Extraction procedure can have negative impact on biological effect of these molecules, too.

The aim of this thesis was to obtain polysaccharide extracts of selected mushroom species, and to modify their structure with enzymes which hydrolyze α -D-glucoside bondages. Then, to characterize extracts, and to examine their biological activity (antimicrobial, antioxidative, cytotoxic and the ability to inhibit angiotensin I-converting enzyme (ACE)). Finally, the extracts were compared, and based on the results of applied methods their chemical characteristics were connected with biological activities. This approach should enable the selection of optimal conditions for the production of biologically active mushroom polysaccharides. Overall, results should provide the standardized procedure for the most efficient utilization of mushroom extracts.

Polysaccharides of selected mushrooms, *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* and *Sparassis crispa*, were extracted by hot water and alkali extraction, while crude water

extracts were further purified by dialysis. All crude extracts were modified by successive application of isoamylase, β -amylase, α -amylase, and pronase. Megazyme glucon kit, spectrophotometric determination of total carbohydrates, proteins and phenolic compounds were performed in order to chemically characterize mushrooms extracts. FT-IR spectroscopy was used for the evaluation of the enzyme modification efficiency. Monosaccharide content was examined by planar chromatography. Biological properties were characterized based on several *in vitro* assays: antioxidative activity (scavenging of free DPPH radicals, Fe^{3+} and Cu^{2+} ion reduction ability, chelating of iron ions and inhibition of lipid peroxidation), antimicrobial activity (disk diffusion method, micro and macro-dilution method), cytotoxicity and inhibition of ACE.

It was shown that type of extraction affects the extracts yield, which is higher when the cell wall is hydrolyzed in a higher degree, although the hydrophilicity of extracts was important, too, like in case of *S. crista*. Yield of extracts was lowered due to the loss of molecules with low molecular masses (proteins and phenolic compounds) during the enzyme treatment, and this was the most pronounced in case of alkali extracts. Maximal concentration of polysaccharides was obtained by hot water extraction, followed by dialysis. The only exception was *A. auricula-judae*. The same trend was noticed in case of total glucans. Generally, enzyme modification has negative impact on total glucan content, which was expected due to the removal of α -glucans. Crude water and partially purified water extract had the highest amount of β -glucans. The highest amount of α -glucans was obtained in crude alkali extracts, while α -D-glycosidic bond hydrolyzing enzymes lowered its content. FT-IR analysis confirmed that the enzyme modification of the polysaccharide compounds was successively performed. D-glucose was the prevalent monosaccharide, while mannose, galactose, xylose, fucose and glucuronic acid were present to a lesser quantities. Enzymes and dialysis enabled removal of phenolic compounds, whose content was the highest in the crude water extracts. Another effect of the enzyme treatment, which includes pronase, was deproteinization of the extracts.

The study of antimicrobial activity showed that different degree of solubility of extracts can give the false negative or less effective results, when disc diffusion assay was used. Based on these results this method was characterized as insufficiently reliable in the estimation of antimicrobial activity of mushrooms extracts. On the other hand, all three extracts of selected mushrooms exhibited antimicrobial activity under very low concentrations, when examined by microdilution method. In many cases extracts were microbicidal. Alkali extracts had the most pronounced antimicrobial effect while enzyme treatment showed negative impact on this characteristic. In some cases, minimal inhibitory concentrations of enzyme modified extracts were more than 200 times

lower than in case of crude polysaccharide extracts. Macrodilution assay was used for the screening of growth kinetics and the inactivation of bacterial cells. It was established that extracts act either at the moment of its application or during the exponential phase of bacterial life cycle, from 6th to 9th hour. All tested extracts showed no antimicrobial effect in case of yeasts. Generally, crude polysaccharide extracts exhibited significant potential as the novel antimicrobial agents.

Based on all applied antioxidative activity assays, crude polysaccharide extracts demonstrated the higher activity in comparison with those that were modified. Antioxidative effect was higher when higher concentrations were tested, except for the inhibition of lipid peroxidation where prooxidative activity was noticed for higher concentrations of extracts. Strong correlation was established between antioxidative activity and the amounts of phenolic compounds, as well as for α -glucans. Amount of proteins and α -glucans was the most significant for the extracts ability to reduce the Cu^{2+} ions. Extracts of *F. fomentarius* were especially strong antioxidants, by all applied methods.

Inhibition of ACE was noticed in case of all three mushrooms, and water extraction reduced this ability of extracts. Contents of proteins were the most important for the extracts ability to inhibit ACE, while α - and β -glucan contents were less important. The amounts of proteins and glucans were lower in modified samples, so they exhibited significantly lower ability to affect ACE, *in vitro*.

Most of the samples were cytotoxic toward 3 malignant cell lines. This effect was not so strong in case of enzyme modified extracts. At the same time these samples had lower water solubility, which confirmed the significance of this property for the antitumor activity. The results showed that the content of α -glucans was the most significant for the extracts cytotoxicity.

This work demonstrated the significance of extraction method for the biological activity of mushrooms extracts. Moreover, it was established that besides the characteristics that are known from literature (molecular mass, β -glucan content and their conformation and solubility in water), the amount of α -glucans also significantly affects biological properties of mushrooms extracts. It was shown that medicinal mushrooms *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* and *S. crispap* presents a good source of novel antimicrobial, as well as antioxidative agents, which can be applied in functional food sector, food industry and pharmacy.

Key words: *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae*, *Sparassis crispa*, polysaccharide extracts, biological activity, enzyme modification

Academic Expertise: Biotechnology

Field of Academic Expertise: Food and Industrial Microbiology

UDK: 561. 284: 615. 451. 1 (043. 3)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Medicinski značajne gljive.....	4
2.2. <i>Fomes fomentarius</i>	5
2.3. <i>Auricularia auricula-judae</i>	9
2.4. <i>Sparassis crispa</i>	13
2.5. Biološka aktivnost i bioaktivna jedinjenja gljiva	15
2.5.1. Polisaharidi gljiva.....	16
2.5.2. Mehanizam delovanja polisaharida gljiva	20
2.5.3. Ostala bioaktivna jedinjenja iz gljiva	22
2.6. Hemijske modifikacije ekstrakata gljiva	23
2.7. Gljive-funkcionalna hrana, nutriceutici, lekovi ili suplementi u ishrani?	25
3. CILJEVI RADA.....	27
4. MATERIJAL I METODE.....	29
4.1. Gljive korišćene u radu	29
4.2. Priprema ekstrakata	29
4.2.1. Priprema polisaharidnih ekstrakata	29
4.2.2. Enzimaska modifikacija polisaharidnih ekstrakata	30
4.3. Hemijska karakterizacija ekstrakata.....	31
4.3.1. Analiza polisaharida.....	31
4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja	33
4.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina.....	34
4.4. Biološka svojstva ekstrakata	34
4.4.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata.....	34
4.4.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata.....	38
4.4.3. Sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima	41
4.4.4. Antikancerogena svojstva ekstrakta	42
4.5. Statistička obrada rezultata.....	43

5. REZULTATI I DISKUSIJA	44
5.1. Identifikacija gljiva	44
5.1.1. Identifikacija gljive <i>Fomes fomentarius</i>	44
5.1.2. Identifikacija gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	45
5.1.3. Identifikacija gljive <i>Sparassis crispa</i>	46
5.2. Prinos ekstrakata gljiva	47
5.2.1. Prinos ekstrakata gljive <i>Fomes fomentarius</i>	47
5.2.2. Prinos ekstrakata gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	49
5.2.3. Prinos ekstrakata gljive <i>Sparassis crispa</i>	50
5.3. Polisaharidne komponente ekstrakata gljiva	52
5.3.1. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive <i>Fomes fomentarius</i>	52
5.3.2. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	54
5.3.3. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive <i>Sparassis crispa</i>	55
5.4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima gljiva	57
5.4.1. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive <i>Fomes fomentarius</i>	57
5.4.2. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	58
5.4.3. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive <i>Sparassis crispa</i>	59
5.5. Sadržaj proteina u ekstraktima gljiva	60
5.5.1. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive <i>Fomes fomentarius</i>	61
5.5.2. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	61
5.5.3. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive <i>Sparassis crispa</i>	61
5.6. FT-IR spektroskopija ekstrakata gljiva	62
5.6.1. FT-IR spektroskopija gljive <i>Fomes fomentarius</i>	63
5.6.2. FT-IR spektroskopija gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	64
5.6.3. FT-IR spektroskopija gljive <i>Sparassis crispa</i>	65
5.7. Planarna hromatografija kiselinskog hidrolizata polisaharidnih ekstrakata	66
5.8. Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljiva	66

5.8.1. Metod difuzije sa filter diskova.....	66
5.8.2. Mikrodilucioni metod.....	74
5.8.3. Makrodilucioni metod.....	81
5.9. Antioksidativna aktivnost ekstrakata gljiva	95
5.9.1. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala	95
5.9.2. Ispitivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata konjugen dienskom metodom	103
5.9.3. Sposobnost redukcije jona gvožđa (FRAP).....	109
5.9.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa	115
5.9.5. Sposobnost redukcije jona bakra (CUPRAC)	121
5.10. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima (ACE)	127
5.11. Antitumorna svojstva ekstrakata	132
5.11.1. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive <i>Fomes fomentarius</i>	132
5.11.2. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive <i>Auricularia auricula-judae</i>	134
5.11.3. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive <i>Sparassis crispa</i>	135
6. ZAKLJUČAK	137
7. LITERATURA.....	146
8. PRILOZI	158

1. UVOD

U prvoj petini 21. veka ljudska populacija broji nešto manje od 7.5 milijardi jedinki (www.worldometers.info). Početkom 21. veka ova brojka iznosila je 6 milijardi, a procenjuje se da će 2056. godine dostići oko 10 milijardi. Statistički podaci ukazuju na drastičnu promenu dinamike rasta u poslednjih 100 godina. Procenjuje se da je 8000 godina pre nove ere, tj. u začetku poljoprivrede, na Zemlji živelo oko 5 miliona ljudi uz godišnju stopu rasta od 0.05%. Industrijska revolucija označava prekretnicu i ljudska populacija broji 1 milijardu. Za drugu milijardu bilo je potrebno 130 godina, za treću 30 a za četvrtu svega 15 godina. Naročito je interesantna promena koja se odigrala tokom 20. veka: populacija je sa 1.65 milijardi porasla na 6. Očigledno razvoj tehnologije, medicine i poljoprivrede uslovio je ovakav trend. Sa druge strane prinos različitih poljoprivrednih kultura koje se koriste za ishranu ljudi porastao je za 70% (<http://www.grida.no>). Nešto manje intenzivan trend postojao je i u proizvodnji hrane životinjskog porekla. Ipak, industrijska proizvodnja i prerada tradicionalnih namirnica imaju brojna ograničenja (zahteva veliki prostor, značajan utrošak energije, ima snažan uticaj na životnu sredinu) pa se neminovno postavlja pitanje obezbeđivanja hrane za sve brojniju ljudsku populaciju.

Osim primarne funkcije, odnosno izvora energije, danas se od hrane zahteva i funkcionalnost izražena kao doprinos poboljšanju opšteg stanja organizma. To se postiže primenom sirovina koje ispoljavaju biološku aktivnost. Drugim rečima poželjno je da hrana ima i medicinska svojstva.

Pokazalo se da različite biljne i životinjske vrste sintetišu jedinjenja dobro po zdravlje i optimalno funkcionisanje organizma (Noomhorm et al., 2014). Upotreba ovakvih namirnica je počela u prvobitnim ljudskim zajednicama a narodni iscelitelji-vračevi bili su zaduženi za sticanje novih saznanja i očuvanje postojećih. Brojna istraživanja koja se danas sprovode u cilju pronalaženja biološki aktivnih sirovina bazirana su na saznanjima plemenskih zajednica širom sveta (De Silva et al., 2012). Naročit potencijal u ovom smislu imaju proizvodi dobijeni od biljaka i mikroorganizama. Jedna od ključnih osobina ovih producenata jeste njihova brojnost i intenzivan životni ciklus, kao i sposobnost brze

adaptacije. Biljke i mikroorganizmi sintetiziraju brojne sekundarne metabolite kao i ćelijske konstituente, poput bioaktivnih glukana i fenolnih jedinjenja.

Specifičnu oblast koja se graniči sa prehrambenom industrijom i farmacijom čine nutriceutici i suplementi u ishrani. Ovi proizvodi nastaju kao hibrid između hrane i lekova a rezultat su životnog stila i trenda koji nastupa nakon II svetskog rata kao potreba ljudi da budu zdraviji i uspore proces starenja. Osim očigledne koristi po zdravlje ljudi ovi proizvodi su prepoznati i od strane tržišta kao izvor profita. 2002. godine tržište nutriceutika je samo u Sjedinjenim Američkim Državama vredelo 16 milijardi dolara dok je svetsko tržište funkcionalne hrane i nutriceutika 2010. godine imalo vrednost od 500 milijardi dolara (Wetzel et al., 2006).

Kraljevstvo gljiva predstavlja idealan izvor sirovina kako za funkcionalnu hranu tako i za nutriceutike. Prema starim procenama ovo kraljevstvo brojalo je 1.5 milion vrsta dok novi izveštaji bazirani na molekularnim metodama procenjuju da ih ima oko 5.1 miliona (Blackwell, 2011). Zašto gljive? Tradicionalna literatura i istorija nude brojne dokaze o korisnosti gljiva; Egiptovci su zvali ledeni čovek sa Alpa svedočanstvo je da su gljive bile cenjene pre više od 5 000 godina. Njegova ručna torba sadržala je mali broj stvari među kojima su bile čak dve gljive: *Piptoporus betulinus* i *Fomes fomentarius* (Peintner et al., 1998). Medicina brojnih sibirskih plemena kao i indijska ajurveda bila je zasnovana na gljivama (Saar, 1991). Danas se od ove grupe organizama proizvode antibiotici, antifungicidi, sredstva za regulaciju nivoa holesterola (lovastatin), imunosupresivi (ciklosporin) i drugo (De Silva et al., 2012).

Ne treba zanemariti ni nutritivni aspekt gljiva: sadrže ugljene hidrate (do 90%), proteine (do 35%), esencijalne amino-kiseline, mineralne materije (Ca, Mg, Na, K, P, Cu, Fe, Mn, Zn), vitamine, dijetetska vlakna (hitin i polisaharidi) i vrlo malo masti (do 1%) (Cheung, 2008; Synytsya et al., 2013). Medicinska svojstva gljiva pripisuju se mahom jedinjenjima velike molekulske mase odnosno polisaharidima, proteinima kao i kompleksima polisaharida i proteina; mada su isto tako važna i različita jedinjenja malih molekulskih masa poput polifenola, sterola, alkaloida, terpenoida, lektina i laktona (De Silva et al., 2012). Centralno mesto među bioaktivnim komponentama pripada polisaharidima, tj. glukanima. Ovi molekuli odlikuju se velikim biološkom potencijalom a pripisuje im se

imunomodulatorsko i antikancerogeno dejstvo. Svetska zdravstvena organizacija (WHO) procenjuje da će se do 2030. godine registrovati više od 21 milion novih slučajeva ljudi obolelih od raka i da će više od 13 miliona umreti ukoliko se za njih ne iznađe odgovarajuća terapija. Trenutno lečenje podrazumeva primenu hirurgije, hemo- i radioterapije, što je praćeno mnogim komplikacijama. Upravo zato novi pristup, tj. primena preparata koji nemaju direktan uticaj na kancer, već vrše modulaciju imunog odgovora, postaje sve interesantniji svetskoj naučnoj zajednici ali i krajnjim korisnicima.

Aktivne komponente moraju prvo biti izolovane što se postiže različitim tipovima ekstrakcija. Najčešće se vrši vrela vodena ekstrakcija, mada su česte i alkalna, ultrazvučna, mikrotalasna, enzimska i kisela ekstrakcija (Zhu et al., 2016).

Većina polisaharida gljiva prisutna je u nerastvornoj formi (53.9-83.2% od ukupno prisutnih) što ih čini teško primenljivim medicinske svrhe. Da bi se ovaj problem prevazišao i unapredila upotrebna vrednost pribegava se hemijskim modifikacijama polisaharida. Na taj način menjaju se funkcionalne grupe a molekuli postaju rastvorljiviji u vodi. Svakako da modifikacija ne vodi uvek pozitivnim rezultatima jer su polisaharidi složeni molekuli a veza između strukture i funkcije još nedovoljno istražena. Smatralo se da je za intenzitet biološkog efekta odgovorna velika molekulska masa, razgranata struktura i konformacija trostrukog heliksa. Ipak, novija istraživanja pokazuju da ovo nije pravilo (Zhang et al., 2014). Glukani, naročito β -glukani, imaju i tehnološki važna svojstva kao što su stabilizacija emulzija, sposobnost bubrenja i emulgovanja, te geliranje. Uključivanjem ovih molekula u sastav prehrambenih proizvoda istovremeno se utiče na tehnološka svojstva i funkcionalne osobine. Tako β -glukani izolovani iz gljiva nalaze primenu u prehrambenoj industriji, medicini, farmaciji, kozmetičkoj industriji i proizvodnji stočne hrane (Zhang et al., 2014).

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Medicinski značajne gljive

Često se može čuti termin “medicinske gljive“ kada se govori o onim vrstama koje ispoljavaju terapeutska svojstva. Iako nikada nije zvanično priznat čvrsto je ukorenjen u naučnim krugovima, literaturi ali i svakodnevnom životu. U najširem smislu medicinskim gljivama, ili tačnije medicinski značajnim gljivama, se smatraju jestive i ne jestive vrste koje ispoljavaju neko terapeutsko dejstvo na ljudski organizam. Trenutno je potvrđeno 126 medicinskih funkcija/dejstava a među značajnijima su: antitumorno, imunomodulatorsko, antioksidativno, antivirusno, kardiovaskularno, antiparazitsko, antibakterijsko, hepatoprotektivno, antidijabetetsko, detoksikaciono dejstvo, uticaj na regulaciju nivoa holesterola (Wasser, 2011).

Primena gljiva u medicinske svrhe nije tekovina moderne medicine već tradicija mnogih, a posebno azijskih naroda. Ipak, njihova uloga nije uvek bila jasno razgraničena- postojalo je mešanje spiritualnog i medicinskog aspekta (Grienke et al., 2014). Vremenom je folklorna uloga potisnuta a razvoj nauke stavio je u prvi plan iskorišćenje brojnih medicinskih osobina gljiva. Stari Sloveni su takođe praktikovali primenu lekovitih biljaka što se kasnije odrazilo i na srednjevekovnu Srbiju. Najstarija farmakopeja u Srba je Hilendarski medicinski kodeks iz 15-16 veka, pisan narodnim jezikom. U kodeksu se pominje 135 biljaka a gljive se pominju 8 puta (Jarić et al., 2011). Tvrdi se da su korisne kod lečenja hemoroida, tumora, otvorenih rana, pega, kamena i peska u bubregu, glavobolje, grčeva, za snižavanje temperature, čišćenje creva i iskašljavanje. Sve gljive su u Hilendarskom kodeksu označene zajedničkim imenom. Verovatno je u pitanju bilo više vrsta ali se konkretni nazivi ne mogu dodeliti, premda se u spisima drugih naroda mogu naći reference koje jasno upućuju na to koja gljiva je bila korišćenakod tretiranja pojedinih zdravstvenih problema (Jarić et al., 2011).

Medicinski značajne gljive poseduju raznovrsna aktivna jedinjenja među kojima prednjače polisaharidi kao molekuli sa najvećim biodiverzitetom u prirodi; većim i od onog koji poseduje molekul DNK (Rowan et al., 2002). Svaka od medicinski značajnih vrsta

gljiva sadrži jedan ili više polisaharida sa određenim tipom veze, monosaharidnim sastavom, učestalošću bočnog grananja, konformacijom molekula, molekulskom masom, što sve skupa daje konkretan spektar bioloških osobina. Sa druge strane to otežava dobijanje uniformnih saznanja baziranih na malom broju ispitanih vrsta. Tako svaka gljiva iz ove grupe ima jedinstvene osobine koje su posledica brojnih faktora, u prvom redu hemijskog sastava.

2.2. *Fomes fomentarius*

Fomes fomentarius (L.:Fr) Fr (Polyporaceae) je lignikolna, saprofitna, višegodišnja gljiva drvenaste strukture te stoga nejestiva; kod nas poznata pod imenima trud i konjsko kopito. Najčešće raste kao slab parazit na listopadnom drveću (bukva i breza) a ređe na četinarima. U Kini sekoristi već vekovima podimenom "mudi". Može da živi oko 25 godina. Formira krupno plodonošno telo nepravilnog oblika koje je širokom osnovom (100 do 250 mm) vezano za drvo. Ima sterilni očvršli deo koji se nalazi sa gornje strane, čija je debljina na poprečnom preseku 1-2 mm. Dok je mlada gljiva je krem do tamno braon boje a starenjem postaje siva. Karpofor dostiže širinu od 50 cm i debljinu od 20 cm. Na površinskom (sterilnom) delu mogu se uočiti koncentrični lukovi (Slika 1.). Ispod sterilnog dela odnosno sa donje strane nalazi se himenijum cevaste strukture, sa cevčicama dugim 2-5 mm i porama prečnika 3-4 mm (Slika 2.). Sporonosni deo se formira svake godine. Spore su elipsoidnog do cilindričnog oblika, glatke, promera 18.5-19 x 5.5-6 µm (Breitenbach i Kranzlin, 1986). Naseljava Severnu Ameriku, Aziju, kao i Evropu.

Otkriće ledenog čoveka u italijanskim Alpima potvrdilo je da je *F. fomentarius* bio poznat na području Evrope pre više od 5 hiljada godina. Najstariji arheološki podaci ukazuju da je trud korišćen kao kresivo i za prenošenje vatre još pre 11555 ± 100 godina, što u svojim spisima potvrđuje i Plinije Stariji (Peintner et al., 1998; Pegler, 2001). Hipokrat navodi da se trud koristio za kauterizaciju rana. Gljiva bi se zapalila i pustila da tinja a potom nanosila na kožu iznad organa koji je oboleo. Tokom srednjeg veka hirurzi, berberini i stomatolozi su trud koristili kao stipsu pa je tad bio poznat kao hirurška gljiva.

Kanti, pleme koje naseljava Zapadni Sibir uključivalo je *F. fomentarius* u brojne rituale za otklanjanje bolesti, zlih duhova i demona. Primenjivao se u formi dima, praha i obloga. Vlaknasti deo se usitnjavao u avanu a kada bi postao mek čuvan je u kutiji (Saar, 1991). Obloge su privijane na rane koje krvare i na bolne ekstremitete i zglobove. Evropljani, naročito Nemci, su ga koristili za izradu kapa, štitnika za grudi, ukrasnih predmeta kao i za čuvanje igala od vlage i rđe jer ne propušta vodu (Peintner et al., 1998). U Indiji je *F. fomentarius* bio deo ajurvede i nazivao se Phansomba. Od plodonosnog tela se mešanjem sa vodom dobijala pasta, a stavljala se na desni u slučaju prekomernog lučenja pljuvačke. Primenjivana je i kod lečenja dijareje, dizenterije i za saniranje rana koje krvare (Vaidiya i Rabba, 1993).

Prema postojećoj klasifikaciji ova vrsta pripada navedenim taksonomskim kategorijama:

Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Polyporales

Familija: Polyporaceae

Rod: Fomes

Vrsta: *Fomes fomentarius*

Interesovanje za ovu gljivu javlja se sedamdesetih godina 20. veka pobuđeno njenom primenom u tradicionalnoj medicini. Björndal i Lindberg su 1970. godine izolovali iz plodonosnog tela truda 2 glukuronoglukana koji nisu uočeni nigde drugde u prirodi. Pokazalo se da oba sadrže β -glukan, što su pokazala ikasnija istraživanja, koja su uključivala ekstrakte dobijene iz submerzno gajenog micelijuma.



Izvor: www.naturespot.org.uk

Slika 1. Karpofor gljive *Fomes fomentarius* na drvetu breze

Utvrđeno je da sirovi vodeni ekstrakt utiče na intenzitet lipidnog metabolizma kao i na pojačanu antioksidativnu odbranu jetre pacova obolelih od dijabetesa (Lee, 2005). Druga grupa autora uspela je da izvrši optimizaciju procesa submerzne proizvodnje micelijuma i izoluje egzopolisaharid koji je pokazao citotoksično dejstvo na ćelijske linije tumora želuca u uslovima *in vitro* (Chen et al., 2011). Nešto starija studija bavila se uticajem polisaharidne frakcije, koja je sadržala 60.5% polisaharida, *F. fomentarius* na Ehrlich tumor na životinjskom modelu. Pokazalo se da je ekstrakt efikasan u pogledu smanjenja i regresije tumora kod određenog broja testiranih miševa (Ito et al., 1976). Park i saradnici pokušali su da rasvetle mehanizam antinflatarnog dejstva metanolnog ekstrakta gljive *F. fomentarius*. Utvrđeno je da su ključni procesi regulacija indukovane azot-monoksid sintaze (iNOS) i genske ekspresije ciklooksigenaze-2 (COX-2), zatim smanjenje produkcije tumor

nekroznog faktora- α (TNF- α) i vezivanjenuklearnog faktora kB (NF-kB) za DNK (Park et al., 2004).



Izvor: <http://paulkirtley.co.uk>

Slika 2. Poprečni presek karpofora gljive *Fomes fomentarius*

Navodi se da *F. fomentarius* sadrži jod i fomentariol koji ispoljava ograničeno bakteriostatičko dejstvo (Peintner et al., 1998). U studiji koja je uključivala 204 vrste gljiva, 109 vrsta, među kojima i trud, pokazalo je antimikrobnu aktivnost. Gljiva *F. fomentarius* je bila naročito efikasna prema bakterijama *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens* (Suay et al., 2000).

Iz metanolnog ekstrakta ove gljive izolovani su brojni steroli, među kojima su 4 karakteristična samo za trud (Zang et al., 2013).

Dosadašnja istraživanja potvrđuju da *F. fomentarius* ispoljava snažnu biološku aktivnost, tj. da deluje antioksidativno, antitumorno, antiinflamatorno, antimikrobno, da ima diuretsko dejstvo i da snižava temperaturu (Lee, 2005). Interesantna komparativna studija efekata medicinski značajnih gljiva korišćenih u tradicionalnoj medicini i savremenoj medicini uključivala je i trud. Tom prilikom istaknuti su manje poznati biokativni molekuli (triterpeni, estri, laktioni, alkoholi, peroksidi, aldehidi i ketoni, benzofurani, kumarini i

organske kiseline), a utvrđeno je da vodeni ekstrakt truda ispoljava hipoglikemijski efekat, da inhibira ekspresiju proinflamatornih medijatora, da stimuliše aktivaciju imunomodulatornih medijatora, utiče na antiproliferaciju tumorskih ćelija u *in vitro* uslovima, stimuliše sekreciju TNF, IFN-, IL-2 i pojačava fagocitotoksičnu aktivnost makrofaga (Grienke et al., 2014).

2.3. *Auricularia auricula-judae*

Auricularia auricula-judae (Bul. ex St. Am.) Berk. je lignikolni fakultativni parazit koji se najčešće javlja na stablima zove i klena, ali i na drugom listopadnom drveću (Slike 3. i 4.). Želatinozne je strukture a oblikom podseća na ljudsko uvo te odatle i njen narodni naziv Judino uvo, drveno uvo, uvo drveta. U Japanu je nazivaju kicurage (Ho i Chen, 1991). Razvija se tokom čitave godine i može se naći u Evropi, Severnoj Americi i Aziji. Za supstrat je pričvršćena direktno ili preko kratke drške. Na gornjoj površini se često javljaju zakrivljenja i ispupčenja a boja je crveno-braon, zeleno-braon do crna. Himenijum se nalazi sa donje strane karpofora, izboran je i najčešće u istoj boji kao i suprotna strana. Nema izražen miris dok je ukus blag. Spore su izuzetno velike, preko 20 µm, cilindrične i glatke (Weber i Webster, 2006).

Prema sistematskoj klasifikaciji ova gljiva pripada sledećim kategorijama:

Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Auriculariales

Familija: Auriculariaceae

Rod: *Auricularia*

Vrsta: *Auricularia auricula-judae*

Ova gljiva se od davnina koristi u Kini, Koreji i Vijetnamu kao deo tradicionalne medicine ali i kao hrana (Nguyen et al., 2012). Smatra se da je jedna od prvih gajenih gljiva, na šta ukazuju podaci iz vremena 600 godine nove ere. Navodi se da se koristila za lečenje žutice, bolova u grlu, kod tretiranja hemoroida, za zaustavljanje krvarenja materice i kod bolesti očiju (Ho i Chen, 1991).



Izvor: <https://www.flickr.com/photos/95786621@N02/11340084314>

Slika 3.Karpofofor gljive *Auricularia auricula-judae*

Ekstrakti ove gljive korišćeni su za izazivanje pobačaja u ranoj i srednjoj fazi trudnoće kod životinja. Zato se ne preporučuje da Judino uvo konzumiraju trudnice i dojilje, kao ni žene koje planiraju trudnoću (Rowan et al., 2002). Jedna je od gljiva sa najvećom godišnjom produkcijom, pa je tako 2002. godine njena proizvodnja činila 13% od celokupne svetske proizvodnje gljiva u svežem stanju (Chang, 2008). Osim klasične proizvodnje na čvrstom ligno-celuloznom supstratu Judino uvo je moguće gajiti i submerzno (Wu et al., 2006). Odabir sirovina i uslova proizvodnje omogućava i dobijanje

značajne količine egzopolisaharida. Interesantno je i zapažanje da se pri svakoj fazi životnog ciklusa ćelije može vršiti izmena uslova rasta te tako stimulisati proizvodnja biomolekula, odnosno u ovoj studiji pomenutog egzopolisaharida (Wu et al., 2006). Kao ključni parametar pri ovakvoj proizvodnji pokazao se pH sredine.

Sa ispitivanjem bioaktivnih polisaharida ove gljive počela je japanska grupa autora izolovanjem heteropolisaharida sa (1→3)-β-D-glikozidnom vezom, za koji je utvrđeno da ima izraženo inhibitorno dejstvo na ćelije tumora Sarcoma 180, testiranom na miševima (Misaki et al., 1981). Zeng i saradnici(2012) potvrdili su prisustvo ovog tipa polisaharida. Primenom različitih savremenih instrumentalnih hemijskih metoda odredili su molekulsku masu dominantnog glukana Judinog uveta i pokazali da ispoljava snažno antioksidativno dejstvo pri testiranju u *in vitro* uslovima. Takođe su opovrgli ustaljeno mišljenje da samo polisaharidi velikih molekulskih masa ispoljavaju biološku aktivnost (Zeng et al., 2012). Molekulska masa β-glukana ove gljive iznosi 2.77×10^4 Da. Ma i saradnici(2010) su takođe uočili antitumorni efekat polisaharida ove gljive pripremljenih u vidu etanolnog ekstrakta. Oni su identifikovali i mehanizam delovanja, utvrđeno je da aktivno jedinjenje nije citotoksično već da vrši apoptozu ćelija tumora. Osim antitumornog zabeleženo je i antikoagulantno kao i antivirusno dejstvo polisaharida gljive *A. auricula-judae* (Kiho et al., 1985; Nguyen et al., 2012).

Primenom vodene, alkalne i kisele ekstrakcije izolovani su polisaharidi koji su imali antikoagulantno dejstvo. Otkriveno je da efekat potiče od kiselih glukuronskih fragmenata. Osim toga uočena je i sposobnost agregacije trombocita u *in vivo* testu na miševima. Na kraju *A. auricula-judae* je ocenjena kao potencijalni izvor komponenata za regulaciju tromboze (Yoon et al., 2003).

Ekstracelularna esteraza je otkrivena u plodonosnom telu Judinog uveta (Haase-Aschoff et al., 2013). Ovaj enzim istovremeno deluje na benzoate i cinamate i jedinstven je u živom svetu. Do tada nije opisan ni kod bazidiomiceta niti nekog drugog organizma.

U ispitivanjima ove gljive nauka je otišla i u smeru praktičnog iskorišćenja brojnih korisnih osobina, pa je tako formulisan novi proizvod kao deo funkcionalne ishrane. Ispitivanja su pokazala da je kombinacija flavona gloga i polisaharida Judinog uveta

efikasna kod regulacije nivoa holesterola (Luo et al., 2009). Primećen je i značajan antioksidativni efekat.



Slika 4. *Auricularia auricula-judae* na stablu zove, autor Jovana Vuduk

Razvojem brašna na bazi ekstrakta ove gljive dobijen je i hleb, a utvrđeno je da dodatak do 9% ekstrakta u brašno ne utiče negativno na senzorne osobine proizvoda. Testirana je i antioksidativnost ovako pripremljenog hleba pri čemu je dokazano da dodatak polisaharida *A. auricula-judae* povećava antioksidativni kapacitet, što ovakvu formulaciju čini interesantnom za industrijsku proizvodnju funkcionalne hrane (Fan et al., 2006).

Antioksidativni efekat se zadržava čak i kada je gljiva pripremljena u formi turšije (Khaskheli et al., 2015).

2.4. *Sparassis crispa*

Sparassis crispa (Wulf.: Fr) je jestiva i medicinski značajna gljiva, najpoznatiji predstavnik roda *Sparassis*. Raste pri osnovi stabala četinara širom Evrope i Severne Amerike. Uglavnom se javlja tokom leta i jeseni. Plodonosno telo je loptasto, podseća na karfiol što je i poslužilo za njeno narodno ime na području Velike Britnanije-gljiva karfiol (cauliflower). Kod nas je poznata pod imenom kokičarka. Uglavnom ima 15-20 cm u prečniku, mada može dostići i preko 30 cm. Postoji podatak da je 2000. godine u Francuskoj pronađen primerak težak 28.8 kg (www.kew.org). Karpofor čini više povezanih reznjeva koji mogu biti uvrnuti/talasasti sa zaobljenim krajevima (Slika 5.). Himenijum se nalazi sa donje strane reznjeva. Površina je glatka, beličaste, krem do oker boje, dok ivice mogu biti i nešto tamnije. Spore su male, okruglaste i glatke, dimenzija 4.5-6 x 3.5-4.5 µm. Hife su tanke sa tankim zidovima, septirane (Breitenbachi Kränzlin, 1986). Ova gljiva se komercijalno proizvodi u Kini i Japanu, ali i Sjedinjenim Američkim Državama, gde je supstrat za njeno gajenje zaštićen patentom.

Ova gljiva prema važećoj klasifikaciji pripada sledećim taksonomskim kategorijama:

Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Polyporales

Familija: Sparassidaceae

Rod: *Sparassis*

Vrsta: *Sparassis crispa*

Osim na panjevima i pri osnovi drveća kokičarka može da raste direktno iz zemljišta što ukazuje na brojne mehanizme adaptacije uslovima okoline u kojoj se razvija.



Izvor: <http://www.medicalmushrooms.net>

Slika 5. Karpofor gljive *Sparassis crispa*

Dvodimenzionalnom-gel elektroforezom dokazano je da ova gljiva poseduje 77 različitih proteina (Horie et al., 2008). Osim proteina otkriveno je i prisustvo specifičnog enzima-alkalofilne esteraze (Chandrasekaran et al., 2011). Istraživanje Nowacka i saradnika (2014) pokazalo je da je sadržaj fenolnih jedinjenja kod ove gljive relativno nizak (3.25 mg GAE/g ekstrakta) u poređenju sa drugim vrstama. U pogledu sposobnosti hvatanja DPPH radikala *S. crispa* spada u umereno jake antioksidanse, čija je IC_{50} vrednost manja od 50 mg/ml (Nowacka et al., 2014). Ista grupa autora ispitivala je i antimikrobnu aktivnost većeg broja različitih vrsta gljiva, među kojima i *S. crispa*. Pokazalo se da je aktivnija prema Gram pozitivnim vrstama bakterija, uz vrlo visoku antibakterijsku vrednost koja je izražena kao odnos minimalne inhibitorne koncentracije i minimalne baktericidne koncentracije (R); ova vrednost kretala se od 1 do 4, a u slučaju kokičarke varirala je zavisno od bakterijske vrste. Tako je prema *Escherichia coli* R vrednost iznosila 1, a za *Micrococcus luteus* 4.

Karakterizacijom pomoću nuklearne magnetne rezonance utvrđeno je da *S. crispa* poseduje β -glukan čiju osnovu čini (1 \rightarrow 3)- β -D-glukan sa (1 \rightarrow 6)- β -D-glikozidnim grananjem na svake tri jedinice u osnovnom lancu. Testirana je sposobnost ovog glukana da indukuje produkciju citokina od strane dendritskih ćelija, i potom upoređena sa glukansom izolovanim iz gljive *Schizophyllum commune* (SPG). SPG nije pokazao ispitivanu sposobnost (Tada et al., 2007). U radu Kim i saradnika (2010) identifikovan je isti glukan i označen kao "sparan", za koji je utvrđeno da ima antitumorno dejstvo. Efekat se ispoljava kroz regulaciju imunog odgovora, tačnije preko stimulacije interleukina-12 (IL-12), interleukina-1 β (IL-1 β), faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i interferona α i β (IFN- α/β), interleukina-2 (IL-2), proliferaciju alogernih T ćelija i smanjenje endocitoze (Kim et al., 2010). Utvrđeno je da *S. crispa* ima i sposobnost dejstva na angiotenzin-konvertujući enzim (ACE) te kao takva ima potencijal kao regulator krvnog pritiska (Lee et al., 2013).

2.5. Biološka aktivnost i bioaktivna jedinjenja gljiva

Prema Mosby-jevom medicinskom rečniku biološka aktivnost se definiše kao sposobnost neke supstance da izmeni jednu ili više funkcija ćelija, tkiva, organa ili organizma. Biološka aktivnost neke supstance nije određena samo njenom fizičko-hemijskom strukturom već i koncentracijom i vremenom kontakta, tj. izlaganja. Može se javiti i domino efekat pri čemu promena jedne funkcije remeti normalnu aktivnost jedne ili više drugih funkcija (Mosby, 2009).

Svaka supstanca u prirodi ispoljava određenu biološku aktivnost kada se unese u organizam. Ipak, u naučnim krugovima ova definicija se posmatra u užem smislu, odnosno kao pozitivan/stimulišući efekat. Kod gljivasu zabeležene brojne medicinske funkcije, mada gljive nalaze primenu i u kozmetičkoj industriji, ali i kao funkcionalna hrana što je posledica upravo ispoljavanjabrojnih bioloških efekata (Wasser, 2011). Antitumorno, antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, imunomodulatorno, antidijabetetsko, antiparazitsko, kardiovaskularno, antioksidativno, hepatoprotektivno, detoksikativno dejstvo, snižavanje holesterola samo su neki od efekata zapaženih kod gljiva (Wasser,

2011). Intenzitet delovanja uslovljen je vrstom aktivnog molekula, njegovom fizičko-hemijskom strukturom, dozom, načinom pripreme i unošenja.

Utvrđeno je da su aktivne komponente mahom velikih molekulskih masa, od 100 000 do 0.5 miliona Da. Kao takve ne mogu se sintetisati, pa su istraživanja u sve većoj meri orijentisana ka ispitivanju jedinjenja malih molekulskih masa, a koja bi mogla da utiču na apoptozu, angiogenezu, metastazu, regulaciju ćelijskog ciklusa i prenos transdukcionog signala (Wasser, 2011).

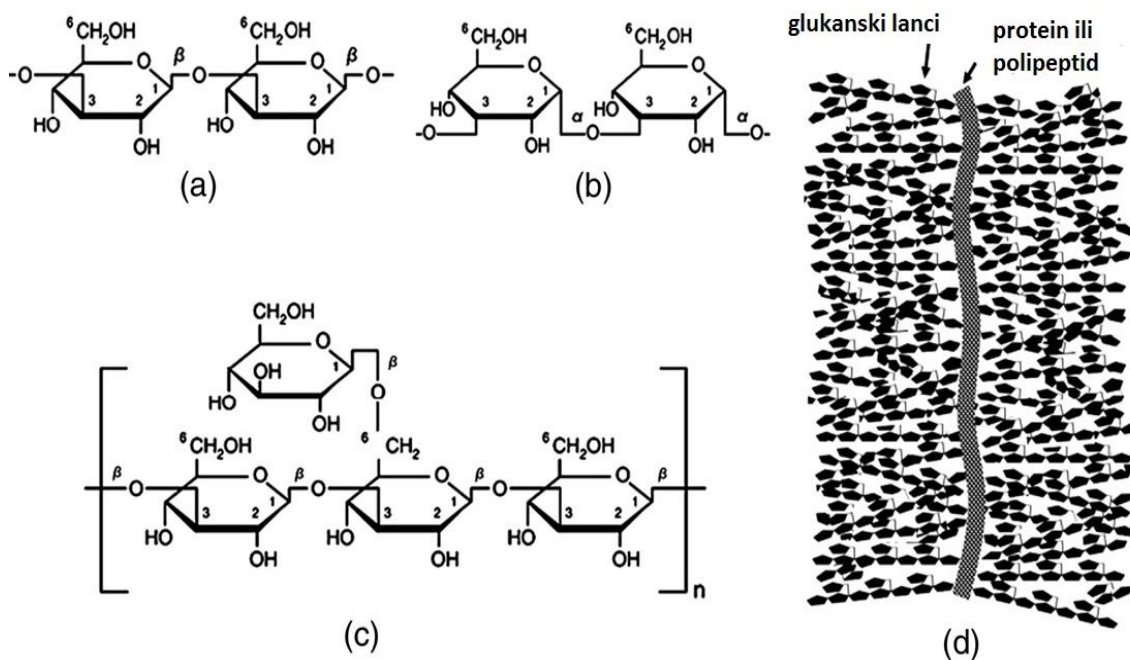
U biološki aktivne komponente gljiva spadaju: polisaharidi, proteini, polifenolna jedinjenja, kompleksi polisaharida i proteina, terpenoidi, steroidi, masne kiseline, organski germanijum, nukleotidi, poliacetilenske komponente i pigmenti (Moradali et al., 2007; Grienke et al., 2014).

2.5.1. Polisaharidi gljiva

Gljive sadrže različite polisaharide poput hitina, hitozana, glukana i heteroglikana. Glukani gljiva mogu imati različit hemijski sastav pa su tako prisutni α -glukani, β -glukani i hetero-glukani. Pored ovih polimera nalaze se takodje i mnogi heteropolisaharidi. β -glukani se sastoje isključivo od monomera glukoze dok hetero- β -glukani poseduju osnovni lanac, koji se sastoji od glukoznih ostataka, i bočne nizove izgrađene od različitih monosaharida (glukoza, galaktoza, manozna, ksiloza, arabinoza, fukoza, riboza ili glukuronska kiselina). Kod glikana se u osnovnom nizu javljaju i drugi šećeri. Oni se mogu klasifikovati kao galaktani, ksilani, fukani i manani. Heteroglikani imaju i bočne nizove izgrađene od drugih šećera (Björndal i Lindberg, 1970; Wasser, 2002; De Silva et al., 2012; Grienke et al., 2014).

Osnovni niz β -D-glukana čine monomeri glukoze povezani β -glikozidnim vezama. Ugljenikov atom čija se $-OH$ grupa na C-1 molekulu glukoze nalazi u β -položaju može se vezati preko $-OH$ grupe na C-3, uz izdvajanje H_2O , čime se formira (1 \rightarrow 3)- β -glikozidna veza, zatim sa $-OH$ grupom na C-4 pa nastaje (1 \rightarrow 4)- β -glikozidna veza, ili sa $-OH$ grupom na C-6 drugog molekula glukoze, te se dobija (1 \rightarrow 6)- β -glikozidna veza (Slika 6.). Kada se

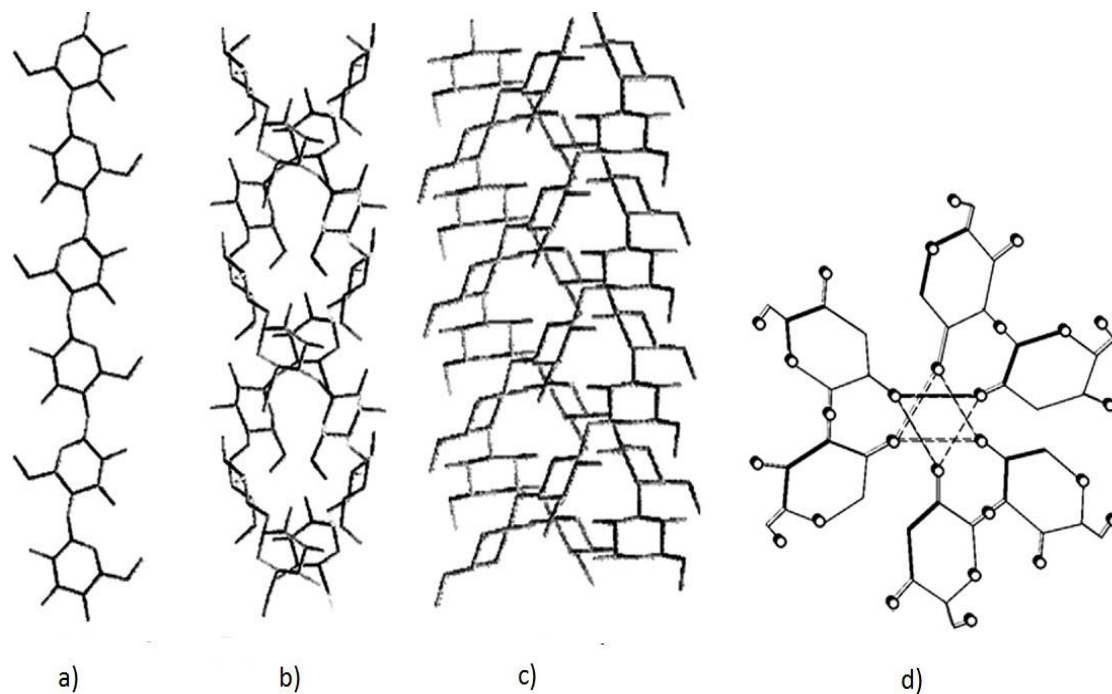
β -glukani nađu u vodenoj sredini zauzimaju različite konformacije kao što je jednostruki heliks, trostruki heliks, ali i brojne nasumične konformacije. Utvrđeno je da je konformacija ovih makromolekula jedan od faktora koji utiču na sposobnost imunomodulacije (De Silva et al., 2012). U osnovnom linearnom nizu mogu biti prisutne samo (1 \rightarrow 3)- ili samo (1 \rightarrow 4)-veze ili smeša oba tipa veze, dok je kod bočnih nizova najčešće prisutna (1 \rightarrow 6)-veza.



Slika 6. Prikaz molekularne strukture a) β -(1 \rightarrow 3)-D-glukana, b) α -(1 \rightarrow 3)-d-glukana, c) β -(1 \rightarrow 3)-D-glukan sa bočnim grananjem preko položaja O-6, d) kompleks polisaharida i peptida/proteina (Moradali et al., 2007).

Navodi se da je bioaktivnost β -glukana uslovljena monosaharidnim sastavom, konfiguracijom, tipom glikozidnih veza, sekvencama monosaharida, prirodom, brojem i mestom vezanih neugljenohidratnih grupa (Da Silva et al., 2012). Visoko razgranati glukani tipični su za vreli vodeni ekstrakt, dok se kod alkalnih ekstrakata javljaju linearani polisaharidi (Synytsya i Novak, 2013). Uobičajena struktura koja podrazumeva osnovni niz sa (1 \rightarrow 3)- β -D-glikozidnom vezom i bočni sa (1 \rightarrow 6)- β -D-glikozidnom vezom primećena je kod mnogih gljiva; ovakav tip veza prisutan je kod lentinana, grifolana, šizofilana i

skleroglukana. Glukan izolovan iz gljive *S. crista* takođe ima ovaj tip veze (Synytsya i Novak, 2013).



Slika 7. Prikaz helikoidne strukture β -glukana. a) jednostruki heliks b) dvostruki heliks c) trostruki heliks d) segment iz strukture trostrukog heliksa (Moradali et al., 2007).

Do skoro se smatralo da su biološki najefikasniji glukani kod kojih je u osnovnom nizu prisutna (1 \rightarrow 3)- β -D-glikozidna veza uz nepravilno učestale bočne nizove sa (1 \rightarrow 6)- β -D-glikozidnom vezom. Antitumorno delovanje objašnjavalo se velikom molekulskom masom, konformacijom trostrukog heliksa (Slika 7.) sa desnim uvijanjem, kao i potencijalnim prisustvom hidrofilnih grupa na spoljnoj strani heliksa (Moradali et al., 2007). Najjače antitumorno dejstvo pokazali su glukani kod kojih je stepen grananja 0.2-0.3, kao što su lentinan i šizofilan. Drugo viđenje je da su najefikasniji glukani kod kojih je stepen grananja ili vrlo nizak ili veoma visok. Takođe, bilo je prisutno i mišljenje da su najaktivniji glukani sa konformacijom trostrukog heliksa (Wasser, 2002). Ipak, istraživanja su pokazala da i druge konformacije pokazuju jednako izraženu aktivnost-npr. alkalni

ekstrakti kod kojih usled agresivnog postupka ekstrakcije dolazi do razaranja helikoidne strukture.

U nekim slučajevima je antitumorno dejstvo u direktnoj vezi sa molekulskom masom: što je veća to je efekat jači. Ipak to nije slučaj kod gljiva sa želatinoznim plodonosnim telom (Wasser, 2002). Stoga je novo mišljenje da za biološku aktivnost, naročito heteroglukana, nije neophodna velika molekulska masa (Synytsya i Novak, 2013).

Od svih makromolekula polisaharidi imaju najizraženiji biološki potencijal, što je rezultat velike strukturne varijabilnosti. Naime, 4 monomerna šećera daju 35 560 jedinstvenih tetrasaharida, dok 4 amino kiseline dozvoljavaju samo 24 različite permutacije (Rowan et al., 2002). Nukleotidi koji grade nukleinske kiseline i aminokiseline koje grade proteine mogu se povezivati samo na jedan način što kod polisaharida nije slučaj (Wasser, 2002). Ovakva mogućnost čini polisaharide veoma fleksibilnim što je od ključne važnosti za imunoregulaciju.

Glukani prevashodno deluju kao imunomodulatori i to izazivajući nespecifičan imuni odgovor te aktivirajući brojne tipove imunih ćelija (makrofage, monocite, neutrofile, dendritske ćelije, NK-ćelije, citokine) (Song i Du, 2012). U slučaju antitumornog dejstva efekat se ostvaruje prevencijom onkogeneze, metastaza, direktno i kroz jačanje imuniteta (Wasser, 2002).

Polisaharidi gljiva su poznati i pod nazivom modifikatori biološkog odgovora, engleski: biological response modifiers (BRM's). Nemaju neželjene efekte niti čine dodatni stres organizmu, istovremeno pomažući telu da se adaptira na stres biološke prirode ili iz okoline, ispoljavaju nespecifično dejstvo kroz podršku nekim ili svim sistemima (nervnom, imunom i hormonskom). Takođe deluju i kao regulatori imunog sistema (Wasser, 2002). Konkretni efekat zavisi od načina unosa, doze, učestalosti unošenja, mehanizma delovanja i mesta delovanja (Moradali et al., 2007).

Osim navedenih polisaharidi gljiva ispoljavaju i antivirusno, antiinflamatorno, antioksidativno i hipoglikemijsko dejstvo (Grienke et al., 2014).

2.5.2. Mehanizam delovanja polisaharida gljiva

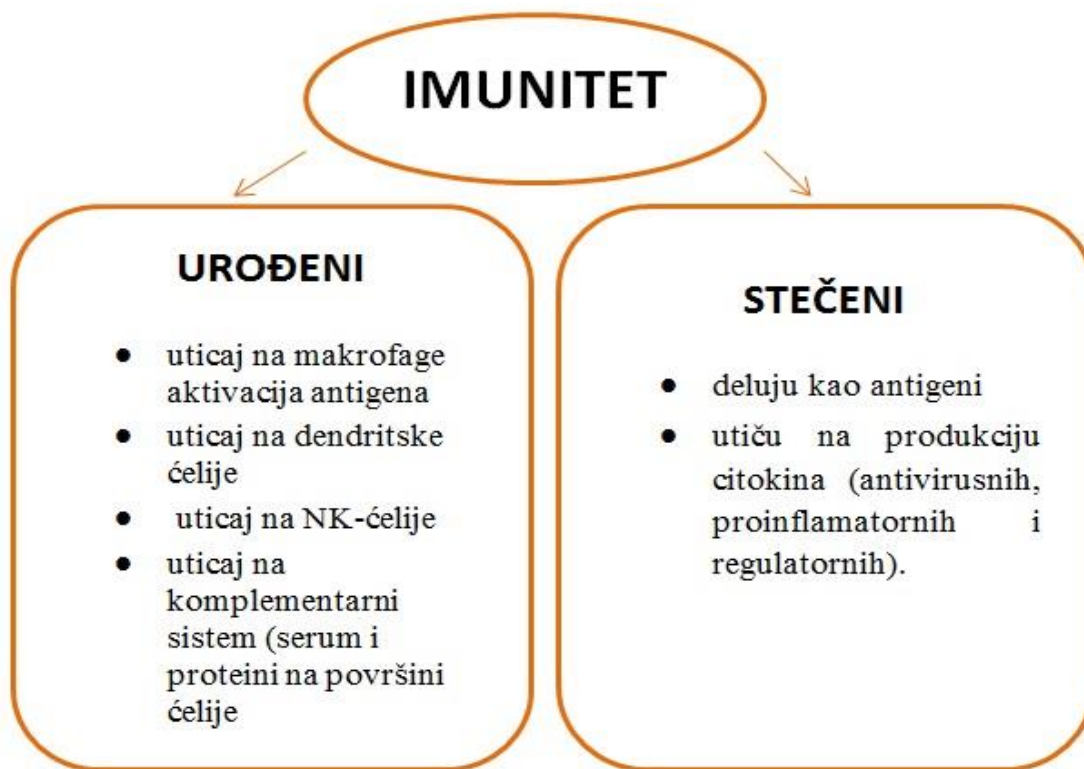
Polisaharidi gljiva prvenstveno vrše modifikaciju biološkog odgovora, tj. deluju imunomodulatorno, a ređe ispoljavaju i citotoksičnost. Odbrana čovekovog organizma zasnovana je na imunom sistemu, koji može biti urođeni i stečeni (Slika 8.). Oba deluju preko niza specifičnih ćelija i hemijskih nosilaca informacija-citokina. Organizam nikad ne poseduje dovoljno odbrambenih ćelija, ali posredstvom citokina reguliše reakciju na konkretan problem bilo preko produkcije dodatnih makrofaga, dovođenja fagocita, citokina ili leukocita. Postoji više tipova citokina: interleukini (IL), interferoni (INFs), tumor nekrozni faktori (TNFs), hemokini, faktori rasta i kolonija-stimulišući faktori (CSF).

Kako β -glukani deluju na ljudski organizam? Čovek ne može da sintetiše β -glukane te ih imuni sistem doživljava kao strane molekule, što za posledicu ima indukciju reakcije kako urođenog tako i stečenog imunog sistema (Sari et al., 2017). Smatra se da polisaharidi gljiva imaju sposobnost modulacije odgovora najrazličitijih imunih ćelija zahvaljujući strukturnoj varijabilnosti (Rowan et al., 2002).

Dokazano je da se β -glukani gljiva specifično vezuju za iC3b-receptore (CR3 i CD11b/CD18) na imunim ćelijama tipa fagocita i urođeno ubilačkim ćelijama (NK-ćelije). Receptor CR3 smatra se možda i jedinim receptorom za β -glukane kod miševa i ljudi (Rowan et al., 2002; Zong et al., 2012).

Tumor predstavlja nekontrolisanu proliferaciju ćelija koje zatim napadaju okolna tkiva i metastaziraju u drugim organima. Javlja se kao posledica mutacija hromozomalne DNK normalnih ćelija (Zong et al., 2012). Mutacije mogu biti izazvane spoljnim i unutrašnjim faktorima. Mutirana ćelija odvaja se od osnovnog limfoma i putem krvi dospeva do udaljenih tkiva gde zatim vrši invaziju na zdrave ćelije. Smatra se da je glavni razlog rezistentnosti ćelija raka na postojeće vidove lečenja, tj. na hemoterapeutike, sposobnost ćelijske promene-prilagodljivost. Kao glavni mehanizam adaptacije ćelija tumora označen je nuklearni faktor kapa B (NF-kB). U pitanju je proteinski dimer koji kada nije uparen dovodi do proliferacije, inhibicije apoptoze, povećanja metastaza i angiogeneze. Antikancerogeni efekat polisaharida prvi put je registrovan 1946. godine ispoljava se kroz

interferenciju nekoliko signal-transdukcionih puteva neophodnih za onkogenezu (De Silva et al., 2012; Zong et al., 2012). Do sada je identifikovano 7 gljiva (Basidiomycetes) koje mogu da poremete NF-kB put koji je jedan od ključnih za razvoj kancera. *Phellinus linteus* sintetiše penetil-estar i kafa-kiseline čime reguliše vezivanje NF-kB za DNK. Osim toga, β -glukani omogućavaju da se prevaziđe prirodna rezistentnost tumorskih ćelija na citotoksični efekat fagocita i NK-ćelija (Moradali et al., 2007). Uočeno je da *F. fomentarius* ima sposobnost inhibicije NF-kB aktivnosti (Park et al., 2004; Petrova et al., 2007). Poznato je i da jedinjenja polisaharidne prirode stimulišu fagocitozu (Shamtsyan et al., 2004). Ispitivanjem gljive *Ganoderma lucidum* uočeno je pojačano citotoksično dejstvo NK-ćelija, te oslobađanje TNF- α iz makrofaga i interferon- γ iz limfocita (De Silva et al., 2012).



Slika8. Uticaj polisaharida gljiva na imunitet

Smatra da β -glukani utiču na urođeni i stečeni imunitet (De Silva et al., 2012). Studije na životinjama su pokazale da β -glukani brzo stižu do tankog creva gde ih prihvataju makrofagi; zatim bivaju podeljeni na manje frakcije te nošeni do koštane srži

gde se ove male frakcije oslobađaju. Granulociti, monociti i dendritske ćelije ih preuzimaju čime se indukuje prirodni imuni odgovor (De Silva et al., 2012).

Uočeno je da polisaharidi imaju veću efikasnost ukoliko se unose intravenozno, dok je efekat po oralnom unosu slabiji ili potpuno izostaje. U slučaju studije sa *Agaricus blazei*, čije je antitumorno dejstvo testirano na miševima, utvrđeno je da aktivno jedinjenje β -1,6-glukan ispoljava antitumorno dejstvo samo ako je unesen intravenozno (Fujimiya et al., 2000). Ipak, oralna administracija je pacijentu ugodnija, a ne zahteva ni obučeno osoblje pa je to i najčešći vid unosa.

2.5.3. Ostala bioaktivna jedinjenja iz gljiva

Osim polisaharida gljive poseduju i druga jedinjenja koja ispoljavaju biološku aktivnost. Ona su podeljena na jedinjenja velike i male molekulske mase. U jedinjenja velike molekulske mase spadaju polisaharidi, kompleksi polisaharida i proteina kao i proteini. Ovi molekuli su primarni produkti metabolizma i sastavni deo micelijuma i plodonosnog tela gljiva.

Među proteinima se izdvaja nekoliko od posebnog značaja: lektini koji imaju sposobnost vezivanja za polisaharide ćelijske membrane a ispoljavaju i antiproliferativno i antitumorno dejstvo, ribozom-inaktivirajući proteini (RIPs) koji ispoljavaju enzimsku aktivnost što za posledicu ima supresiju ribozoma i imunomodulatorni proteini gljiva (FIPs) koji nose nazive po imenima gljiva iz kojih su izolovani (De Silva et al., 2012). Zabeleženo je da ispoljavaju antitumorno, antivirusno, antimikrobno, antioksidativno i imunomodulatorsko dejstvo (Grienke et al., 2014).

U komplekse polisaharida i proteina spadaju glikoproteini, glikopeptidi i proteoglukani. Glikoproteini sadrže oligosaharidni lanac koji je kovalentno vezan za polipeptidne bočne nizove. Proteoglukani su proteini sa jednim ili više kovalentno vezanih lanaca glukozamin-glukana sa visokim stepenom glikozilacije. Tipičan glikopeptid je

krestin izolovan iz gljive *Trametes versicolor* koji deluje kao imunostimulator (De Silva et al., 2012; Grienke et al., 2014).

Bioaktivni molekuli malih molekulskih masa su mahom sekundarni metaboliti. Tu spadaju triterpeni, organske kiseline i njima srodna jedinjenja, isparljiva jedinjenja, polifenolna jedinjenja, steroli. Sekundarni metaboliti ispoljavaju antiinflamatorno, citotoksično, antimikrobno, antioksidativno i antitrombno dejstvo (Grienke et al., 2014). Izdvajaju se polifenolni pigmenti kao što je hispidin, izolovan iz plodonosnog tela *Innonotus hispidus*, ili hispolon iz plodonosnog tela *Phellinus linteus*, koji indukuju apoptozu u ćelijama raka želuca. Uz to deluju i kao antimetastazni agensi (De Silva et al., 2012).

2.6. Hemijske modifikacije ekstrakata gljiva

Biološka svojstva ekstrakata gljiva rezultat su hemijske strukture, u prvom redu polisaharida, tj. β -glukana. Brojna istraživanja su potvrdila da efikasnost ovih molekula zavisi od višestruktturnih činilaca (Wasser, 2002; Moradali et al., 2007; De Silva et al., 2012). Podaci o vezi između fizičko-hemijskih osobina i aktivnosti glukana su brojni, ali i kontradiktorni. Najefikasnijima su smatrani razgranati β -glukani da bi kasnije bilo utvrđeno da i linearni glukani ispoljavaju jaku biološku aktivnost. Takođe, opovrgnuto je i mišljenje da je za biološku aktivnost zaslužna isključivo konformacija trostrukog heliksa. U slučaju alkalnih ekstrakata, navedena konformacija je razorena načinom ekstrakcije a biološka svojstva su ipak zadržana (Synytsya i Novak, 2013).

Polisaharidi gljiva su veliki molekuli zbog čega ne mogu da prođu kroz ćelijsku membranu, te je njihovo delovanje posredno i preko sistema ćelijskih receptora. β -glukani su pretežno slabo rastvorni ili nerastvorni u vodi što ograničava njihov efekat i čini ih nepogodnim za medicinsku primenu. Promenom ove osobine povećava se i upotrebna vrednost β -glukana. Tako je otkriveno da je fosforilovani glukan izolovan iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae* dobar promotor zarastanja rana, profilaktik i terapeutik protiv bakterija, virusa, gljiva i parazita (Zhu et al., 2016). Rastvorljivost u vodi je ključni

parametar za antitumornu i antioksidativnu aktivnost β -glukana (Moradali et al., 2007). Novija istraživanja pokazuju da se biološki odgovor ekstrakata gljiva može regulisati/poboljšati različitim tipovima modifikacija.

Hemijske modifikacije uključuju karboksimetilovanje, sulfonovanje i fosforilaciju. Primenjuju se i enzimski tretmani amilazom, celulazom i proteazom. Zhang i saradnici (2014) su vršili acetilaciju i karboksimetilaciju ekstrakata *Ganoderma atrum*. Tom prilikom primećeno je da uzorci imaju niži sadržaj šećera i da su molekulske mase polisaharida niže. Posmatrana je i antioksidativna sposobnost pri čemu rezultati nisu bili uniformni, odnosno nije se moglo reći da određena hemijska modifikacija ima samo pozitivne ili samo negativne rezultate. Posledice su bile kompleksnije; slabo acetilovani uzorci su imali nižu sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala u odnosu na sirovi ekstrakt, dok je povećanje stepena metilacije rezultovalo povećanjem sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala u odnosu na sirovi ekstrakt. To je protumačeno promenom polarnosti, konformacije i gustine naelektrisanja (Zhang et al., 2014). Utvrđeno je i da hidroksilne grupe polisaharida mogu imati važnu ulogu u očuvanju sposobnosti doniranja vodonika. Pokazalo se i da nije samo gustina naelektrisanja presudna za konkretnu biološku aktivnost već i hemijske osobine funkcionalnih grupa. Imunostimulatorno dejstvo je u ovom slučaju pojačano primenom hemijskih modifikacija. Hemijska modifikacija β -(1 \rightarrow 3)-glukana gljive *A. auricula-judaek* kontrolisanom perjodatnom oksidacijom, borhidridnom redukcijom i blagom kiselom hidrolizom dovela je do povećanja rastvorljivosti u vodi i poboljšanja antitumorne aktivnosti (Moradali et al., 2007). Jaća antitumorna aktivnost postignuta je i hemijskom modifikacijom polisaharida gljive *Grifola frondosa*. Dva od četiri izolovana polisaharida pokazala su delovanje tek nakon modifikacije. Smatra se da je tretman doveo do izmene ili uklanjanja bočnih nizova, a to je uzrokovalo bolju rastvorljivost i aktivnost (Wasser, 2002).

Antioksidativna sposobnost ekstrakata gljiva u vezi je i sa molekulskom masom, pa tako niža molekulska masaverovatno uzrokuje bolju rastvorljivost što za posledicu ima jaću antioksidativnu sposobnost (Zhang et al., 2014).

Pri enzimskim modifikacijama dolazi do eliminacije bočnih nizova glukana, te se dobijaju linearni molekuli niže molekulske mase koji pokazuju imunomodulatorsku i antitumornu aktivnost (Moradali et al., 2007).

2.7. Gljive-funkcionalna hrana, nutriceutici, lekovi ili suplementi u ishrani?

Funkcionalna hrana je bilo koja hrana ili komponenta hrane za koju se i naučno dokazalo da ima dobro fiziološko i zdravstveno dejstvo ili redukuje rizik od hroničnih bolesti, uz osnovna nutritivna svojstva. Konzumira se kao regularna hrana, ali za cilj ima unapređenje zdravlja ili njegovo održavanje (Rowan et al., 2002; Wetzal et al., 2006). Ovi proizvodi su deo tržišta konvencionalne hrane za razliku od nutriceutika koji su deo farmaceutskog tržišta. Stroga regulativa koja se odnosi na plasman nutriceutika neretko opredeljuje proizvođača da svoj proizvod klasifikuje kao funkcionalnu hranu.

Nutriceuticima na bazi gljiva se smatra delimično ili potpuno prečišćen ekstrakt micelijuma ili plodonosnog tela gljive koji se uzima u formi tableta ili kapsula; uzima se kao dijetetski suplement, a ne kao hrana i poseduje potencijalne terapijske aplikacije (Wasser, 2011). Time se jasno odvajaju od funkcionalne hrane, dizajnirane hrane i lekova. Ovo tržište je 1999. godine bilo vredno 15 milijardi dolara, i činilo je 10% od celokupnog tržišta dijetetskih suplemenata. 2003. godine vrednost mu se povećala na 6 milijardi dolara (Wetzal et al., 2006).

Prema regulativi američke agencije za hranu i lekove (Dietary Supplement Health and Education Act, 1994) dijetetski suplement je supstanca koja se koristi kao dodatak ishrani, a uvećava ukupan dijetetski unos; unosi se u formi kapsule, praha, gela, gel kapsule i nije konvencionalna hrana niti zaseban deo jela ili ishrane. Prema domaćem važećem pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, član 2., dodaci ishrani (dijetetski suplementi) su namirnice koje dopunjuju normalnu ishranu i predstavljaju koncentrovane izvore vitamina, minerala ili drugih supstanci sa hranljivim ili fiziološkim efektom, pojedinačno ili u kombinaciji, a u prometu su u doziranim oblicima dizajnirane da

se uzimaju u odmerenim pojedinačnim količinama (kapsule, tablete, kesice praška, ampule tečnosti, bočice za doziranje u kapima i drugo) (<http://www.overa.rs>).

Mogućnost primene gljiva u formi lekova se intenzivno istražuje. Mnoge su u fazi kliničkih ispitivanja, najčešće kao dopuna konvencionalnim terapijama. Navodi se da je 47% lekova za lečenje kancera dobijeno iz prirodnih izvora (De Silva et al., 2012). Postoje i komercijalni polisaharidi izolovani iz gljiva, poput lentinana i šizofilana, kao i drugi molekuli poreklom iz gljiva: peptidoglukani (krestin) i različite polisaharidne frakcije. Klinička ispitivanja se sprovode u Kini, Japanu, nekim evropskim zemljama i Sjedinjenim Američkim Državama. Ovo nije samo posledica entuzijazma već i ogromnog tržišta obolelih, naročito od raka. Njihovo izlečenje primenom sredstava na bazi gljiva nije prioritet koliko je to poboljšanje kvaliteta života (De Silva et al., 2012). Problem u domenu proizvodnje lekova na bazi gljiva jeste složenost bioaktivnih molekula, te nemogućnost sintetisanja. Osim toga, gotovo je nemoguće ostvariti ujednačen kvalitet sirovine.

Na osnovu postojećih definicija može se zaključiti da ne postoji jasna granica između pojedinih kategorija, naročito dijetetskih suplemenata i nutriceutika. Šire posmatrano gljive poseduju značajnu nutritivnu vrednost, ali zadovoljavaju i zahteve funkcionalne hrane. Problem je kompleksna zakonska regulativa i nedostatak jasnih zaključaka baziranih na istraživanjima koji bi omogućili da se gljive istovremeno i nesmetano koriste kao sirovina za svaku od kategorija. Još jedna prepreka intenzivnoj upotrebi i širenju ovog tržišta je i svest potrošača koji funkcionalnu hranu vezuju za lekove ili postojanje nekog zdravstvenog problema ili uopšte nisu informisani o pojmu funkcionalne hrane (Annunziata i Vecchio, 2011).

3. CILJEVI RADA

Funkcionalna hrana je jedan od najdinamičnijih i najbrže rastućih segmenata prehrambene industrije. Nepostojanje preciznih zakona u sferi sirovina koje ispoljavaju funkcionalna svojstva čini ove proizvode prilagodljivim i drugim tržištima kao što su tržište lekova, nutriceutika i dijetetskih suplemenata. Medicinske gljive su upravo takva sirovina. Istraživanja u ovoj oblasti su intenzivna a rezultati obećavajući. Ipak, varijabilnost u pogledu fizičko-hemijskih i bioloških osobina gljiva jedna je od najvećih u prirodi. Sve to čini medicinski značajne gljive atraktivnim i još uvek nedeovoljno istraženim. Biološke osobine su od naročito značaja jer od njih zavisi konkretna primena neke vrste. Izražena antioksidativna aktivnost neke gljive čini je pogodnom kao dodatak prehrambenim proizvodima ili kao samostalan suplement u ishrani, dok jako antitumorno ili imunomodulatorsko dejstvo usmeravaju iskorišćenje ka farmaceutskom sektoru. Do sada ustanovljeni biološki efekti jedinjenja gljiva zavise od brojnih faktora fizičko-hemijske prirode, na koje direktno, osim vrste gljive, utiče i način ekstrakcije. Tako su brojna istraživanja uključivala hemijske modifikacije dobijenih ekstrakata, a samo neke od njih su imale pozitivan efekat, odnosno jače biološko delovanje na taj način izmenjenih ekstrakata.

Enzimске modifikacije predstavljaju jedan vid hemijskih modifikacija. Iako se navode u literaturi kao jedan od načina da se utiče na biološke osobine ekstrakata gljiva, enzimске modifikacije su slabo ispitivane i gotovo da nema podataka koji su rezultat ovakvih tretmana. Stoga je opšti cilj ovog rada bio enzimsko modifikovanje tri tipa ekstrakta odabranih medicinski značajnih gljiva (*Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*).

Osim toga, definisani su i posebni ciljevi koji proizilaze iz sprovedene modifikacije:

- Priprema sirovog vodenog, alkalnog i dijalizovanog vodenog ekstrakta gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*;
- Enzimska modifikacija sirovog vodenog, alkalnog i dijalizovanog ekstrakta navedenih gljiva;

- Hemijska karakterizacija sirovih polisaharidnih ekstrakta kao i enzimski modifikovanih ekstrakata;
- FT-IR spektroskopija da bi se dobio detaljniji i precizniji uvid u hemijsku strukturu ekstrakata i ispitao efekat modifikacije primenom enzima;
- Ispitivanje bioloških svojstava dobijenih polisaharidnih ekstrakta obe grupe (osnovnih i enzimski modifikovanih);
- U okviru ispitivanja bioloških svojstava ekstrakata planirano je testiranje antioksidativne sposobnosti pomoću 5 metoda (hvatanje slobodnih DPPH radikala, antioksidativna aktivnost, sposobnost redukcije jona Fe^{3+} , sposobnost heliranja jona gvožđa i sposobnost redukcije jona bakra, tj. CUPRAC metoda) i
- Utvrđivanje antimikrobne aktivnosti primenom 3 metode (disk difuzioni metod, mikro i makrodilucioni metod);
- Ispitivanje sposobnosti ekstrakata da vrše inhibiciju angiotenzin I-konvertujućeg enzima (ACE)
- Provera citotoksičnosti ekstrakata primenom 3 različite tumorske ćelijske linije (HeLa, K562, MDA-MB-453).
- Poređenje bioloških osobina obe grupe ekstrakata i dovođenje u vezu uočenih efekata i hemijske strukture, tj. utvrđivanje uticaja primenjenog enzimskog tretmana na biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata ispitivanih gljiva.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Gljive korišćene u radu

Za pripremu ekstrakata ispitivanih u ovom radu korišćene su gljive:

- ❖ *Fomes fomentarius*, autohtoni izolat iz prirodnog staništa. Plodonosna tela su sakupljena na lokalitetu planine Goč, Srbija, sa stabla bukve, u avgustu 2010. godine.
- ❖ *Auricularia auricula-judae*, osušeni karpofori, poreklom iz Kine; komercijalno dostupni, industrijski proizvedeni 2010. godine.
- ❖ *Sparassis crispa*, osušeni karpofori, poreklom iz Kine; komercijalno dostupni, industrijski proizvedeni 2010. godine.

Identifikacija plodonosnih tela korišćenih gljiva je obavljena pomoću ključa za identifikaciju (Breitenbach and Kränzlin, 1986). Karpofor gljive *F. fomentarius* je očišćen od komadića stabla, osušen u sušnici na 40°C do konstantne mase, i samleven do finog praha, koji je do analiziranja čuvan na tamnom i hladnom mestu. Izolovana je i čista kultura iz plodonosnog tela gljive *F. fomentarius* i deponovana u kolekciji Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Karpofori gljiva *A. auricula-judae* i *S. crispa* su kupljeni u osušenom stanju. Nakon identifikacije vrste uz potvrdu sa deklaracije, samlevene su do finog praha i do analize čuvane na tamnom i hladnom mestu.

4.2. Priprema ekstrakata

4.2.1 Priprema polisaharidnih ekstrakata

Karpofori ispitivanih gljiva su samleveni u fini prah (100 g) koji je potom tretiran 96% etanolom, tokom 24 h, na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Na taj način uzorci su oslobođeni dela mono- i disaharida, oligosaharida, amino kiselina, lipida i dela fenolnih

jedinjenja (Klaus et al., 2013). Materijal je filtriran i osušen usušnici (24 h, na 42°C). Dobijen je suvi prah koji je dalje podvrgnut ekstrakciji u autoklavu (2 l Milli-Q vode (MQ), 45 min, na 121°C), nakon čega je izvršeno hlađenje i filtriranje. Filter pogača je dalje korišćena za alkalnu ekstrakciju, dok je supernatant koncentrovan do 10% početne zapremine. Precipitacija polisaharida je ostvarena dodatkom dva puta veće količine hladnog 96% etanola, preko noći. Materijal je zatim centrifugiran (20 min, 9000 obr), a dobijeni čvrsti deo je osušen u sušnici i fino usitnjen. Navedenim postupkom dobijen je vreli vodeni ekstrakt, sa oznakama FV (*F. fomentarius*), AV (*A. auricula-judae*) i SV (*S. crispa*).

Deo vrelih vodenih ekstrakata je dalje dijalizovan pomoću membrane ZelluTrans/Roth® 6.0 regenerated cellulose tubular membrane (MWCO: 8.000-10.000). Postupak dijalize je vršen u MQ vodi tokom 24 h, na sobnoj temperaturi, uz mešanje. Sadržaj membrane je centrifugiran i precipitiran dva puta većom količinom etanola, preko noći, u frižideru, te osušen u sušnici. Tako je dobijen delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, odnosno dijalizovani vodeni ekstrakt, oslobođen molekula malih molekulskih masa kao što su peptidi, polifenolna jedinjenja i manji polisaharidi (< 8-10 kD). Njihove oznake su: FP (*F. fomentarius*) i AP (*A. auricula-judae*).

Filter pogača dobijena prilikom pripreme vrelog vodenog ekstrakta je korišćena za dobijanje vrelog alkalnog ekstrakta. Ekstrakcija je vršena autoklaviranjem filter-pogače sa 2 l 1M rastvora NaOH, 45 min, na 121°C. Neutralizacija dobijenog ekstrakta je vršena koncentrovanom CH₃COOH do pH 7.0, a potom je vršeno centrifugiranje. Odvojen je supernatant i precipitiran etanolom, osušen u sušnici i usitnjen do finog praha. Sirovi alkalni ekstrakti nose oznake: FA (*F. fomentarius*), AA (*A. auricula-judae*) i SA (*S. crispa*). Svi ekstrakti su šuvani na 4°C.

4.2.2. Enzimaska modifikacija polisaharidnih ekstrakata

Postupak enzimske modifikacije polisaharidnih ekstrakata gljiva definisan je na osnovu nekoliko metoda (Harada et al., 1968; Misaki et al., 1985; Synytsya et al., 2009; Smiderle et al., 2011). Svaki od polisaharidnih ekstrakata (sirovi vodeni, alkalni i

dijalizovani vodeni ekstrakt) je podvrgnut enzimskoj modifikaciji. Odgovarajuća količina osušenog ekstrakta (500 mg) je rastvorena u 0.5 M NaOH, i 0.5 M HCl (u odnosu 1:1), a pH podešen na 3.5 pomoću 1M acetatnog pufera. Dodata je izoamilaza (EC 3.2.1.68, 1500 U/ml), 24 h, 37°C. Neposredno pre dodavanja narednog enzima pH je podešen na 5.0 5M Na-acetatom. Dodata je β -amilaza (EC 3.2.1.2, 200 U/ml), 24 h, 37°C. Materijal je dijalizovan (24 h) pomoću membrane korišćene i za dobijanje dijalizovanih vodenih ekstrakata. Uzorak je zatim liofilizovan a potom i rastvoren u 0.1 M Tris/HCl puferu (pH 6.0), tako da koncentracija uzorka bude 10 mg/ml, nakon čega je dodata α -amilaza (EC 3.2.1.1, 1U/ml), 24 h, 37°C. pH je podešen na 8.2 1M Tris/HCl puferom, te je dodata pronaza (EC 3.4.24, 1U/mg), 24 h, 37°C. Prethodno korišćeni enzimi su uklonjeni dodatkom pronaze. Reakcija je prekinuta u ključalom vodenom kupatilu, nakon čega je uzorak dijalizovan tokom 24 h, da bi se eliminisale aminokiseline i peptidi malih molekularnih masa koji potiču od enzima. Tako dobijeni uzorak je liofilizovan i čuvan na 4°C. Modifikovani ekstrakti su sa oznakama: MFV, MFP i MFA za ekstrakte dobijene modifikacijom sirovih polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius*, MAV, MAP i MAA za ekstrakte dobijene modifikacijom sirovih polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae*, i MSV i MSA za ekstrakte dobijene modifikacijom sirovih polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa*.

4.3. Hemijska karakterizacija ekstrakata

Hemijska karakterizacija polisaharidnih i enzimski modifikovanih ekstrakata je obavljena kombinovanjem instrumentalnih hemijskih metoda i enzimskog kita.

4.3.1. Analiza polisaharida

Polisaharidi su analizirani određivanjem ukupnih ugljenih hidrata, ukupnih glukana, kao i α i β -glukana, iFT-IR analizom. Primenom planarne hromatografije utvrđen je monosaharidni sastav ekstrakata.

4.3.1.1. Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata određen je fenol-sumpornom metodom (Du Bois et al., 1956). Različite koncentracije ispitivanih uzoraka pripremljene su rastvaranjem u MQvodi. Od svakog razblaženja je uzeto 200 μ l i dodato 200 μ l MQvode, 400 μ l 5% fenolnog reagensa i 2 ml koncentrovane H_2SO_4 . Uzorci su inkubirani 40 min na sobnoj temperaturi, te je merena apsorbanca na 490 nm (Shimadzu UV-1800, Japan). Kao standard je korišćena D-glukoza. Dobijene vrednosti su izražene u %.

4.3.1.2. Određivanje sadržaja ukupnih, α i β -glukana

Za određivanje sadržaja ukupnih i α -glukana u polisaharidnim ekstraktima, kao i u enzimski modifikovanim ekstraktima korišćen je specifični enzimski kit Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure K-YBGL 09/2009 (MegazymeInt., Wicklow, Ireland). Kit čine: egzo-1,3- β -glukanaza, β -glukozidaza, amiloglukozidaza, invertaza, reagens za determinaciju glukoze (GOPOD-glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) i standardni rastvor glukoze. Da bi se odredio sadržaj ukupnih glukana uzorci polisaharida su hidrolizovani sa 60% H_2SO_4 i posle neutralizacije sa 2 MKOH izvršena je hidroliza do glukoze uz pomoć mešavine egzo- β -(1 \rightarrow 3)-D-glukanaze i β -glukozidaze. Ukupni sadržaj glukana je određen dodavanjem glukoza oksidaza/peroksidaza reagensa. Apсорbanca rastvora je određena spektrofotometrijski na 510 nm (Shimadzu UV-1800, Japan). Sadržaj α -glukana je određen enzimskom hidrolizom sa mešavinom amiloglukozidaze i invertaze. Sadržaj β -glukana je dobijen kao razlika sadržaja ukupnih glukana i sadržaja α -glukana. Dobijene vrednosti su izražene kao % suve mase ekstrakta.

4.3.1.3. FT-IR analiza

FT-IR spektri su snimljeni na spektrofotometru BOHEM (Hartmann & Braun, Frankfurt, Germany), sa rezolucijom od 4 cm^{-1} . Spektri su snimljeni u opsegu $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ koristeći tehniku KBr diskova.

4.3.1.4. Planarna hromatografija kiselinskog hidrolizata polisaharidnih ekstrakata

Po oko 4 mg svakog uzorka stavljeno je zasebno u staklene ampule u koje je zatim dodato 3,0 ml 2M trifluorsirćetne kiseline (TFA). Ampule su zatopljene i hidroliza je rađena na $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ u toku 12 h. Posle hidrolize rastvori svakog uzorka su koncentrovani do suva ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$). Da bi se uklonili poslednji ostaci TFA, u hidrolizate je dodato po 5 ml izo-propil alkohola koji je zatim uparen do suva. Hidrolizovani uzorci su rastvoreni u maloj količini destilovane vode (oko $20\text{ }\mu\text{l}$) i analizirani planarnom hromatografijom (Chaplin i Kennedy 1987).

Papirna hromatografija (PC) hidrolizata polisaharidnih uzoraka rađena je silaznom tehnikom na papiru Whatman No.1 u sistemu razvijanja (v/v) etil-acetat-piridin-voda (10:4:3 v/v/v). Šećeri su detektovani izazivanjem sa srebro nitrat-natrijum hidroksidom. Kao standardi su korišćeni galakturonska kiselina, glukuronska kiselina, galaktoza, glukoza, manoza, fukoza, ksiloza, arabinoza, fruktoza i ramnoza.

4.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određen pomoću Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline kao standarda (Barrosetal, 2007). Svakom od ekstrakata (0.1 ml) dodato je 0.75 ml Folin-Ciocalteu reagensa (razblaženog 10 puta) i smeša je dobro promešana. Posle 5 min inkubiranja na sobnoj temperaturi smeši je dodato 0.75 ml 6% Na_2CO_3 , uz blago mešanje. Reakcija se odvijala 2 h u mraku, na sobnoj temperaturi, a apsorbancija je očitana

na 725 nm. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu vrednosti apsorbanci za različite koncentracije galne kiseline (0.01–0.1 mM). Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je određen na bazi kalibracione krive za galnu kiselinu i izražen kao % ekvivalenata galne kiseline (GAE) na suhu masu ekstrakta.

4.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Modifikovana metoda po Bradfordu (Kruger, 2002) je korišćena za određivanje sadržaja ukupnih proteina u uzorcima. Bradfordov reagens (5 ml) se dodaje uzorcima razblaženim do željene koncentracije nakon čega sledi inkubacija na sobnoj temperaturi, 5 min. Apsorbanca se očitava u toku 30 min na 595 nm. Sadržaj proteina u uzorcima je određen na osnovu kalibracione krive konstruisane za vrednosti apsorbanci različitih koncentracija albumina goveđeg seruma, BSA (Bovine Serum Albumin), a vrednosti su predstavljene u % (g/100 g uzorka).

4.4. Biološka svojstva ekstrakata

U cilju utvrđivanja bioloških svojstava ispitivanog materijala, testirana su antimikrobna, antioksidativna, antitumorna svojstva kao i sposobnost inhibicije angiotenzin-konvertujućeg enzima u *in vitro* uslovima.

4.4.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata

Antimikrobna svojstva ekstrakata gljiva ispitivana su pomoću tri metode, koje su primenjene nad 14 test mikroorganizama, od kojih je 10 bakterija (5 Gram pozitivnih i 7 Gram negativnih bakterijskih sojeva) i 2 kvasca. Testirani sojevi mikroorganizama čuvani su na kosom agaru, na +4°C i presejavani na dve nedelje. Pregled korišćenih sojeva i

podloga za njihovo održavanje dat je u Tabeli 1. Svako od merenja je ponovljeno tri puta, na osnovu čega je dobijena srednja vrednost merenja i odgovarajuća standardna devijacija.

4.4.1.2. Metod difuzije sa filter diskova

Polisaharidni i enzimski modifikovani polisaharidni ekstrakti ispitivanih gljiva su rastvoreni u vodi, a njihova koncentracija je iznosila 20 mg/ml. U cilju sterilizacije su propušteni kroz membranski filter (dimenzije pora 0.22 μm). Mikroorganizmi koji su korišćeni za isitivanje antimikrobnog delovanja su pripremljeni u odgovarajućem bujonu (Tabela 1.) i to 2 puta po 24 h, pri čemu je postignuta koncentracija od oko 1×10^7 CFU/mL. Zatim je suspenzija svake kulture mikroorganizama (100 μL) zasejana na odgovarajući agar. Po tri filter diska, prečnika 6 mm, su postavljena na površinu agara i potom natopljena sa po 50 μl suspenzije svakog od ekstrakata gljiva. Pripremljena je i pozitivna kontrola koju su činili diskovi natopljeni sa tetraciklinom koncentracije 30 $\mu\text{g/ml}$. Negativnu kontrolu su činili diskovi natopljeni sterilnom destilovanom vodom. Petri kutije su inkubirane 24 h na 37°C za bakterije i 72 h na 30°C za kvasce. Nakon inkubacije merena je zona inhibicije (mm).

4.4.1.1. Sojevi mikroorganizama

Tabela 1. Mikroorganizmi i podloge korišćene za njihovo gajenje*

mikroorganizam	bujon	agar
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	hranljivi bujon, Torlak	M 1468 Hi Crome Aureus Agar Base + FD 046
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	hranljivi bujon, Torlak	M 1044 Esculin Iron agar
<i>Bacillus cereus</i> 10876	hranljivi bujon, Torlak	M 833 Bacillus cereus Agar Base + FD 003 + FD 045
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	M 569 Listeria Enrichment Broth	Hi Crome Listeria Agar Base, modified + FD 181
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	hranljivi bujon, Torlak	M 1469 Hi Fluoro Pseudomonas Agar Base

<i>Escherichiacoli</i> 25922	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	M 052 A Selenite F Broth	M 1466 Hi Crome Improved Salmonella Agar
<i>Proteus hauseri</i> 13315	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Shigella sonnei</i> 29930	M 1326 Shigella Broth Base + FD 108	SS agar, Torlak
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	M 894 CAL Broth (Cellobiose Arginine Lysine Broth)	M 893 CAL Agar (Cellobiose Arginine Lysine Agar)
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	TSB-YE	Hi Crome EC O157:H7 Agar Base + FD 052
<i>Candida albicans</i> 24443	sladni bujon, Torlak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	sladni bujon, Trolak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar

* Mikroorganizmi korišćeni u ovom radu su poreklom iz američke kolekcije kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)

4.4.1.3. Makrodilucioni metod

Makrodilucioni metod (Klaus et al., 2015) je primenjen za praćenje kinetike rasta mikroorganizama u prisustvu ispitivanih ekstrakata. Sve kulture mikroorganizama su bile u liofilizovanom stanju pa je prvo izvršeno njihovo aktiviranje prenošenjem liofilizata bakterija na Mueller-Hinton bujon (MHB), odnosno liofilizata kvasaca na sladni bujon; bakterije su inkubirane 24 h na 37°C a kvasci na 30°C. Da bi se osigurala čistoća i vijabilnost kulture, ona je dva puta prebačena na odgovarajući bujon i inkubirana 24 h. Ostvarena je koncentracija od oko 1×10^7 CFU/ml. Kultura je potom pripremljena kao serija decimalnih razređenja, a iz razređenja od oko 10^5 CFU/ml je uzeto 150 μ l i preneto u odgovarajući bujon.

Ispitivani ekstrakti gljiva su odmereni i rastvoreni u 1 ml bujona koji je sadržao ispitivani mikroorganizam, koncentracije od oko 10^5 CFU/ml, tako da koncentracija ekstrakta bude 2.5 mg/ml. Od osnovnog razređenja pripremljena je serija razređenja: 100 μ l rastvora ekstrakta pomešanog sa ispitivanim mikroorganizmom je preneto u 900 μ l fiziološkog rastvora. Na opisani način su pripremljena razređenja u rasponu od 1:10 do

1:1000000. U Petri kutije sa izlivenim Mueller-Hinton agarom (MHA) (za bakterije) i sladnim agarom (za kvasce), je preneto 10 µl od svake ispitivane koncentracije, sve u triplikatom. Inokulacija je izvršena u nultom satu, i nakon 3, 6, 9 i 24 h. Zasejane kutije sa agarom su inkubirane 24 h na 37°C za bakterije i 48 h na 30°C za kvasce. Izvršeno je brojanje kolonija, a rezultat je izražen kao log₁₀cfu/ml. Slepu probu je predstavljala suspenzija mikroorganizama bez dodatog ekstrakta gljiva. Na opisani način ostvareno je praćenje kinetike rasta mikroorganizama u prisustvu ekstrakata testiranih gljiva, ali i uvid u mikrobistatičko kao i mikrobicidno dejstvo. Efekti su prikazani kao krive rasta u funkciji vremena inkubacije.

4.4.1.4. Mikrodilucioni metod

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata (MIC) korišćen je mikrodilucioni metod (Klaus et al., 2015). Test mikroorganizmi koji su se nalazili u liofilizovanom stanju su pripremljeni u MHB, tako da im koncentracija iznosi 10⁵ CFU/ml. 50 µl suspenzije kulture mikroorganizama definisane koncentracije je dodato u bunariće mikrotitarske ploče (Sarstedt, Germany). U svaki od bunarića je prethodno dodato 50 µl serijski razblaženog ekstrakta u MHB. Koncentracije ekstrakata su iznosile od 0.0097 do 40 mg/ml. Pozitivna kontrola su bili bunarići sa 50 µl MHB i bunarići sa suspenzijom mikroorganizama u MHB sa DMSO. Neposredno pred inkubaciju sadržaj mikrotitarskih ploča je promešan na šejkeru (1 min, 900 obr). Rezultati su očitani na Microplate čitaču (BioTek, ELx808, USA). Trifenil tetrazolijum hlorid, TTC (0.05%), je dodat u podlogu za inkubaciju da bi se ćelijska aktivnost učinila vidljivom. Ova boja koristi se za razlikovanje metabolički aktivnih ćelija od inaktivnih, tj. neživih ćelija. Žive ćelije poseduju enzime koji redukuju TTC, pri čemu ovaj indikator iz bezbojnog prelazi u crveno obojeno jedinjenje.

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), definisana kao najniža koncentracija koja ispoljava potpunu inhibiciju rasta test-mikroorganizama, minimalna baktericidna koncentracija (MBC), koja predstavlja najnižu koncentraciju ekstrakta bez vidljivog porasta bakterija nakon subkultivacije i minimalna fungicidna koncentracija (MFC) koja

predstavlja najnižu koncentraciju ekstrakta bez vidljivog porasta kvasaca nakon subkultivacije, su korišćene za izražavanje rezultata metode. MBC i MFC su određeni na osnovu serije subkultivisanih uzoraka dobijenih dodavanjem 50 μ l uzorka iz svakog od bunarića u 50 μ l MHB za bakterije i sladnog bujona za kvasce, nakon čega su inkubirani 24 h na 37°C za bakterije i 24 h na 30°C za kvasce, a kod kojih nije došlo do promene boje.

4.4.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata

Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakta je utvrđena na osnovu rezultata 5 metoda: antioksidativne aktivnosti u sistemu linoleinske kiseline, redukcione sposobnosti, sposobnosti heliranja jona gvožđa, sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala i sposobnosti redukcije jona bakra.

Za izvođenje navedenih metoda korišćeni su: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), ferosulfat, kalijum fericijanid, ferihlorid, linoleinska kiselina, Tween 20, ferohlorid, ferozin, standardi α -tokoferol, askorbinska kiselina, sintetički antioksidant butilovani hidroksitoluen (BHT), limunska kiselina, etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA) i galna kiselina, apsolutni metanol, bakar(II)hlorid, amonijum-acetatni pufer, neokuproin i Troloks.

4.4.2.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost je određena konjugen dienskom metodom (Klaus et al., 2011). Sprašeni ekstrakti gljiva su rastvoreni u MQ vodi (0.0005-0.1 mg/ml, 100 μ), te im je dodato 2 ml 10 mM emulzije linoleinske kiseline u 0.2 M natrijum-fosfatnom puferu. Stabilnost emulzije je obezbeđena dodatkom 6.5 mM Tween-a 20 i rastvor je, uz mešanje, inkubiran 15 h, u mraku, na 37°C, kako bi se oksidacija ubrzala. Potom je 0.2 ml rastvora dodato u 6 ml apsolutnog metanola. Centrifugiranjem je obezbeđena transparentnost rastvora. Za merenje je uzet supernatant. Apsorbanca supernatanta je merena na UV/VIS

spektrofotometru (ShimadzuUV-1800, Japan) na 234 nm. Slepa proba je sadržala sve komponente osim ekstrakta. Antioksidativnost je računata po formuli:

$$\text{Antioksidativna aktivnost (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 – apsorbanca slepe probe

A_1 – apsorbanca rastvora sa uzorkom

Askorbinska kiselina i α -tokoferol su korišćeni kao pozitivne kontrole. Vrednost od 100% ukazuje na najjaču antioksidativnu aktivnost, tj. inhibiciju peroksidacije linoleinske kiseline. Sva merenja su izvedena u triplikatima.

4.4.2.2. Redukciona sposobnost

Redukciona sposobnost je određena metodom koju su prilagodili Kozarski i saradnici (2011). Ispitivanim ekstraktima gljiva (0.1-5 mg/ml, 2.5 ml) rastvorenim u MQ vodi dodato je 2.5 ml 0.2M natrijum fosfatnog pufera (pH 6.6) i 2.5 ml 1% kalijum-fericijanida. Dobijeni rastvor je izmešan i inkubiran na 50°C, 20 min. Zatim mu je dodato 2.5 ml 10% trihlorsirćetne kiseline i rastvor je centrifugiran 10 min na 2000 g. Odvojen je gornji sloj (5 ml) te mu je dodato 5 ml MQ vode i 1 ml 0.1% ferihlorida. Apсорbanca dobijenog rastvora je merena na UV/VIS spektrofotometru (ShimadzuUV-1800, Japan) na 700 nm. Kao slepa proba korišćen je rastvor u kome su se nalazile sve komponente osim ekstrakta. Viša vrednost apsorbance je ukazivala na veću redukcionu sposobnost. Kao pozitivna kontrola je korišćena askorbinska kiselina.

4.4.2.3. Sposobnost hvatanja DPPH radikala

Korišćena je metoda koju je dala Kozarski i saradnici (2011). U prvoj seriji svakom prahu polisaharida gljiva (0.05-10 mg/ml, 2 ml) u MQ vodi dodat je 1 ml sveže

pripremljenog rastvora 0.2 mM DPPH u DMSO. U drugoj seriji svakom uzorku je dodat 1 ml rastvora DMSO. Ovako dobijen rastvor iz prve serije je energično mešan tokom 1 minuta, a zatim ostavljen u mraku 40 minuta na 20°C. Apsorbanca dobijenog rastvora druge serije je merena odmah na UV/VIS spektrofotometru (ShimadzuUV-1800, Japan) na 517nm. Apsorbanca prve serije je izmerena nakon inkubacije. Kao kontrolni uzorak korišćen je rastvor koji je sadržao sve komponente osim ekstrakta.

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala računata je po navedenoj jednačini:

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

A_i - apsorbanca 2 ml ekstrakta sa dodatkom 1 ml rastvora DPPH

A_j - apsorbanca 2 ml ekstrakta sa dodatkom 1 ml rastvora DMSO

A_c - apsorbanca kontrolnog rastvora - 2 ml DMSO i 1 ml DPPH

Askorbinska kiselina, BHT и α -tokoferol rastvoren u DMSO su korišćeni kao pozitivne kontrole (Ekanayake et al, 2005).

4.4.2.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Sposobnost heliranja jona gvožđa je određena prema metodi po Dinis i saradnicima (1994). Ekstraktima gljiva (0.1-5 mg/ml) u MQ vodi dodato je 3.7 ml MQ vode i 0.1 ml 2 mM ferohlorida. Reakcija je inicirana dodatkom 0.2 ml 5 mM ferozina. Nakon 10 minuta inkubacije rastvora na sobnoj temperaturi merena je apsorbanca na UV/VIS spektrofotometru (ShimadzuUV-1800, Japan) na 562 nm. Kontrolni rastvor nije sadržao ferohlorid ni ferozin, koji učestvuju u formiranju kompleksa. Niža apsorbanca je ukazivala na jaču sposobnost heliranja.

Sposobnost heliranja jona gvožđa je računata po jednačini:

$$\text{Sposobnost heliranja jona gvožđa (\%)} = (A_{bl} - A_{uz}) / A_{bl} \times 100, \text{ gde je:}$$

A_{bl} - apsorbancia kontrolnog rastvora

A_{uz} - apsorbancia rastvora sa uzorkom

Limunska kiselina i EDTA su korišćene kao pozitivna kontrola.

4.4.2.5. Sposobnost redukcije jona bakra

Sposobnost redukcije jona bakra je određena po metodi koju su dali Öztürk i saradnici (2011), uz određene modifikacije. Ekstraktima gljiva (0.078-2.5 mg/ml) u MQ vodi dodate su ekvimolarne količine bakar(II) hlorida, neokuproina i amonijumacetatnog pufera tako da finalna zapremina u bunariću mikrotitarske ploče bude 210 μ l. Zatim je ploča inkubirana 60 min na 30°C. Apsorbancia je očitana na Microplate čitaču (BioTek, Elx808, USA) na 450 nm. Kontrolni rastvor je sadržao sve komponente osim bakar(II) hlorida.

Kao pozitivne kontrole su korišćeni BHT i α -tokoferol pripremljeni u DMSO.

Ukupna apsorbancia je dobijena iz razlike apsorbance uzorka i kontrolnog rastvora.

$$A_{uk} = A_{uz} - A_{bl}, \text{ gde je:}$$

A_{uz} – apsorbancia uzorka

A_{bl} – apsorbancia kontrolnog rastvora

4.4.3. Sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima

Koristeći metod koji su dali Cushman i Cheung (1971), uz određene modifikacije, izvršeno je određivanje ACE-inhibitorne aktivnosti ispitivanih uzoraka. 10 μ l rastvora ACE (0.05 U/ml) je inkubirano sa 50 μ l uzorka (0.1-4 mg/ml) u MQ vodi 10 min na 37°C, uz mešanje. Rastvoru je dodat supstrat (200 μ l supstrata 5 mM N-Hipuril-Histidin-Leucin hidrat, Hip-His-Leu, pripremljenog u 0.1 M natrijum boratnom puferu (pH 8.3, sa 0.3 M NaCl), nakon čega je izmešan i inkubiran 80 min na 37°C, uz mešanje. Reakcija je

prekinuta dodatkom 250 µl 1M HCl. Nastala hipurinska kiselina je ekstrahovana dodatkom 1.5 ml etilacetata. Rastvor je centrifugiran 5 min na 3000 obr, nakon čega je odvojeno 750 µl iz gornjeg sloja i upareno u vakuumu na 37°C. Preostala hipurinska kiselina je rastvorena u 2 ml destilovane vode pa je na UV/VIS spektrofotometru(Shimadzu, UV-1800, Japan)izmerena apsorbance na talasnoj dužini od 228 nm. Slepa proba reakcije je pripremljena na isti način osim što je izmenjen redosled dodavanja reagenasa: HClje dodata pre enzima. Kao pozitivna kontrola korišćen je kaptopril, rastvoren u vodi, tako da su dobijena odgovarajuća decimalna razređenja. Slepa proba uzorka je pripremljena isto kao slepa proba reakcije, ali je umesto pufera dodat uzorak.

% inhibicije ACE računat je prema formuli koju su dali Hernández-Ledesma i saradnici (2011):

$$\%IACE = \frac{100 \times [(A-B)-(C-D)]}{(A-B)}, \text{ gde je:}$$

A – apsorbance u prisustvu ACE

B – apsorbance slepe probe reakcije

C –apsorbance u prisustvu ACE i inhibitora (testiranog uzorka)

D – apsorbance slepe probe uzorka

Veća vrednost %IACEoznačava jaču sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima.

4.4.4. Antikancerogena svojstva ekstrakta

Antikancerogeno dejstvo ekstrakata je ispitano MTT testom, koji podrazumeva primenu boje 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolium bromid, na odabranim tumorskim ćelijskim linijama(Mosmann, 1983; Ohno i Abe, 1991).

4.4.4.1. Čelijske linije

Rastvor ekstrakata je pripremljen u hranljivom medijumu. Za testiranje su korišćene humane ćelije raka grlića materice (human cervix adenocarcinoma), tj. HeLa, ćelijekarcinoma dojke MDA-MB-453 (breast carcinoma MDA-MB-453) i fibroblasti pluća MRC-5 (normal lung fibroblast MRC-5), koje su u monosloju odgajene na hranljivom medijumu. Čelijemijeloidne leukemije K562 (myelogenous leukemia K562) su održavane u vidu suspendovane kulture. Čelije su rasle na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂.

4.4.4.2. Određivanje citotoksičnog dejstva ekstrakata

HeLa (2.000 ćelija po polju, c/w), MDA-MB-453 (3.000 c/w) i MRC-5 (5.000 c/w) su zasejane na mikrotitarske ploče sa 96 polja da bi nakon 20 h pet koncentracija ispitivanih ekstrakta bilo dodato u mikrotitarske ploče. Finalne koncentracije su iznosile od 0.1875 do 3 mg/ml. Ispitivani ekstrakti su dodati suspenziji K562 ćelija (5.000 c/w) 2 h nakon zasejavanja, u istim koncentracijama koje su primenjene i kod ostalih ćelijskih linija. Provera ćelijske vijabilnosti u prisustvu ispitivanih ekstrakata gljiva određena je pomoću MTT testa (Mosmann, 1983; Ohno i Abe, 1991). Rezultati su očitavani 72 h po dodatku ekstrakata.

4.5. Statistička obrada rezultata

Sve analize i merenja su obavljene u triplikatu i rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja ± standardna devijacija (SD). Statistička obrada dobijenih rezultata je vršena u računarskom softveru STATSOFT10 uz primenu analize varijanse (ANOVA) i Tukey HSD testa na nivou značajnosti $p < 0.05$. Pearson Correlation Coefficient Calculator korišćen je za održavanje korelacije između promenljivih.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Identifikacija gljiva

Folklorni značaj i viševjekovna primena gljiva *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crispa* ukazuju na njihova brojna terapijska svojstva i blagotvoran uticaj na čovekov organizam. Savremena istraživanja sve više uključuju gljive, posebno razdeo Basidiomycotina, ali su podaci o navedenim vrstama još uvek retki i nepotpuni (Saar, 1991). Narodna medicina, dostupnost u prirodi i na tržištu, ali i aktuelnost istraživanja u ovoj oblasti poslužili su kao smernica pri izboru navedenih vrsta.

Gljiva *F. fomentarius* je sakupljena iz prirode pa je njena identifikacija obavljena na osnovu makroskopskih (izgled, oblik, boja šešira i drške) i mikroskopskih (oblik i veličina spora) karakteristika, pomoću ključa za identifikaciju gljiva (Breitenbach i Kränzlin, 1986).

Gljive *A. auricula-judae* i *S. crispas*u industrijski odgajene, pakovane u osušenom stanju i nabavljene u maloprodajnoj radnji, sa odgovarajućom deklaracijom koja je poslužila kao potvrda njihovog porekla i vrste.

5.1.1. Identifikacija gljive *Fomes fomentarius*

Karpori gljive *F. Fomentarius* ubrani su na području planine Goč, Srbija, u avgustu 2010. godine. Plodonosno telo je raslo na stablu bukve, na oko 2 m visine, kao pojedinačno, pričvršćenno za stablo širokom bočnom osnovom. Sa gornje strane karpofora bili su prisutni koncentrični jasno uočljivi krugovi; površina je bila glatka i svetlo sive boje, koja je na poprečnom preseku bila debela 2 mm (Slika 9.). U osnovi donjeg dela plodonosnog tela je bio uočljiv široki beličast prsten sa čije se donje strane nalazila porozna površina svetlo braon boje-himenijum. Pore himenijuma su bile okruglaste, cevaste na preseku, dužine 4 mm. Na mestu odvajanja od stabla mogao se zapaziti beo, nežan i paučinast micelijum. Pri presecanju karpofor je bio tvrd i žilav, osećao se prijatan miris na gljivu. Mikroskopiranjem (Olympus Cx21, USA) je utvrđeno da su spore glatke,

cilindrične, dimenzija 19 x 5.8 μm . Uočene su hife sa debelim zidovima (7 μm). Na osnovu opisanih karakteristika utvrđeno je da je u pitanju gljiva *F. fomentarius* (Breitenbach i Kränzlin, 1986).



Slika 9. Karpofor gljive *F. fomentarius*, autor Jovana Vunduk

5.1.2. Identifikacija gljive *Auricularia auricula-judae*

Plodonosna tela gljive *A. auricula-judae* kupljena su u jesen 2010. godine, u Beogradu u maloprodajnoj radnji. Gljiva je bila u osušenom stanju, zapakovana u originalno pakovanje sa deklaracijom na srpskom, engleskom i kineskom jeziku, a na kojoj su bile označene vrsta i poreklo, kao i datum proizvodnje, što je poslužilo za reidentifikaciju (Slika 10.). Gljiva je bila od proizvođača Lu Yuan Lin, Kina.



Slika 10. Karpofor gljive *A. auricula-judae*, autor Jovana Vunduk

5.1.3. Identifikacija gljive *Sparassis crispa*

Gljiva *S. crispa* kupljena je u osušenom stanju u maloprodajnoj radnji, u jesen 2010. godine, u Beogradu (Slika 11). Na ambalaži je postojala deklaracija na srpskom i engleskom jeziku sa jasno navedenim poreklom i vrstom, što je poslužilo za reidentifikaciju. Plodonosna tela subila od proizvođača Lu Yuan Lin, Kina.



Slika 11. Karpofor gljive *S. crispa*, autor Jovana Vunduk

5.2. Prinos ekstrakata gljiva

Ekstrakti gljiva ispitivanih u ovom radu dobijeni su različitim postupcima ekstrakcije. Osnovnu grupu ekstrakata činili su vreli vodeni, vreli alkalni i dijalizovani, tj. delimično prečišćeni vodeni ekstrakt. Prinos je zavisio od načina ekstrakcije. Najveći prinos je ostvaren vrelom alkalnom ekstrakcijom, za gljive *F. fomentarius* i *A. auricularia-judae*, usled agresivnog postupka ekstrakcije. Na ovaj način intenzivno je razgrađen ćelijski zid, a čvrsta vlaknasta struktura postala labavija, čime je postignuta efikasnija ekstrakcija polisaharidnih komponenata (Klaus et al., 2015). Kod gljive *S. crispa* je najveći prinos postignut vrelom vodenom ekstrakcijom. Moguće je da kod ove gljive ćelijski zid grade mahom u vodi rastvorni polisaharidi koji su najvećim delom ekstrahovani vodom. Najniži prinos je ostvaren pri pripremi dijalizovanih vodenih ekstrakata jer se tokom dijalize odstranjuju mali molekuli i tako gubi izvesna količina materijala. Drugu grupu ekstrakata su činili modifikovani polisaharidni ekstrakti dobijeni enzimskim tretmanom svakog od ekstrakata iz prve grupe. U ovom slučaju najveći prinos je dobijen pri modifikaciji dijalizovanog vodenog ekstrakta. Kod ovih ekstrakata delovanjem enzima (α - i β -amilaze) došlo je do raskidanja α -D-glikozidnih veza. Tako su isečeni α -glukani kojih u uzorcima ima u malim količinama. Ostvareno je koncentrisanje β -glukanske, tj. većinske polisaharidne frakcije uzoraka. Ova frakcija ima veliku molekulsku masu pa nije došlo do značajnijih gubitaka u materijalu prilikom dijalize.

5.2.1. Prinos ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Alkalnom ekstrakcijom dobijeno je 4.40 ± 0.35 g/100 g suve gljive, što je bio i najviši prinos kada je ova gljiva u pitanju. Značajno niža količina ekstrakta dobjena je nakon prečišćavanja vrelog vodenog ekstrakta (0.94 ± 0.06 g/100 g suve gljive) (Tabela 2). Pri daljem tretiranju uzoraka, tj. primenom enzimske modifikacije, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, MFP, je imao najviši prinos (0.82 ± 0.03 g/100 g suve gljive). Imajući u vidu da je sirovi ekstrakt, FP, već prošao kroz proces dijalize a potom i enzimske

modifikacije, bilo je očekivano da je sadržaj malih molekula kod ovog uzorka najniži. Drugim rečima, enzimaska modifikacija nije uzrokovala značajnije gubitke.

Tabela 2. Prinos, sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana ekstrakata gljive *F. fomentarius*

<i>Fomes fomentarius</i>	Suva masa (%)	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
			Ukupni	α	β
FV ^c	2.20 ± 0.17 A ^b	1.25 ± 0.29 A	1.44 ± 0.23 A	0.06 ± 0.01 A	1.37 ± 0.22 A
FA	4.40 ± 0.35 B	2.72 ± 0.09 B	1.44 ± 0.12 A	0.26 ± 0.03 B	1.18 ± 0.09 B
FP	0.94 ± 0.06 C	0.75 ± 0.03 C	0.73 ± 0.05 B	0.05 ± 0.00 A	0.67 ± 0.05 C
MFV	0.65 ± 0.07 C, D	0.31 ± 0.03 D	0.15 ± 0.03 C	0.01 ± 0.00 C	0.14 ± 0.03 D
MFA	0.45 ± 0.02 D	0.22 ± 0.00 D	0.18 ± 0.01 C	0.00 ± 0.00 C	0.18 ± 0.01 D
MFP	0.82 ± 0.03 C	0.56 ± 0.01 C	0.43 ± 0.03 D	0.00 ± 0.00 C	0.47 ± 0.03 E

^aSvi procenti su izraženi na suhu masu gljive. Svi podaci navedeni u tabeli su dati kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); n=3.

^bSrednje vrednosti, unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Tukey HSD testa.

^cFV, vreli vodeni ekstrakt; FA, sirovi alkalni ekstrakt; FP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MFV, modifikovani vodeni ekstrakt; MFA, modifikovani alkalni ekstrakt; MFP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

Kako je alkalna ekstrakcija veoma agresivan postupak došlo je do izdvajanja veće količine polisaharida, ali i drugih manjih molekula. Poznato je da tokom alkalne ekstrakcije dolazi i do narušavanja helikoidne strukture glukana gljiva, pa nastaju fragmenti manjih molekulskih masa koji su dostupniji delovanju enzima (Tada et al., 2007). Zato su gubici nakon enzimske modifikacije FA najizraženiji.

Dijalizom i alkoholnom precipitacijom je uklonjeno 57% rasvorljivih ugljenih hidrata i drugih malih molekula iz vrelog vodenog ekstrakta. Modifikacijom FV enzimima uklonjeno je 70% malih frakcija poreklom od α -glukana i β -glukana sa učešćem α -D-

glikozidnih veza, dok ih je uprečišćenom vodenom i alkalnom ekstraktubilo 13% i 90% manje.

5.2.2. Prinos ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Procesima vrele vodene i alkalne ekstrakcije gljive *A. auricula-judae* dobijeno je 8.0 ± 0.31 i 8.2 ± 0.20 g ekstrakta računato na masu suve gljive (Tabela 3). Među prinosima ekstrakata nije postojala statistički značajna razlika. Oba ekstrakta su bila veoma viskozna. Primenom enzimske modifikacije prinosi ekstrakata su značajno smanjeni, pri čemu je dobijeno najviše modifikovanog delimično prečišćenog ekstrakta (0.81 ± 0.03 g/100 g suve mase gljive), isto kao i kod gljive *F. fomentarius*. Alkalni ekstrakt je sadržao najviše jedinjenja malih molekulskih masa pa su enzimska modifikacija i dijaliza dovele do najizraženijeg gubitka mase.

Tabela 3. Prinos^a, sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana ekstrakata gljive *A. auricula-judae*

<i>Auricularia auricula - judae</i>	Suva masa (%)	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
			Ukupni	α	β
AV ^c	8.00 ± 0.31 A ^b	4.21 ± 0.22 A	3.78 ± 0.26 A	0.97 ± 0.08 A	2.81 ± 0.15 A
AA	8.20 ± 0.20 A	5.31 ± 0.14 B	2.31 ± 0.07 B	0.08 ± 0.00 B	2.23 ± 0.06 B
AP	1.21 ± 0.07 B	0.51 ± 0.07 C	0.31 ± 0.05 C	0.01 ± 0.00 B	0.30 ± 0.05 C
MAV	0.67 ± 0.04 B	0.42 ± 0.03 C	0.27 ± 0.03 C	0.00 ± 0.00 B	0.27 ± 0.03 C
MAA	0.61 ± 0.02 B	0.36 ± 0.01 C	0.33 ± 0.02 C	0.00 ± 0.00 B	0.33 ± 0.02 C
MAP	0.81 ± 0.07 B	0.52 ± 0.02 C	0.47 ± 0.02 C	0.00 ± 0.00 B	0.47 ± 0.02 D

^aSvi procenti su izraženi na suhu masu gljive. Svi podaci navedeni u tabeli su dati kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD); n=3.

^bSrednje vrednosti, unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Tukey HSD testa.

°AV, vreli vodeni ekstrakt; AA, sirovi alkalni ekstrakt; AP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MAV, modifikovani vodeni ekstrakt; MAA, modifikovani alkalni ekstrakt; MAP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

Dijalizom i alkoholnom precipitacijom je iz vodenog ekstrakta uklonjeno 85% rastvorljivih polisaharida i drugih malih molekula. Sa druge strane, enzimski tretman AV doveo je do uklanjanja 92% α -glukana, glukanskih molekula sa α -D-glikozidnom vezom i drugih malih molekula, dok je u slučaju AP ova vrednost iznosila 33%. Modifikacijom alkalnog ekstrakta uklonjeno je 93% malih molekula uključujući α -glukane i potencijalne polisaharide u kojima je bio prisutan mešoviti tip veze.

5.2.3. Prinos ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Kod gljive *S. crispa* nakon dijalize i po dodatku alkohola nije došlo do precipitacije polisaharidne frakcije te nije ni dobijen dijalizovani vodeni ekstrakt. Ovo ukazuje na gubitak polisaharidne frakcije zbog malih dimenzija čestica, manjih od pora na membrani za dijalizu. Osim toga, moguće je i da su polisaharidi većih molekulskih masa menjali konformaciju te tako eluirali u okolni rastvor (Ruthes et al., 2015).

Oba sirova ekstrakta, SV i SA, bila su veoma viskozna. U literaturi se navodi da je viskoznost polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* posledica razaranja strukture trostrukog heliksa. Javljaju se nepravilni pojedinačni helikoidni segmenti skloni agregaciji u vodenoj sredini (Tada et al., 2007).

Nasuprot gljivama *F. fomentarius* i *A. auricula-judae*, vrela vodena ekstrakcija je kod gljive *S. crispa* dala značajno viši prinos ekstrakta ($11.33 \pm 0.46\%$) nego vrela alkalna ekstrakcija ($4.60 \pm 0.53\%$), verovatno usled većeg udela u vodi rastvornih β -glukana (Tabela 4.). Modifikacijom ekstrakata primenom enzima uklonjena je značajna količina polisaharida, prvenstveno α -glukana, mada nije uočena statistički značajna razlika između ovih prinosa. Uzimajući u obzir masu sirovih ekstrakata i masu dobijenih modifikovanih uzoraka, vodeni ekstrakt je pretrpeo značajne gubitke u masi. Enzimskim tretmanom

uklonjeno je 96% α -glukana i α -D-glikozidnih veza iz vodenog ekstrakta i 87% iz alkalnog ekstrakta.

Tabela 4. Prinos^a, sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana ekstrakata gljive *S. crispa*

<i>Sparassis crispa</i>	Suva masa (%)	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
			Ukupni	α	β
SV ^c	11.33 ± 0.46 A ^b	8.69 ± 0.38 A	2.57 ± 0.12 A	0.78 ± 0.03 A	1.80 ± 0.10 A
SA	4.60 ± 0.53 B	1.95 ± 0.23 B	1.42 ± 0.16 B	0.69 ± 0.09 A	0.74 ± 0.07 B
MSV	0.41 ± 0.03 C	0.27 ± 0.00 C	0.21 ± 0.02 C	0.02 ± 0.00B	0.19 ± 0.02 C
MSA	0.61 ± 0.01 C	0.25 ± 0.00 C	0.24 ± 0.00 C	0.03 ± 0.00B	0.21 ± 0.01 C

^aSvi procenti su izraženi na suhu masu gljive. Svi podaci navedeni u tabeli su dati kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); n=3.

^bSrednje vrednosti, unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu Tukey HSD testa.

^cSV, vreli vodeni ekstrakt; SA, sirovi alkalni ekstrakt; MSV, modifikovani vodeni ekstrakt; MSA, modifikovani alkalni ekstrakt.

Na osnovu analize prinosa ekstrakata različitih gljiva ispitivanih u ovom radu može se zaključiti da je način ekstrakcije u direktnoj vezi sa sadržajem polisaharidnih komponenata, ali i njihove prirode, tj. rastvorljivosti u vodi i alkalijama. Tada i saradnici (2007), kao i Zhu i saradnici (2015) navode da način ekstrakcije i izbor rastvarača imaju presudni efekat na molekulsku masu i funkcionalne osobine dobijenih glukana. Rezultati vezani za prinose ekstrakata, polisaharida i glukana dobijeni u ovom radu u saglasnosti su sa literaturnim navodima. Enzimski tretmani doveli su do raskidanja α -D-glikozidnih veza pa je kod onih uzoraka koji su sadržali više α -glukana ostvaren značajniji gubitak mase nakon uklanjanja enzima, dijalize i alkoholne precipitacije.

Vrelom vodenom ekstrakcijom dobijeno je najviše ekstrakta gljive *S. crispa*, dok je vrela alkalna ekstrakcija najviše pogodovala izdvajanju polisaharida gljive *A. auricula-judae*.

5.3. Polisaharidne komponente ekstrakata gljiva

Sadržaj ukupnih polisaharida u ekstraktima ispitivanih gljiva kretao se između 40 i 97%, zavisno od vrste gljive i načina ekstrakcije, što je u skladu sa literaturnim navodima (50-90%) (Sari et al., 2017). Ukupni polisaharidi su određeni fenol-sumpornom metodom koja ne pravi razliku između različitih tipova polisaharida, te je β -glukan kit korišćen za utvrđivanje sadržaja glukana. Ukupni polisaharidi osim glukana podrazumevaju hitin, oligosaharide i druge ugljene hidrate (Wasser and Weis, 1999).

5.3.1. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Vreli vodeni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakt sadržali su značajno više ukupnih polisaharida od alkalnog ekstrakta (Tabela 5.). Moguće je da *F. fomentarius* sadrži manju količinu heteropolisaharida koji se ekstrahuju alkalnom hidrolizom, što se odrazilo i na količinu ukupnih polisaharida u alkalnom ekstraktu (Wasser i Weis, 1999). Nakon primenjene enzimske modifikacije sadržaj ukupnih polisaharida je bio niži u svim ekstraktima, što je i očekivano, jer je modifikacija sprovedena sa ciljem da se eliminiše jedna od polisaharidnih frakcija, tj. α -glukani. I drugi (hemijski) postupci modifikovanja ekstrakata imaju isti efekat na sadržaj polisaharida u uzorcima (Zhang et al., 2014). Najviše ukupnih polisaharida preostalo je u modifikovanom delimično prečišćenom vodenom ekstraktu.

Sirovi vodeni ekstrakt sadržao je dva puta više ukupnih glukana od alkalnog ekstrakta, dok je dijalizom i alkoholnom precipitacijom FV postignuto koncentrisanje, pa je sadržaj ukupnih glukana iznosio $77.22 \pm 0.72\%$. Ovako visoka vrednost potvrđuje

efikasnost primenjenih postupaka ekstrakcije jer je sadržaj ukupnih glukana kod cele gljive *F. fomentarius* 24.943 g/100 g suve gljive, od čega su svega 2.448 g α -glukani i 22.495 g β -glukani (Sari et al., 2017). Alkalni ekstrakt imao je najviši sadržaj α -glukana koji su gotovo u celosti uklonjeni delovanjem enzima (Rhee et al., 2008). Tako je ostvareno koncentrisanje β -glukana u ovom uzorku. Sadržaj α -glukana bio je drastično snižen i u svim ostalim uzorcima koji su prošli enzimski tretman.

Tabela 5. Sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana u ekstraktima dobijenim od gljive *F. fomentarius*

<i>Fomes fomentarius</i>	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
		Ukupni	α	β
FV ^c	68.83 ± 0.08 A ^b	65.26 ± 0.36 A	3.03 ± 0.02 A	62.23 ± 0.37 A
FA	61.88 ± 0.13 B	32.56 ± 0.18 B	5.85 ± 0.11 B	26.71 ± 0.28 B
FP	80.61 ± 0.18 C	77.22 ± 0.72 C	5.81 ± 0.13 B	71.41 ± 0.85 C
MFV	47.20 ± 0.10 D	21.30 ± 2.27 D	0.92 ± 0.10 C	20.38 ± 2.17 D
MFA	49.00 ± 0.10 E	40.96 ± 2.09 E	0.03 ± 0.00 D	40.93 ± 2.09 E
MFP	69.20 ± 0.09 F	58.31 ± 1.80 F	0.03 ± 0.00 D	58.28 ± 1.79 F

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje

vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c FV, vrelj vodeni ekstrakt; FA, sirovi alkalni ekstrakt; FP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MFV, modifikovani vodeni ekstrakt; MFA, modifikovani alkalni ekstrakt; MFP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

Značajno niža količina β -glukana u modifikovanom vodenom ekstraktu u odnosu na vodeni ekstrakt (imajući u vidu i sadržaj α -glukana) ukazuje na mogućnost da je ovaj ekstrakt sadržao i značajnu količinu glukana sa mešovitim vezama koje su uklonjene

delovanjem enzima. Tako su tokom dijalize eliminisane novonastale frakcije malih molekulskih masa.

5.3.2. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Za razliku od gljive *F. fomentarius* kod koje je veći prinos polisaharida dobijen vrelom vodenom ekstrakcijom, vrela alkalna ekstrakcija je bila efikasnija kod gljive *A. auricula-judae* (Tabela 6.).

Tabela 6. Sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana u ekstraktima dobijenim od gljive *A. auricula-judae*

<i>Auricularia auricula - judae</i>	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
		Ukupni	α	β
AV ^c	52.64 ± 0.17 A ^b	47.25 ± 0.98 A	12.08 ± 0.84 A	35.10 ± 1.82 A
AA	64.80 ± 0.18 B	28.15 ± 0.17 B	1.04 ± 0.03 B	27.11 ± 0.18 B
AP	96.80 ± 0.23 C	58.38 ± 1.17 C	1.00 ± 0.07 B	57.44 ± 1.10 C
MAV	48.40 ± 0.14 D	23.20 ± 1.80 D	0.25 ± 0.06 C	22.95 ± 1.86 D
MAA	58.40 ± 0.17 E	53.52 ± 2.09 E	0.77 ± 0.09B, C	52.75 ± 2.14 E
MAP	64.00 ± 0.16 F	57.41 ± 0.90C	0.66 ± 0.07B, C	56.75 ± 0.93C

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c AV, vrela vodena ekstrakcija; AA, sirovi alkalni ekstrakt; AP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MAV, modifikovani vodeni ekstrakt; MAA, modifikovani alkalni ekstrakt; MAP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

Dijalizom i alkoholnom precipitacijom sirovog vodenog ekstrakta došlo je do koncentrisanja polisaharidnih komponenata. Enzimski tretman je rezultovao smanjenjem sadržaja ukupnih polisaharida ali i ukupnih glukana, osim kod MAA, jer su raskinute veze u molekulima α -glukana, što se vidi i u njihovom smanjenom sadržaju, i to najviše kod modificovanog vodenog ekstrakta. Dijaliza vrelog vodenog ekstrakta doprinela je značajnom uklanjanju α -glukana. Vrela alkalna ekstrakcija dala je najnižu količinu kako ukupnih tako i β -glukana, što je izmenjeno primenom enzimske modifikacije; obe komponente su koncentrisane, pa modificovani alkalni ekstrakt sadrži skoro istu količinu ukupnih i β -glukana kao i modificovani dijalizovani ekstrakt.

5.3.3. Polisaharidne komponente ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Izdvajanju polisaharidnih komponenata gljive *S. crispa* najviše je doprinela vrela vodena ekstrakcija, dok je njihov sadržaj nakon modifikacije značajno niži i kod MSV i kod MSA (Tabela 7.). Najviše ukupnih glukana izmereno je u alkalnom ekstraktu, pri čemu je isti ekstrakt sadržao i najviše α -glukana (Rhee et al., 2008). Interesantno je da je alkalni ekstrakt sadržao podjednake količine α - i β -glukana, ali je nakon enzimske modifikacije ovaj odnos promenjen pa je ostvareno višestruko koncentrisanje β -glukana. Svi ekstrakti *S. cripa* sadržali su značajno nižu količinu β -glukana u poređenju sa literaturnim navodima, 43.6% računato na suhu masu gljive i 70.2 ± 5.4 na suhu masu ekstrakta (Tada et al., 2007; Park et al., 2009).

Vrelom vodenom ekstrakcijom izdvojeno je više ukupnih polisaharida kod gljiva *F. fomentarius* i *S. crispa*, što govori da je *A. auricula-judae* sadržala više u alkalijama rastvorljivih polisaharida. Dijalizom i alkoholnom precipitacijom sirovog vodenog ekstrakta postignuto je koncentrisanje ukupnih polisaharida. Enzimskim tretmanom sadržaj polisaharida je snižen jer su uklonjene komponente malih molekulskih masa, pre svega α -glukani.

Tabela 7. Sadržaj ukupnih polisaharida, ukupnih glukana, α -glukana i β -glukana u ekstraktima dobijenim od gljive *S. crispa*

<i>Sparassis crispa</i>	Sadržaj ukupnih polisaharida (%)	Sadržaj glukana (%) ^a		
		Ukupni	α	β
SV ^c	76.64 ± 0.24 A ^b	22.72 ± 0.18 A	6.68 ± 0.31 A	16.04 ± 0.49 A
SA	42.24 ± 0.14 B	30.96 ± 0.11 B	14.92 ± 0.39 B	16.04 ± 0.30 A
MSV	62.80 ± 0.26 C	50.4 ± 0.90 C	5.75 ± 0.00 C	44.65 ± 0.89 B
MSA	40.00 ± 0.20 D	38.52 ± 0.59 D	4.17 ± 0.00 D	34.35 ± 0.70 C

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c SV, vreli vodeni ekstrakt; SA, sirovi alkalni ekstrakt; MSV, modifikovani vodeni ekstrakt; MSA, modifikovani alkalni ekstrakt.

Mushroom β -glukan kit se pokazao kao najpouzdaniji za određivanje sadržaja ukupnih, α - i β -glukana u gljivama jer uključuje korak hidrolize i enzimski tretman (McCleary i Draga, 2016). Primenom ovog kita utvrđeno je da se sadržaj ukupnih glukana, računato na suhu masu ekstrakta, kretao od 21 do 77%. Izmerene vrednosti su značajno više nego one koje se navode u literaturi, ali treba imati u vidu da su uzorci analizirani od strane drugih autora bile cele gljive, a ne ekstrakti (McCleary i Draga, 2016; Sari et al., 2017).

I u slučaju ukupnih glukana vodena ekstrakcija se pokazala kao efikasnija. Izuzetak je bila gljiva *A. auricula-judae*. Najviši sadržaj β -glukana izmeren je u dijalizovanom uzorku gljive *F. fomentarius*. Uzorci gljive *S. crispa* imali su relativno nizak sadržaj ove komponente pre enzimske modifikacije (16.04%). Nakon enzimske modifikacije količina β -glukana je značajno viša u alkalnim ekstraktima.

Enzimski tretman doveo je do uklanjanja α -glukana, pa modifikovani ekstrakti gotovo da ih ne sadrže. U literaturi se navodi da većina gljiva sadrži do 10% α -glukana, što

je i potvrđeno (Sari et al., 2017). Na osnovu podataka iz Tabela 5., 6., i 7. evidentno je da je enzimaska modifikacija efikasan način da se uklone α -glukani, tj. da se postigne prečišćavanje β -glukana.

5.4. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima gljiva

Metodom po Folin-Ciocalteu utvrđeno je da su uzorci sadržali između 0 i 22% ukupnih fenolnih jedinjenja. Primenjeni postupci ekstrakcije i prečišćavanja dijalizom nisu bili dovoljni da se iz ekstrakata potpuno uklone fenolna jedinjenja, ali se njihova količina može u velikoj meri sniziti primenom enzimske modifikacije. To ukazuje na činjenicu da su ovi molekuli bili vezani za manje polisaharidne fragmente ili same α -glukane (Vunduk et al., 2015).

5.4.1. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive *Fomes fomentarius*

Nakon vrele vodene ekstrakcije u ekstrakt je prešlo $22.02 \pm 0.19\%$ fenolnih jedinjenja, što je bilo značajno više nego kod sirovog alkalnog ekstrakta (Tabela 8.). Prečišćeni vodeni ekstrakt izgubio je deo fenolnih jedinjenja koja su zbog malih dimenzija difundovala kroz membranu za dijalizu. Enzimskom modifikacijom uklonjene su značajne količine fenolnih jedinjenja, i to potpuno kod vodenog ekstrakta, dok kod alkalnog i dijalizovanog to nije bio slučaj, verovatno zbog toga što su fenolna jedinjenja vezana za β -glukane ili polisaharide koji nisu podlegli dejstvu enzima.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja dobijenih primenjenim postupcima ekstrakcije bio je značajno niži nego u radu Karaman i saradnika (2014). Ipak, ekstrakti analizirani od strane pomenutih autora su dobijeni drugačijim postupcima ekstrakcije, koji su favorizovali izdvajanje fenolnih jedinjenja.

Tabela 8. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih proteina u ekstraktima gljive *F. fomentarius*

<i>Fomes fomentarius</i>	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (%)	Sadržaj ukupnih proteina (%)
FV^c	22.02 ± 0.19 A^b	9.15 ± 0.00 A
FA	19.67 ± 0.07 B	9.60 ± 0.17 A
FP	11.03 ± 0.19 C	8.36 ± 0.38 B
MFV	0.00 ± 0.00 D	0.80 ± 0.06 C, D
MFA	6.83 ± 0.02 E	0.37 ± 0.11 C
MFP	8.10 ± 0.15 F	1.28 ± 0.09 D

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c FV, vreli vodeni ekstrakt; FA, sirovi alkalni ekstrakt; FP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MFV, modifikovani vodeni ekstrakt; MFA, modifikovani alkalni ekstrakt; MFP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

5.4.2. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive *Auricularia auricula-judae*

Ekstrakti gljive *A. auricula-judae* nisu sadržali značajne količine ukupnih fenolnih jedinjenja (Tabela 9.). Najviša vrednost je izmerena u uzorku vrelog vodenog ekstrakta, da bi nakon enzimske modifikacije fenolna jedinjenja bila gotovo u potpunosti uklonjena iz svih uzoraka. Dijaliza i alkoholna precipitacija su i ovde dovele do uklanjanja značajne količine fenolnih jedinjenja. Uklanjanjem α -glukana primenom enzima i ponovnom dijalizom ekstrakti su dodatno prečišćeni od fenolnih jedinjenja.

Tabela 9. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih proteina u ekstraktima gljive *A. auricula-judae*

<i>Auricularia auricula-judae</i>	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (%)	Sadržaj ukupnih proteina (%)
AV ^c	0.62 ± 0.02 A ^b	0.40 ± 0.00 A
AA	0.48 ± 0.00 B	1.24 ± 0.04 B
AP	0.1 ± 0.00 C	0.29 ± 0.13 C
MAV	0.1 ± 0.00 C	0.30 ± 0.02 A
MAA	0.21 ± 0.03 D	0.98 ± 0.18 D
MAP	0.00 ± 0.00 E	0.13 ± 0.02 A

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c AV, vreli vodeni ekstrakt; AA, sirovi alkalni ekstrakt; AP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MAV, modifikovani vodeni ekstrakt; MAA, modifikovani alkalni ekstrakt; MAP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

5.4.3. Ukupna fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive *Sparassis crispa*

Analiza po Folin-Ciocalteu metodi je pokazala da ekstrakti gljive *S. crispa* dobijeni vrelom vodenom i alkalnom ekstrakcijom ne sadrže fenolna jedinjenja (Tabela 10.).

Nowacka i saradnici (2014) su pripremali etanolne ekstrakte različitih vrsta gljiva, među kojima i *S. crispa*. Utvrdili su da u ekstraktu ove gljive ima 3.25 ± 0.15 mg GAE/g ekstrakta. Imajući u vidu nizak sadržaj fenolnih jedinjenja kod ove gljive očekivano je da primenom vodene i alkalne ekstrakcije ne dođe do značajnijeg izdvajanja ovih komponenata.

Tabela 10. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih proteina u ekstraktima gljive *S. crispa*

<i>Sparassis crispa</i>	Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (%)	Sadržaj ukupnih proteina (%)
SV ^c	0.00 ± 0.00 A ^b	1.04 ± 0.07 A
SA	0.00 ± 0.00 A	0.27 ± 0.07 B
MSV	0.00 ± 0.00 A	0.42 ± 0.15 B
MSA	0.00 ± 0.00 A	0.21 ± 0.11 B

^a Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakata. Svi rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija, $n=3$.

^b Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^c SV, vreli vodeni ekstrakt; SA, sirovi alkalni ekstrakt; MSV, modifikovani vodeni ekstrakt; MSA, modifikovani alkalni ekstrakt.

5.5. Sadržaj proteina u ekstraktima gljiva

Sadržaj proteina u ispitivanim ekstraktima kretao se od 0.13 ± 0.02 do $9.60 \pm 0.17\%$ računato na 100 g ekstrakta. Najviše je izmereno u sirovim ekstraktima gljive *F. fomentarius*, dok su druge dve gljive imale oko 1% proteina. Enzimskom modifikacijom došlo je do smanjenja sadržaja ove komponente, verovatno kao rezultat poslednjeg koraka enzimskog tretmana a koji je podrazumevao dodatak pronaze sa ciljem da se uklone radni enzimi. Proteini koji su tako svedeni na manje fragmente eliminisani su iz ekstrakata u manjoj ili većoj meri tokom dijalize. Preostale male količine proteina ukazuju na to da su u nekim slučajevima bili vezani u komplekse sa polisaharidima, tj. da su egzistirali kao proteoglukani, dok je u drugom slučaju manja količina proteina bila uslovno “teže vidljiva” za pronazu. Iako je enzimski tretman uključivao pronazu, proteini prisutni u ekstraktima nisu potpuno uklonjeni pa se može zaključiti da su integrisani u teško dostupnim segmentima glukana.

5.5.1. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive *Fomes fomentarius*

Ekstrakti gljive *F. fomentarius* imali su značajno veći sadržaj proteina u poređenju sa druge dve gljive (Tabela 8.). Najveća količina detektovana je u vreloom alkalnom ekstraktu, pri čemu se i u literaturi navodi da alkalni ekstrakti sadrže značajnu količinu proteina (Rhee et al., 2008). U istom ekstraktu je nakon modifikacije izmeren najniži sadržaj proteina što ukazuje na to da je sirovi ekstrakt sadržao znatnu količinu slobodnih malih peptidnih fragmenata koji su isečeni radom pronaze, te naknadnom dijalizom isprani iz uzorka. Modifikovani delimično prečišćeni ekstrakt sadržao je najviše proteina od svih enzimski tretiranih uzoraka. Ovakav trend može biti posledica prisustva veće količine proteina vezanih za glukane, što se poklapa i sa većim sadržajem β -glukana u ovom uzorku.

5.5.2. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive *Auricularia auricula-judae*

Sadržaj ukupnih proteina bio je najviši u sirovom alkalnom ekstraktu (Tabela 9.). Ovakav odnos zadržan je i nakon enzimskog tretmana što ukazuje na to da je uzorak verovatno sadržao veću količinu za polisaharide vezanih proteina ili peptida. Delimičnim prečišćavanjem sirovog vodenog ekstrakta postignuto je dodatno uklanjanje proteinske frakcije, da bi nakon modifikacije i vodeni i dijalizovani ekstrakt imali približno istu količinu proteina. Evidentno, enzimaska modifikacija dovela je do hidrolize polovine od ukupno prisutnih proteina u delimično prečišćenom ekstraktu.

5.5.3. Sadržaj proteina u ekstraktima gljive *Sparassis crispa*

Za razliku od prethodne dve gljive gde je alkalna ekstrakcija pogodovala prelasku veće količine proteina u ekstrakt, kod gljive *S. crispa* to nije bio slučaj. Najviše ukupnih proteina izmereno je u vreloom vodenom ekstraktu a modifikacija koja je usledila dovela je do hidrolize dela proteina pa je njihov sadržaj snižen (Tabela 10.). Kod alkalnog ekstrakta enzimski tretman je doveo do uklanjanja dela proteina pa ih tako u modifikovanom

ekstraktu ima $0.21 \pm 0.11\%$, dok je kod vrelog alkalnog ekstrakta bilo $0.27 \pm 0.07\%$ proteina računato na 100 g suvog ekstrakta.

Primenjena modifikacija nije dovela do uklanjanja celokupne količine prisutih proteina. No, to i nije bio cilj enzimskog tretmana. Ipak, primenom enzima, u prvom redu pronaze, ostvarena je i značajna deproteinizacija ekstrakata.

5.6. FT-IR spektroskopija ekstrakata gljiva

Ispitivani ekstrakti pokazuju slične FT-IR spektre, tipične za gljive. Spektri se za potrebe analize su podeljeni na 4 regiona:

- Region istezanja OH, NH i CH grupa ($4000-2500\text{ cm}^{-1}$)
- Karbonilni/proteinski region ($1750-1500\text{ cm}^{-1}$)
- Šećerni region ($1200-800\text{ cm}^{-1}$)
- Skeletni region ($<700\text{ cm}^{-1}$)

Uočeno je da se na FT-IR spektrima svih ekstrakata izdvajaju široka traka na oko 3400 cm^{-1} koja se povezuje sa istezanjem OH-veza, kao i trake na oko 2900 cm^{-1} koje potiču od istezanja CH-veza. Traka na oko 1650 cm^{-1} potiče od C-O istezanja karbonilne grupe, prevashodno amidne, dok sutrake u regionu od 1200 do 1450 cm^{-1} rezultat savijanja CH, CH₂ i OH veza. Gusto preklapajuće trake u regionu od 1200 (1300) do 800 cm^{-1} odgovaraju istezanjima C-O, C-C i savijanjima C-OH veza, dok trake ispod 800 cm^{-1} odgovaraju savijanjima skeleta i prstenova (Synytsya i Novak, 2014).

Šećerni region ("otisak prsta"), najznačajniji je pokazatelj razlika između različitih tipova ekstrakata jedne vrste, ekstrakata dobijenih iz različitih vrsta, kao i promena nastalih nakon modifikacija ekstrakata. Karakteristične trake kompleksnog šećernog regiona prisutne u ekstraktima i njihove fizičko-hemijske interpretacije, kao i objašnjenja svih ostalih vidljivih traka data su u Prilogu 1. FT-IR spektri su se nakon modifikacija menjali na različite načine što ukazuje na drugačiji sastav polisaharida u različitim gljivama/ekstraktima. Deproteinizacija očekivano dovodi do smanjenja traka povezanih sa peptidnim strukturama,

pre svega one najizraženije, amid I trake između 1600 i 1700 cm^{-1} (http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html). Tretman enzimima koji razlažu α -veze u polisaharidima očekivano bi doveo do smanjenja intenziteta/gubitka traka povezanih sa α -glukanima, ali je problem što se ove trake javljaju blizu onih povezanih sa β -vezama i teško ih je razdvojiti u uzorcima koji poseduju oba tipa veza, kakav je slučaj sa ispitivanim ekstraktima (Synytsya i Novak, 2014). Uz to, α -glukani su predstavljali relativno malu frakciju u većini ekstrakata.

5.6.1. FT-IR spektroskopija gljive *Fomes fomentarius*

Na FT-IR spektru sirovog vodenog ekstrakta *F. fomentarius* najizraženija je široka traka na 3430 cm^{-1} koja potiče od istezanja hidroksilnih (OH) grupa (Prilog 2.). Ova traka preklapa se sa amid A i amid B trakama (http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html), čiji pikovi su na oko 3400 i 3275 cm^{-1} , a koje doprinose njenoj asimetričnosti. Posle modifikacije traka se zaobljuje/proširuje i blago pomera ka nižoj frekvenci, što je pokazatelj relativnog povećanja sadržaja hidroksilnih grupa i povećanja broja vodoničnih veza između njih (Zechner-Krpan et al., 2010) što je dovedeno u vezu sa povećanjem relativnog odnosa ukupnih šećera i proteina. Takođe, došlo je do relativnog smanjenja amid I trake (1638 cm^{-1}) u odnosu na trake šećernog regiona. Ova promena takođe je ukazuje na činjenicu da je u uzorcima došlo do smanjenja sadržaja proteina. Osim toga, modifikacijom se gubi rame na amid I traci (na oko 1700 cm^{-1}), koje može da bude sastavni deo trake i da ukazuje da su proteini β ravan konformacije (http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html), ali i da bude pokazatelj prisustva karboksilnih grupa; ove grupe mogu poticati od glutaminkse i asparaginske kiseline proteina, drugih kiselih metabolita ili od kiselih šećernih jedinica polisaharida koji su enzimskim tretmanom i dijalizom uklonjeni. Promena gotovo i da nema u samom odnosu traka šećernog regiona nakon modifikacije, što potvrđuje da su glukani u vodenom ekstraktu truda prevashodno β konfiguracije.

Kod alkalnih ekstrakata (sirovog i modificiranog) uočava se promena u intenzitetu hidroksilne trake u korist enzimski tretiranog ekstrakta, kao i nekih traka šećernog regiona; traka na 1125 cm^{-1} se intenzivirala, a traka na 800 cm^{-1} redukovala (Prilog 3.). Zbog smanjenja ukupnih polisaharida u uzorku ne dolazi do intenziviranja traka u šećernom regionu.

Prečišćen ekstrakt gljive *F. fomentarius* pokazuje gotovo identične promene kao i sirovi vodeni ekstrakt. Kod ovog uzorka najizraženiji je gubitak ramena na amid I traci, ali i promena u šećernom regionu (preciznije anomernom) gde dolazi do izrazitog smanjenja intenziteta trake na 890 cm^{-1} , a intenziviranja trake na 800 cm^{-1} (Prilog 4.).

5.6.2 FT-IR spektroskopija gljive *Auricularia auricula-judae*

Vodeni ekstrakt gljive *A. auricula-judae* nakon modifikacije pokazuje slične promene u FT-IR spektru kao i vodeni ekstrakt *F. fomentarius*: zaobljivanje OH-trake koje ukazuje na povećanje broja vodoničnih veza između hidroksilnih grupa, povećanje intenziteta traka šećernog regiona, a smanjenje intenziteta amid I trake (uključujući i gubitak ramena na 1735 cm^{-1}). U šećernom regionu vidljive su promene na određenim trakama (Prilog 5.). Nakon modifikacije traka na 1128 cm^{-1} , koja je u vodenom ekstraktu najizraženija od svih traka šećernog regiona značajno gubi na intenzitetu u korist traka na 1100 , 1074 i 1140 cm^{-1} (povezanih sa β -(1 \rightarrow 3) glikozidnim vezama). Traka na 1128 cm^{-1} mogla bi da bude povezana sa α -glikozidnom vezom jer se njeno smanjenje poklapa sa smanjenjem sadržaja α -glukana u uzorku, ali za to nema dovoljno dokaza.

Kod alkalnog ekstrakta nakon modifikacije se primećuje drastično povećanje intenziteta traka šećernog regiona, što je u skladu sa rezultatima hemijskih analize koje pokazuju udvostručavanje koncentracije β -glukana (Tabela 6.). Zaobljavanje OH-trake na 3450 cm^{-1} ukazuje na povećanje broja vodoničnih veza. U samom odnosu traka šećernog regiona nema značajnih promena, osim intenziviranja traka na 1077 i 1043 cm^{-1} , što ukazuje na koncentrisanje prisutnih β -glukana (Prilog 6.).

Prečišćeni ekstrakt gljive judino uvo u odnosu na sirovi vodeni ekstrakt pokazuje izrazito intenziviranje trake na 1735 cm^{-1} koja se s najvećom vjerojatnoćom može povezati sa karboksilnim grupama. Prisustvo takođe izražene trake na 1419 cm^{-1} , a koja se isto pripisuje karboskilnim grupama, može da znači da ekstrakt sadrži kisele šećerne jedinice ili proteine bogate glutaminskom i/ili asparaginskom kiselinom. Modifikacijom se ova traka gubi, dok trake šećernog regiona ne podležu vidljivim promenama, osim što se njihov intenzitet povećava u odnosu na intenzitet amidne trake na oko 1630 cm^{-1} , što je u saglasnosti sa hemijskim analizama (Prilog 7.).

5.6.3. FT-IR spektroskopija gljive *Sparassis crispa*

Vodeni ekstrakt gljive *S. crispa* nakon modifikacija pokazuje slične promene kao i sirovi vodeni ekstrakti druge dve gljive. Proširivanje i zaobljivanje OH trake ukazuje na povećanje broja vodoničnih veza, a intenziviranje traka šećernog regiona i smanjenje amid I trake ukazuje na koncentrisanje polisaharida a smanjenje koncentracije proteina u uzorku. Iščezavanje ramena na amid I traci (na 1735 cm^{-1}) prisutno je i u ovom uzorku (Prilog 8.). U šećernom regionu se uočava slična promena kao kod vodenog ekstrakta gljive Judino uvo; smanjenje intenziteta trake na 1128 cm^{-1} a intenziviranje traka na 1074 i 1043 cm^{-1} poklapa se sa smanjenjem koncentracije α -glukana a povećanjem β -glukana i u ovom slučaju (Tabela 7.). Traka na 800 cm^{-1} takođe se značajno intenzivirala.

Alkalni ekstrakt ima najveći relativni sadržaj α -glukana u glukanskoj frakciji koji nakon enzimske modifikacije nije potpuno eliminisan. Nakon modifikacije dolazi do promena u relativnom odnosu intenziteta traka u šećernom regionu, blagom smanjenju intenziteta traka na 1128 i 1091 cm^{-1} (Prilog 9.), ali verovatno još značajnije, dolazi do potpunog gubitka slabe trake na 850 cm^{-1} , koja je povezana sa α -glikozidnom vezom (Galichet et al., 2001), što je u saglasnosti sa rezultatima hemijskih analiza ali pokazuje i da traka, koja je inače slabog intenziteta, postaje "vidljiva" tek u prisustvu velike relativne koncentracije α -glukana, pošto nije bila jasno definisana u slučaju drugih ekstrakata.

5.7. Planarna hromatografija kiselinskog hidrolizata polisaharidnih ekstrakata

Analizom hidrolizovanih polisaharidnih ekstrakata planarnom hromatografijom, poređenjem sa standardima, utvrđeno je da uzorci *S. crispa* sadrže veliku količinu glukoze, dok su nešto manje bila zastupljena manoza i galaktoza. Uzorci *A. auricula-judae* sadrže također glukoze kao dominantnu komponentu, zatim galaktozu, manoze, ksiloze i glukuronsku kiselinu. Uzorci *F. fomentarius* sadržali su glukoze i galaktoze kao dominantne komponente, dok su manoza i fukoza bile manje zastupljene.

5.8. Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljiva

5.8.1. Metod difuzije sa filter diskova

5.8.1.1. Antimikrobna aktivnost gljive *Fomes fomentarius*

Disk difuzioni metod je pokazao da ekstrakti gljive *F. fomentarius* ispoljavaju antimikrobno dejstvo prema svim testiranim bakterijama, ali da ni u jednom slučaju efekat nije jači od komercijalnog antibiotika (Tabela 11.). U većini slučajeva najizraženiji efekat imao je vreli alkalni ekstrakt, dok su modifikovani ekstrakti bili značajno slabiji ili je njihov efekat izostao. Kasnija testiranja sprovedena primenom mikro i makrodilucione metode dala su drugačije rezultate. Mnogi modifikovani ekstrakti koji u disk difuzionoj metodi nisu ispoljili dejstvo bili su efikasni, čak i mikrobicidni, u druge dve metode. Ovakvi rezultati mogu se objasniti nedovoljnom pouzdanošću disk difuzione metode. Veliki problem može predstavljati rastvorljivost testiranih supstanci, što ističu brojni autori (Klančnik et al., 2010; Ren et al., 2014; Klaus et al., 2015). Osim toga, polarnost supstanci može uticati na antimikrobni efekat praćen ovom metodom. Ekstrakti testirani u ovom radu nisu se podjednako dobro rastvarali, što je naročito bilo izraženo kod modifikovanih uzoraka. Ostvareni rezultati sugerišu da je gubitak α -glukana i bočnih nizova β -glukana bio od presudnog značaja za rastvorljivost a time i antimikrobnu aktivnost. Primenom enzima verovatno je došlo i do konformacionih promena što je, takođe, moglo uticati na antimikrobno dejstvo. To može objasniti niske vrednosti dobijene u disk difuzionoj metodi.

Promenom polarnosti smanjuje se sposobnost rastvaranja u podlozi što može uticati na izostanak rezultata, tj. dobijanje nerealne slike. Klančnik i saradnici (2010) potvrđuju da ova metoda nije pogodna kod testiranja prirodnih supstanci jer su one često nerastvorne ili teško rastvorne u vodi. Takođe, u vodi rastvorne komponente koje su prisutne u smešama ekstrakata, a koje nemaju antimikrobno dejstvo mogu brže i potpunije difundovati kroz agar i na taj način uzrokovati lažno negativne rezultate (Klaus et al., 2015). Testirani ekstrakti bili su sirovi polisaharidi u kojima je prisutna veća količina drugih molekula, pa je ukupni efekat rezultat složenog sistema čije se pojedinačne komponente ne mogu kontrolisati. Ovakvi rezultati bili su prisutni i kod drugih autora (Ren et al., 2014). Jako antimikrobno dejstvo gljive *F. fomentarius* zapaženo je prema *P. aeruginosa*. Vreli alkalni ekstrakt uslovio je pojavu inhibitorne zone čiji je prečnik iznosio 15.0 ± 0.0 mm. Do istih rezultata došli su i Suay i saradnici (2000) koristeći metanolni ekstrakt micelijuma gljive *F. fomentarius*.

5.8.1.2. Antimikrobna aktivnost gljive *Auricularia auricula-judae*

Primenom disk difuzione metode utvrđeno je da ekstrakti gljive *A. auricula-judae* poseduju antimikrobno dejstvo ali je ono znatno slabije u poređenju sa tetraciklinom. Najefikasnijim se pokazao alkalni ekstrakt i to prema bakteriji *L. monocytogenes*, 12.1 ± 0.7 mm (Tabela 12.). Osim toga, alkalni ekstrakt bio je efikasan i prema *E. faecalis*, 12.8 ± 0.5 mm. Enzimski tretirani ekstrakti imali su vidno slabije dejstvo u odnosu na sirove polisaharidne ekstrakte. U mnogim slučajevima nije zapažena pojava zone inhibicije, što ne znači nužno da supstanca nema antimikrobni efekat (Moreno et al., 2006).

Najefikasniji je bio modifikovani alkalni ekstrakt. U većini slučajeva nije ni zabeleženo postojanje zone inhibicije što je verovatno posledica slabije rastvorljivosti modifikovanih ekstrakata. Koliko je rastvorljivost važna za biološku funkciju ekstrakata gljiva navode i Wasser i Weis (1999): β -glukan iz *A. auricularia-judae* je slabo rastvoran u vodi što se može korigovati metilovanjem, hidrosimetilovanjem, Smitovom degradacijom i drugim postupcima. Gubitak bočnih nizova sa α -glikozidnom vezom i ovde se pokazao

kao ključan za rastvorljivost ekstrakta a time i antimikrobnu aktivnost. Veća osetljivost Gram pozitivnih u odnosu na Gram negativne bakterije nije uočena.

Ova metoda ne pruža uvid u konkretan antimikrobni mehanizam, već je moguće da su zapaženi rezultati posledica kombinacije više mehanizama među kojima je rastvorljivost, tj. hidrofilnost jedan od najznačajnijih.

Tabela 11. Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljive *F. fomentarius* određena disk difuzionom metodom^{A, B, C}

mikroorganizam	FV	FA	FP	MFV	MFA	MFP	Tetraciklin
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	12.3 ± 0.5 ^a	17.0 ± 0.2 ^b	8.5 ± 0.0 ^c	-	8.2 ± 0.8 ^c	-	30.0 ± 0.0 ^d
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	9.1 ± 0.4 ^a	7.4 ± 0.4 ^b	6.6 ± 0.6 ^c	-	-	-	16.0 ± 0.0 ^d
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	6.9 ± 0.5 ^a	5.3 ± 0.6 ^b	1.8 ± 0.7 ^c	-	-	-	16.0 ± 0.0 ^d
<i>Bacillus cereus</i> 10876	-	6.3 ± 0.4 ^a	4.5 ± 0.7 ^a	-	-	-	12.0 ± 0.0 ^b
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	7.9 ± 0.6 ^a	7.7 ± 0.8 ^a	6.3 ± 1.0 ^b	-	4.2 ± 0.7 ^c	-	15.3 ± 0.6 ^d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	11.2 ± 0.9 ^a	15.0 ± 0.0 ^b	12.0 ± 0.6 ^a	3.1 ± 0.8 ^c	7.4 ± 0.3 ^d	2.5 ± 0.9 ^e	19.2 ± 0.3 ^e
<i>Escherichiacoli</i> 25922	4.8 ± 0.1 ^a	6.2 ± 0.5 ^b	4.7 ± 0.7 ^a	1.8 ± 1.2 ^c	4.7 ± 0.6 ^a	2.1 ± 0.3 ^c	10.7 ± 0.6 ^d
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	10.1 ± 0.9 ^a	14.6 ± 0.5 ^b	12.3 ± 1.0 ^c	-	7.6 ± 0.0 ^d	4.1 ± 0.6 ^e	21.3 ± 0.6 ^f
<i>Proteus hauseri</i> 13315	10.5 ± 0.4 ^a	15.7 ± 0.2 ^b	11.0 ± 0.0 ^a	-	6.1 ± 0.2 ^c	9.3 ± 0.7 ^d	18.4 ± 0.4 ^e
<i>Shigella sonnei</i> 29930	6.2 ± 0.1 ^a	7.0 ± 1.0 ^b	6.0 ± 0.4 ^a	3.1 ± 0.7 ^c	4.8 ± 0.9 ^d	-	11.7 ± 0.6 ^e
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	17.4 ± 0.6 ^a	17.5 ± 0.8 ^a	14.6 ± 0.1 ^b	11.0 ± 0.3 ^c	-	10.8 ± 0.5 ^c	27.0 ± 0.0 ^d
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 35150	10.3 ± 0.5 ^a	15.4 ± 1.0 ^b	12.9 ± 0.4 ^c	-	-	-	33.0 ± 2.0 ^d
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-	-	-	-	-

^A Rezultati predstavljaju srednje vrednosti prečnika zone inhibicije (u mm) ± standardne devijacije (n=3)

^B Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa (p≤0.05).

^C FV, vrela vodeni ekstrakt; FA, sirovi alkalni ekstrakt; FP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MFV, modifikovani vodeni ekstrakt; MFA, modifikovani alkalni ekstrakt; MFP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

- Ekstrakt nije ispoljio antimikrobno dejstvo

5.8.1.3. Antimikrobna aktivnost gljive *Sparassis crispa*

Ekstrakti gljive *S. crispa* bili su efikasniji prema Gram pozitivnim bakterijama, premda je efekat zabeležen i prema *S. enteritidis*, a dijametar zone inhibicije bio je relativno blizak dijimetru izmerenom pri dodatku tetraciklina, 18.1 ± 0.5 . Najjače delovanje ispoljio je vreli alklni ekstrakt koji je bio efikasan prema većini testiranih mikroorganizama (Tabela 13.). Slični rezultati zapaženi su i kod mikro i makrodilucione metode na osnovu čega se može zaključiti da je ovaj način ekstrakcije pogodovao dobijanju veće količine antimikrobnih komponenata. Takođe, u literaturi se navodi da se alkalnom hidrolizom razara helikoidna struktura glukana ali da se time ne gubi biološka aktivnost (Synytsya i Novak, 2013). Naprotiv, alkalni ekstrakti sadrže linearne polisaharide što može uticati na bolju rastvorljivost (Synytsya i Novak, 2013). U uzorcima koji nisu bili modifikovani izmeren je viši sadržaj α -glukana, dok su kod enzimski tretiranih uzoraka oni u značajnoj meri eliminisani pa se može zaključiti da su α -glukani važni za antimikrobnu aktivnost ispitivanih gljiva. Enzimskom hidrolizom došlo je do uklanjanja α -glikozidne veze što se vidi i u smanjenom sadržaju ukupnih polisaharida (Rhee et al., 2008). Suay i saradnici (2000) su pri obimnom skriningu ekstrakata micelijuma gljiva utvrdili antimikrobno dejstvo *S. crispa* prema *B. cereus*. Njihovo zapažanje potvrđeno je i u ovom radu.

Tabela 12. Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljive *A. auricula-judae* određena disk difuzionom metodom^{A, B, C}

mikroorganizam	AV	AA	AP	MAV	MAA	MAP	Tetraciklin
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	14.3 ± 0.7 ^a	10.1 ± 0.9 ^b	9.8 ± 0.4 ^b	-	2.9 ± 0.4 ^c	-	30.0 ± 0.0 ^d
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	11.5 ± 0.6 ^a	12.8 ± 0.5 ^b	11.2 ± 0.8 ^a	9.4 ± 0.6 ^c	5.5 ± 0.4 ^d	7.1 ± 0.3 ^e	16.0 ± 0.0 ^f
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	-	3.9 ± 0.6 ^a	-	-	6.2 ± 0.3 ^b	1.5 ± 1.0 ^c	16.0 ± 0.0 ^d
<i>Bacillus cereus</i> 10876	-	5.7 ± 0.3 ^a	-	5.0 ± 0.4 ^b	7.6 ± 0.5 ^c	6.3 ± 0.6 ^a	12.0 ± 0.0 ^d
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	9.2 ± 0.8 ^a	12.1 ± 0.7 ^b	10.4 ± 0.2 ^c	-	-	-	15.3 ± 0.6 ^d
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	7.0 ± 1.0 ^a	15.8 ± 0.5 ^b	12.3 ± 0.6 ^c	-	6.6 ± 0.3 ^d	-	19.2 ± 0.3 ^e
<i>Escherichiacoli</i> 25922	3.7 ± 0.7 ^a	-	6.2 ± 0.3 ^b	-	-	-	10.7 ± 0.6 ^c
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	-	-	11.7 ± 0.9 ^a	-	-	-	21.3 ± 0.6 ^b
<i>Proteus hauseri</i> 13315	8.3 ± 0.0 ^a	4.6 ± 0.6 ^b	6.8 ± 0.5 ^c	-	-	-	18.4 ± 0.4 ^d
<i>Shigella sonnei</i> 29930	7.2 ± 0.4 ^a	7.6 ± 0.2 ^a	7.4 ± 0.6 ^a	2.3 ± 0.7 ^b	-	-	11.7 ± 0.6 ^c
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	9.8 ± 0.5 ^a	14.7 ± 0.9 ^b	10.0 ± 0.3 ^a	-	-	-	27.0 ± 0.0 ^c
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 35150	14.6 ± 0.7 ^a	15.4 ± 0.3 ^b	15.1 ± 0.6 ^b	-	-	-	33.0 ± 2.0 ^d
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-	-	-	-	-

^A Rezultati predstavljaju srednje vrednosti prečnika zone inhibicije (u mm) ± standardne devijacije (n=3)

^B Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa (p≤0.05).

^C AV, vreli vodeni ekstrakt; AA, sirovi alkalni ekstrakt; AP, delimično prečišćeni vodeni ekstrakt; MAV, modifikovani vodeni ekstrakt; MAA, modifikovani alkalni ekstrakt; MAP, modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt.

⁻ Ekstrakt nije ispoljio antimikrobno dejstvo.

Najveći problem pri eliminaciji patogenih mikroorganizmima predstavlja rezistentnost (Ren et al., 2014). Ovaj termin označava sposobnost bakterija da se adaptiraju i prilagode na po njih štetne supstance (antibiotike). Mikrobna rezistentnost jedan je od vodećih problema na polju zaštite zdravlja, a posledica je prirodne sposobnosti mikroorganizama da mutiraju. Drugi razlog je zloupotreba antibiotika koja se ogleda u njihovoj neregulisanosti i neadekvatnoj primeni. Osim toga, hrana često sadrži ostatke antibiotika koji se koriste u ishrani životinja. Nova regulativa na ovom polju dovela je do promena ali još uvek u nedovoljnoj meri. Zato će potreba za novim antimikrobnim supstancama uvek postojati, a ispitivanje gljiva kao potencijalnih izvora antimikrobnih molekula postalo je neophodnost za čovečanstvo.

Više gljive, naročito razdeo *Basidiomycetes*, stvaraju brojna jedinjenja (sekundarne metabolite ali i strukturne komponente) koja ispoljavaju antimikrobno dejstvo (Ren et al., 2014). Početkom XXI veka sprovedena je opsežna studija koja je za cilj imala ispitivanje antimikrobnog potencijala viših gljiva (Suay et al., 2000). Tom prilikom pokazalo se da je 73% izolata iz reda *Ganodermatales* ispoljilo antimikrobno delovanje. Redovi *Agaricales*, *Boletales*, *Polyporales* i *Stereales* su imali između 46 i 49% aktivnih izolata, a redovi *Hymenochaetales* i *Lycoperdales* od 11 do 30%. Kao dve glavne grupe jedinjenja sa antimikrobnim efektom označeni su polisaharidi i triterpeni (Ren et al., 2014).

Dominantna komponenta ispitivanih ekstrakata gljiva bili su polisaharidi-biomolekuli velikih molekularnih masa koji slabo difunduju kroz agar. Stoga su zapaženi rezultati, koji nisu saglasni sa druge dve metode za ispitivanje antimikrobne aktivnosti, bili očekivani i u funkciji hidrofiliteta datih ekstrakata. Osim polisaharida ekstrakti su sadržali i druga jedinjenja, poput polifenola i proteina, koja su takođe mogla uticati na sposobnost difuzije i antimikrobno dejstvo.

Disk difuzioni metod omogućio je dobijanje preliminarnih rezultata, tj. ukazao je na antimikrobni potencijal ekstrakata ispitivanih gljiva. Zona inhibicije je u mnogim slučajevima izostala. Brojni nedostaci ove metode, među kojima u prvom redu uticaj različitog stepena hidrofiliteta komponenta ekstrakata, iziskivali su primenu drugih, pouzdanijih i preciznijih metoda.

Tabela 13. Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljive *S. crispa* određena disk difuzionom metodom^{A, B, C}

Mikroorganizam	SV	SA	MSV	MSA	Tetraciklin
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	-	12.4 ± 0.6 ^a	-	-	30.0 ± 0.0 ^b
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	11.7 ± 0.4 ^a	9.5 ± 0.2 ^b	-	6.1 ± 0.6 ^c	16.0 ± 0.0 ^d
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	7.4 ± 0.5 ^a	9.9 ± 0.6 ^b	-	-	16.0 ± 0.0 ^c
<i>Bacillus cereus</i> 10876	9.2 ± 0.5 ^a	11.2 ± 0.6 ^b	6.1 ± 0.4 ^c	7.5 ± 0.3 ^d	12.0 ± 0.0 ^e
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	-	9.5 ± 0.4 ^a	6.3 ± 0.8 ^b	-	15.3 ± 0.6 ^c
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	-	4.8 ± 0.3 ^a	-	-	19.2 ± 0.3 ^b
<i>Escherichiacoli</i> 25922	-	2.6 ± 0.9 ^a	-	-	10.7 ± 0.6 ^b
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	16.6 ± 0.7 ^a	18.1 ± 0.5 ^b	8.9 ± 0.3 ^c	12.7 ± 0.5 ^d	21.3 ± 0.6 ^e
<i>Proteus hauseri</i> 13315	-	-	-	-	18.4 ± 0.4
<i>Shigella sonnei</i> 29930	-	-	-	-	11.7 ± 0.6
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	6.3 ± 0.6 ^a	14.5 ± 0.8 ^b	10.7 ± 0.6 ^c	-	27.0 ± 0.0 ^d
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 35150	-	-	-	-	33.0 ± 2.0
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-	-	-

^A Rezultati predstavljaju srednje vrednosti prečnika zone inhibicije (u mm) ± standardne devijacije (n=3)

^B Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

^C SV, vrelí vodeni ekstrakt; SA, sirovi alkalni ekstrakt; MSV, modifikovani vodeni ekstrakt; MSA, modifikovani alkalni ekstrakt.

⁻ Ekstrakt nije ispoljio antimikrobno dejstvo.

5.8.2. Mikrodilucioni metod

Mikrodilucioni metod je brz i osetljiv postupak za utvrđivanje minimalnih inhibitornih koncentracija ekstrakata (MIC) biljaka, ali i gljiva, na različite Gram pozitivne i Gram negativne bakterije (Eloff, 1998). Ova metoda je uobičajena u istraživačkoj praksi. Pogodna je za rad sa bakterijama i gljivama koje karakteriše brz metabolizam i rast, kakvi su i brojni patogeni poreklom iz hrane (Muraina et al., 2009).

5.8.2.1. Antimikrobna aktinost gljive *Fomes fomentarius*

Mikrodilucioni metod je pokazao da ekstrakti gljive *F. fomentarius* ispoljavaju antimikrobno dejstvo podjednako prema Gram pozitivnim i Gram negativnim vrstama bakterija. Enzimski modifikovani ekstrakti su se pokazali kao slabiji prema svim testiranim vrstama bakterija (Tabela 14). Najjače antimikrobno dejstvo ispoljili su sirovi vodeni i alkalni ekstrakt prema *L. monocytogenes* (MIC = 0.039 mg/ml). Vreli vodeni ekstrakt imao je i najnižu mikrobicidnu vrednost (1.25 mg/ml) prema istoj bakteriji. Kao jako osetljivi prema ekstraktima gljive *F. fomentarius* pokazali su se i sojevi *E. faecalis*, *P. hauseri* i *Y. enterocolitica*. Minimalne inhibitorne koncentracije su se u ovim slučajevima kretale od 0.312 do 0.625 mg/ml. Modifikovani ekstrakti su bili najefikasniji prema *S. aureus*, mada su efektivne koncentracije bile 4-8 puta niže nego u slučaju ekstrakata koji nisu prošli enzimski tretman. Sirovi ekstrakti su bili najmanje efikasni prema *E. coli* i *E. coli* O157:H7. Minimalna inhibitorna koncentracija MFV i MFP nije zabeležena prema *L. monocytogenes*, a kod MFA prema *Y. enterocolitica*, u okviru testiranih koncentracija. Ni jedan od ekstrakata nije pokazao aktivnost prema kvascima. Kolundžić i saradnici (2016) su testirali antimikrobni efekat više različitih tipova ekstrakata gljive *F. fomentarius*. Utvrdili su antimikrobno dejstvo prema *S. aureus*, *E. faecalis* i *E. coli* pri čemu je MIC vrednost za vodeni ekstrakt u sva tri slučaja iznosila 0.125 mg/ml, što je blisko vrednostima zabeleženim u ovom radu.

Tabela 14. Antibakterijska i antifungalna aktivnost ekstrakata gljive *F. fomentarius* izražena kao MIC (mg/ml), MBC (mg/ml) i MFC (mg/ml), određena mikrodilucionom metodom

mikroorganizam		FV	FA	FP	MFV	MFA	MFP
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	1.25 ^{a*} , ^A	0.625 ^b	5.0 ^c	5.0 ^c	5.0 ^c	10.0 ^d
6538	MBC	5.0 ^a	2.5 ^b	20.0 ^c	20.0 ^c	10.0 ^d	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	MIC	0.156 ^a	0.312 ^b	0.156 ^a	20.0 ^c	10.0 ^d	20.0 ^c
29212	MBC	2.5 ^a	5.0 ^b	5.0 ^b	-	40.0 ^c	-
<i>Geobacillus</i>	MIC	5.0 ^a	1.25 ^b	10.0 ^c	-	40.0 ^d	-
<i>stearothermophilus</i> 7953	MBC	-	20.0	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> 10876	MIC	1.25 ^a	0.312 ^b	1.25 ^a	20.0 ^c	10.0 ^d	40.0 ^e
	MBC	20.0 ^a	10.0 ^b	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	0.039 ^a	0.039 ^a	0.625 ^b	-	5.0 ^c	-
19115	MBC	2.5 ^a	1.25 ^b	5.0 ^c	-	40.0 ^d	-
<i>Pseudomonas</i>	MIC	2.5 ^a	0.625 ^b	1.25 ^c	40.0 ^d	10.0 ^e	40.0 ^d
<i>aeruginosa</i> 27853	MBC	-	10.0 ^a	20.0 ^b	-	-	-
<i>Escherichiacoli</i> 25922	MIC	10.0 ^a	5.0 ^b	10.0 ^a	40.0 ^c	10.0 ^a	40.0 ^c
	MBC	-	20.0	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	MIC	2.5 ^a	0.625 ^b	1.25 ^c	40 ^d	5 ^e	20 ^f
13076	MBC	-	2.5 ^a	10.0 ^b	-	-	-
<i>Proteus hauseri</i> 13315	MIC	0.312 ^a	0.312 ^a	0.625 ^b	40.0 ^c	10.0 ^d	5.0 ^e
	MBC	5.0 ^a	2.5 ^b	5.0 ^a	-	-	20.0 ^c
<i>Shigella sonnei</i> 29930	MIC	2.5 ^a	1.25 ^b	2.5 ^a	40.0 ^c	20.0 ^d	40.0 ^c
	MBC	-	10.0	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC	0.312 ^a	0.312 ^a	0.625 ^b	10.0 ^c	-	10.0 ^c
27729	MBC	5.0 ^a	5.0 ^a	10.0 ^b	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MIC	10.0 ^a	2.5 ^b	5.0 ^c	20.0 ^d	20.0 ^d	40.0 ^e
(0157:H7) 35150	MBC	-	10.0	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 24443	MIC	-	-	-	-	-	-
	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i>	MIC	-	-	-	-	-	-
<i>neoformans</i> 76484	MBC	-	-	-	-	-	-

* Standardne devijacije nisu prikazane pošto su rezultati sva tri ponavljanja bili isti.

^A Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

Posebno je značajan podatak da su ekstrakti gljive *F. fomentarius* bili izrazito aktivni prema *E. faecalis*, bakteriji koja je multirezistentna i izaziva nozokomijalne (bolničke) infekcije. Navodi se da godišnje u EU 4.1 milion pacijenata ima probleme povezane sa ovom bakterijom (Alves et al., 2012).

Snažno antimikrobno dejstvo vrelog vodenog i alkalnog ekstrakta može se pripisati visokom sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja, sadržaju ukupnih, α i β -glukana, ali i njihovom međusobnom odnosu (Alves et al., 2013; Zhu et al., 2015). Osim količine fenolnih jedinjenja za antimikrobnu aktivnost od značaja je i konkretan polifenolni profil, udeo pojedinih fenolnih komponenata, i njihova struktura (Cetin-Karaca i Newman, 2015). Dovođenjem u vezu antimikrobnog efekta i hemijskog sastava ekstrakata uočava se da enzimaska modifikacija vodi slabljenju ili gubitku antimikrobnog dejstva. Kako je suština enzimskih tretmana bila uklanjanje bočnih nizova sa α -glikozidnom vezom može se tvrditi da se ova promena negativno odrazila na posmatranu biološku aktivnost, tj. da su modifikovani ekstrakti gubitkom α -glukana i bočnih lanaca u molekulima β -glukana izgubili antimikrobno dejstvo u značajnoj meri. Ren i saradnici (2014) navode da se antimikrobna aktivnost ekstrakata gljiva prema Gram pozitivnim bakterijama može pripisati polisaharidima prema kojima je ćelijski zid ovih bakterija propustljiviji.

Osim uklanjanja bočnih lanaca polisaharida, enzimaska modifikacija je uzorkovala i gubitak izvesne količine polifenolnih jedinjenja za koja je utvrđeno da ispoljavaju antimikrobno dejstvo prema Gram negativnim bakterijama, čime se može objasniti drastično slabiji efekat modifikovanih ekstrakata (Cetin-Karaca i Newman, 2015). Fenolna jedinjenja deluju i kao prooksidanti što dovodi do direktnih oksidativnih oštećenja bakterijskih ćelija (Kozarski et al., 2015). Prooksidativno delovanje fenolnih jedinjenja na lipidne komponente ćelijskog zida može biti jedan od načina na koji ekstrakti deluju na Gram negativne bakterije.

Primećeno je i da polisaharidi biljaka mogu delovati antimikrobno. Mazarei i saradnici (2017) su pokazali da polisaharidi izolovani iz listova kapra ispoljavaju jače antimikrobno dejstvo prema Gram negativnim bakterijama.

Kako su ekstrakti ispitivani u ovom radu kompleksna smeša polisaharida, fenolnih jedinjenja i proteina istovremeno se postiže širok spektar antimikrobnog delovanja.

5.8.2.2. Antimikrobna aktivnost gljive *Auricularia auricula-judae*

Ekstrakti gljive *A. auricula-judae* ispoljili su antimikrobno dejstvo prema svim testiranim vrstama bakterija. Kao i kod ekstrakata gljive *F. fomentarius*, efekat je bio prisutan kako prema Gram pozitivnim tako i prema Gram negativnim sojevima. Ipak, mikrobicidni efekat je u mnogim slučajevima izostao (Tabela 15.). Veća efikasnost zabeležena je kod ekstrakata koji nisu pretrpeli enzimski tretman. Najjače inhibitorno dejstvo ispoljili su vreli vodeni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakt prema *E. faecalis* (MIC vrednost je iznosila 0.039 mg/ml, za oba ekstrakta). Najniža minimalna baktericidna koncentracija zabeležena je prema istoj bakteriji i to u slučaju vrelog alkalnog ekstrakta (1.25 mg/ml). Ekstrakti su bili naročito efikasni prema bakteriji *S. sonnei*, pri čemu su MIC vrednosti išle od 0.625 do 1.25 mg/ml. Nijedan od ispitivanih ekstrakata nije imao MBC vrednost za *E. coli*, *S. enteritidis* i *E. coli* O157:H7. Najniža minimalna inhibitorna koncentracija zapažena je kod modifikovanog alkalnog ekstrakta (5 mg/ml) i to prema *B. cereus* i *P. aeruginosa*, kao i kod modifikovanog vodenog ekstrakta (5 mg/ml) prema *E. faecalis*.

Testirani ekstrakti nisu pokazali delovanje prema kvascima *C. albicans* i *C. neoformans*.

Hemijska karakterizacija pokazala je da je kod ekstrakata gljive *A. auricula-judae* došlo do kvalitativnih i kvantitativnih promena. Generalno gledano sadržaj β -glukana kod enzimski tretiranih ekstrakata se povećao (Tabela 6.). Međutim, ova promena nije se pozitivno odrazila na antimikrobnu aktivnost. To ukazuje da β -glukani nemaju presudnu ulogu kada je inhibicija rasta i mikrobicidno dejstvo u pitanju. Svi modifikovani ekstrakti imali su značajno manje ili su potpuno izgubili α -glukane. Osim toga, došlo je i do smanjenja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, što je u skladu sa efektima vezanim za

fenolne komponente ekstrakata gljiva i biljka zabeleženim od strane drugih autora (Cetin-Karaca i Newman, 2015).

Tabela 15. Antibakterijska i antifungalna aktivnost ekstrakata gljive *A. auricula-judae* izražena kao MIC (mg/ml), MBC (mg/ml) i MFC (mg/ml), određena mikrodilucionom metodom

mikroorganizam		AV	AA	AP	MAV	MAA	MAP
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	2.5 ^{a*} , A	10.0 ^b	10.0 ^b	40.0 ^c	10.0 ^b	40.0 ^c
6538	MBC	10.0	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	MIC	0.039 ^a	0.078 ^b	0.039 ^a	5.0 ^c	20.0 ^d	10.0 ^e
29212	MBC	2.5 ^a	1.25 ^b	2.5 ^a	20.0 ^c	-	-
<i>Geobacillus</i>	MIC	-	20 ^a	-	40.0 ^b	20 ^a	-
<i>stearothermophilus</i> 7953	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	40.0 ^a	10.0 ^b	40.0 ^a	20.0 ^c	5.0 ^d	10.0 ^b
10876	MBC	-	-	-	-	40.0	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	5.0 ^a	1.25 ^b	5.0 ^a	40.0 ^c	-	-
19115	MBC	20.0 ^a	10.0 ^b	20.0 ^a	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	MIC	10.0 ^a	0.625 ^b	5.0 ^c	40.0 ^d	5.0 ^c	40.0 ^d
<i>aeruginosa</i> 27853	MBC	-	10 ^a	-	-	20.0 ^b	-
<i>Escherichiacoli</i>	MIC	10.0 ^a	20.0 ^b	5.0 ^c	40.0 ^d	20.0 ^b	40.0 ^d
25922	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	MIC	20.0 ^a	40.0 ^b	10.0 ^c	20.0 ^a	20.0 ^a	10.0 ^c
13076	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus hauseri</i>	MIC	10.0 ^a	-	20.0 ^b	40.0 ^c	-	-
13315	MBC	20.0	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	MIC	0.625 ^a	1.25 ^b	0.625 ^a	40.0 ^c	20.0 ^d	40.0 ^c
29930	MBC	5.0 ^a	10.0 ^b	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC	5.0 ^a	2.5 ^b	20.0 ^c	-	20.0 ^c	40.0 ^d
27729	MBC	10.0	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	MIC	10.0 ^a	10.0 ^a	10.0 ^a	40.0 ^b	20.0 ^c	40.0 ^b
(0157:H7) 35150	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	MIC	-	-	-	-	-	-
24443	MBC	-	-	-	-	-	-
<i>Cryptococcus</i>	MIC	-	-	-	-	-	-
<i>neoformans</i> 76484	MBC	-	-	-	-	-	-

* Standardne devijacije nisu prikazane pošto su rezultati sva tri ponavljanja bili isti.

^A Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

5.8.2.3. Antimikrobna aktivnost gljive *Sparassis crispa*

Ekstrakti gljive *S. crispa* pokazali su značajno slabije antimikrobno dejstvo prema testiranim bakterijama u poređenju sa ekstraktima gljiva *F. fomentarius* i *A. auricula-judae*. Jače antimikrobno delovanje zapaženo je prema Gram pozitivnim bakterijama. Najefikasniji su bili vreli vodeni i alkalni ekstrakt i to prema *E. faecalis* (MIC je iznosila 0.156 mg/ml, za oba ekstrakta) i *B. cereus* (MIC vrednost je bila 0.156 mg/ml za vreli vodeni ekstrakt i 0.039 mg/ml za vreli alkalni ekstrakt). U većini slučajeva vreli alkalni ekstrakt ispoljio je jače antimikrobno dejstvo iskazano kroz niže minimalne inhibitorne koncentracije. Baktericidno dejstvo ekstrakti su pokazali prema *E. faecalis*, *G. stearothermophilus*, *B. cereus*, *S. enteritidis* i *Y. enterocolitica*. Modifikovani ekstrakti su u svim slučajevima bili značajno slabiji, a MIC vrednosti su se kretale od 10 do 40 mg/ml, a kod nekih uzoraka je mikrobistatički efekat prema pojedinim bakterijama potpuno izostao, imajući u vidu testirane koncentracije (maksimalno 40 mg/ml). U radu Suay et al. (2000) navodi se da je ekstrakt submerzno odgajenog *S. crispa* bio veoma efikasan prema *B. cereus*, što je u saglasnosti sa ovim istraživanjem, premda su oni za ispitivanje antimikrobnog efekta koristili disk difuzioni metod. Nowacka i saradnici (2014) su testirali antimikrobni efekat etanolnog ekstrakta gljive *S. crispa* koji je pokazao umerenu antimikrobnu aktivnost prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, MIC = 2.5 mg/ml. Ekstrakti gljive *S. crispa* su nakon enzimske modifikacije izgubili znatan deo α -glukana što se odrazilo i na antimikrobno delovanje. Ipak, evidentno je da su svi ekstrakti *S. crispa* bili slabiji nego ekstrakti druge dve gljive. Uvidom u hemijski sastav ekstrakata ove gljive zapaža se da nisu sadržali fenolna jedinjenja, pa je i ovo dokaz njihovog značaja za antimikrobni efekat gljiva.

Tabela 16. Antibakterijska i antifungalna aktivnost ekstrakata gljive *S. crispa* izražena MIC (mg/ml), MBC (mg/ml) i MFC (mg/ml), određena mikrodilucionom metodom

mikroorganizam		SV	SA	MSV	MSA
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	20.0 ^{a*} A	10.0 ^b	20.0 ^a	10.0 ^b
6538	MBC	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	MIC	0.156 ^a	0.156 ^a	20.0 ^b	10.0 ^c
29212	MBC	5.0 ^a	10.0 ^b	-	-
<i>Geobacillus</i>	MIC	5.0 ^a	2.5 ^b	-	40.0 ^c
<i>stearothermophilus</i> 7953	MBC	-	10.0	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	0.156 ^a	0.039 ^b	20.0 ^c	10.0 ^d
10876	MBC	5.0 ^a	2.5 ^b	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	20.0 ^a	10.0 ^b	20.0 ^a	40.0 ^c
19115	MBC	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	20.0 ^a	10.0 ^b	-	-
27853	MBC	-	-	-	-
<i>Escherichiacoli</i>	MIC	20.0 ^a	10.0 ^b	20.0 ^a	40.0 ^c
25922	MBC	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	MIC	5.0 ^a	2.5 ^b	20.0 ^c	10.0 ^d
13076	MBC	10.0	-	-	-
<i>Proteus hauseri</i>	MIC	20.0 ^a	-	20.0 ^a	40.0 ^b
13315	MBC	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	MIC	40.0 ^a	40.0 ^a	-	40.0 ^a
29930	MBC	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MIC	20.0 ^a	5.0 ^b	10.0 ^c	40.0 ^d
27729	MBC	-	20	-	-
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7)	MIC	40.0 ^a	20.0 ^b	-	40.0 ^a
35150	MBC	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	MIC	-	-	-	-
24443	MBC	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	MIC	-	-	-	-
76484	MBC	-	-	-	-

* Standardne devijacije nisu prikazane pošto su rezultati sva tri ponavljanja bili isti.

^A Vrednosti unutar iste kolone, obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju na osnovu jednofaktorske analize varijanse i Tukey HSD testa ($p \leq 0.05$).

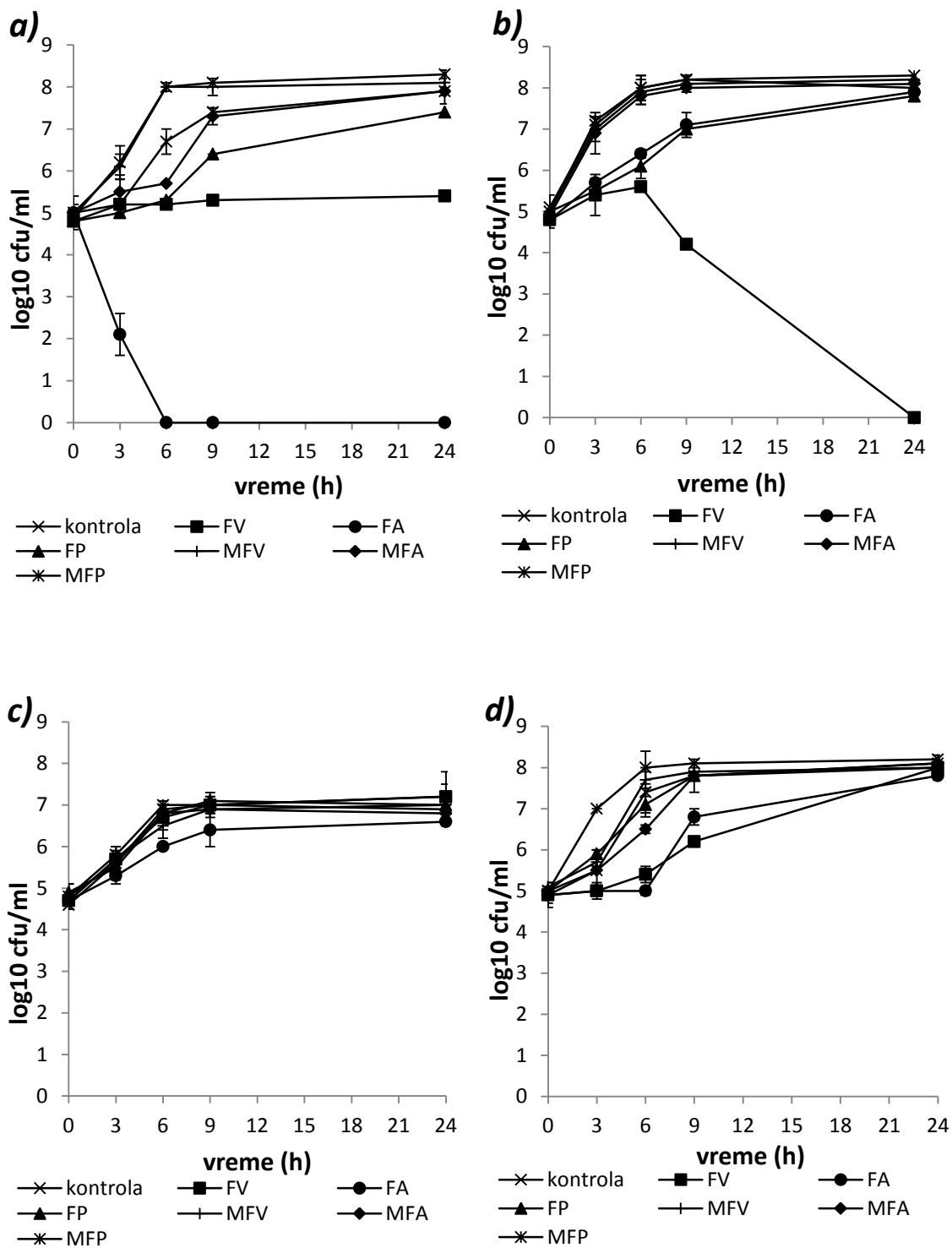
Jednoobrazno ponašanje ekstrakata zavisno od tipa ekstrakcije i hemijskog sastava (kvalitativnog i kvantitativnog) nije uočeno. Različiti antimikrobni efekat ekstrakata ispitivanih gljiva može se pripisati i konkretnom sadržaju ukupnih, α - i β -glukana, ukupnih fenolnih jedinjenja i proteina, ali i drugih jedinjenja, poput fomentariola karakterističnog za *F. fomentarius*, za koji je poznato da ima bakteriostatičko dejstvo, a koja nisu obuhvaćena ovim radom (Peintner et al., 1998). Pojedine komponente mogu se dovesti u vezu sa konkretnim efektom ali se ne može izvući zaključak o mehanizmima delovanja. Ren i saradnici (2014) navode moguće razloge antimikrobnog delovanja ekstrakata gljiva. Oni ističu da su Gram pozitivne bakterije manje otporne usled drugačije građe ćelijskog zida i odsustva spoljne membrane. Naročito su osetljive prema polisaharidima, kao hidrofilnim molekulima. Polisaharidi stimulišu fagocitozu, a antimikrobni efekat može biti i posledica površinske interakcije koja je rezultat naelektrisanja. Pozitivno naelektrisani polisaharidi mogu formirati eksternu barijeru ali i vršiti supresiju esencijalnih nutrijenata za mikrobni rast.

5.8.3. Makrodilucioni metod

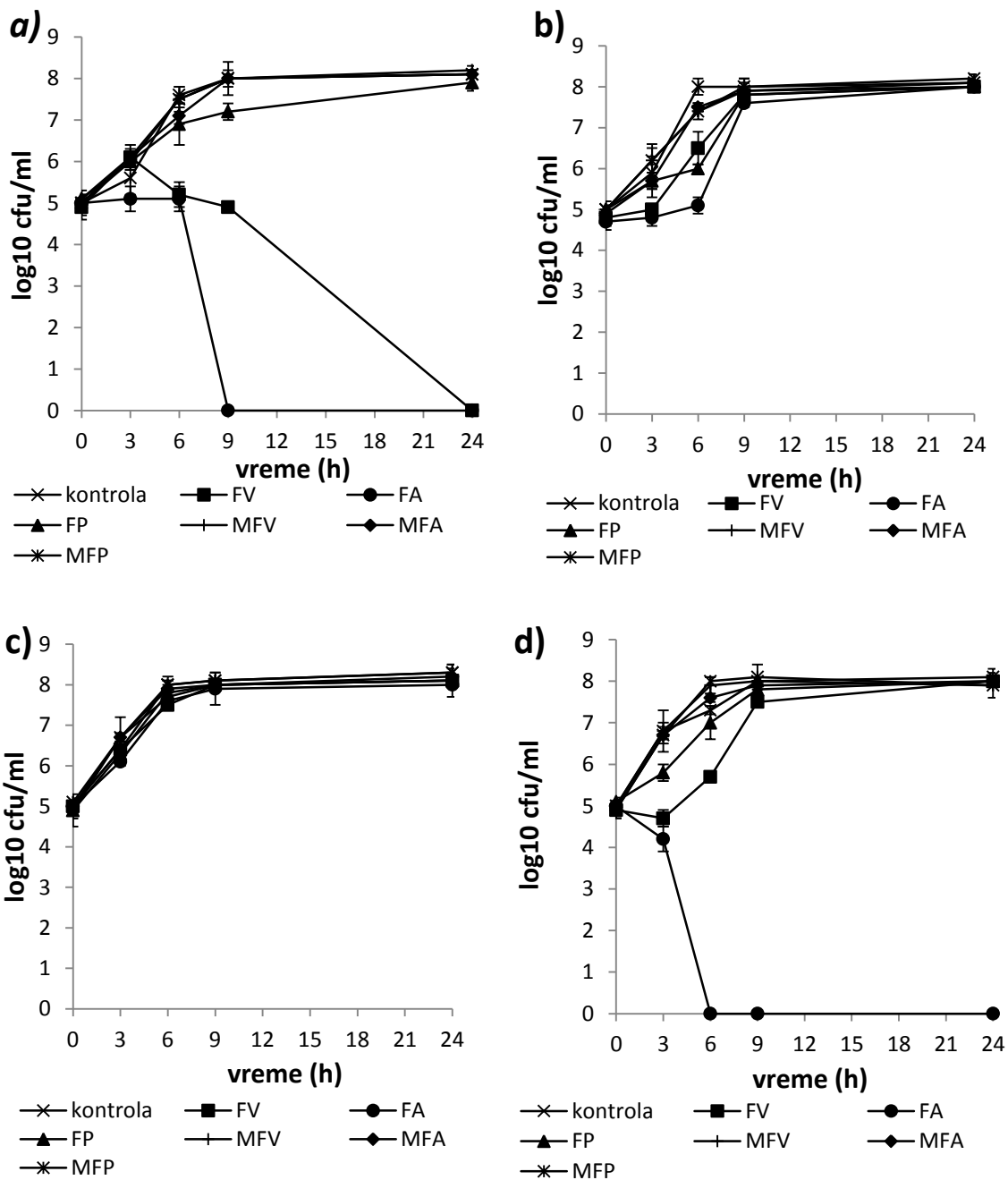
Makrodilucioni metod je korišćen u cilju praćenja kinetike rasta, tj. inhibicije rasta ispitivanih mikroorganizama. Kako su rezultati disk difuzione metode i mikrodilucione metode bili različiti, makrodilucioni metod je poslužio i da se provere ustanovljene MIC/MBC vrednosti. Klančnik i saradnici (2010) predlažu korišćenje mikrodilucione metode za utvrđivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) a makrodilucioni metod za potvrdu MIC testirane supstance.

5.8.3.1. Antimikrobna aktinost gljive *Fomes fomentarius*

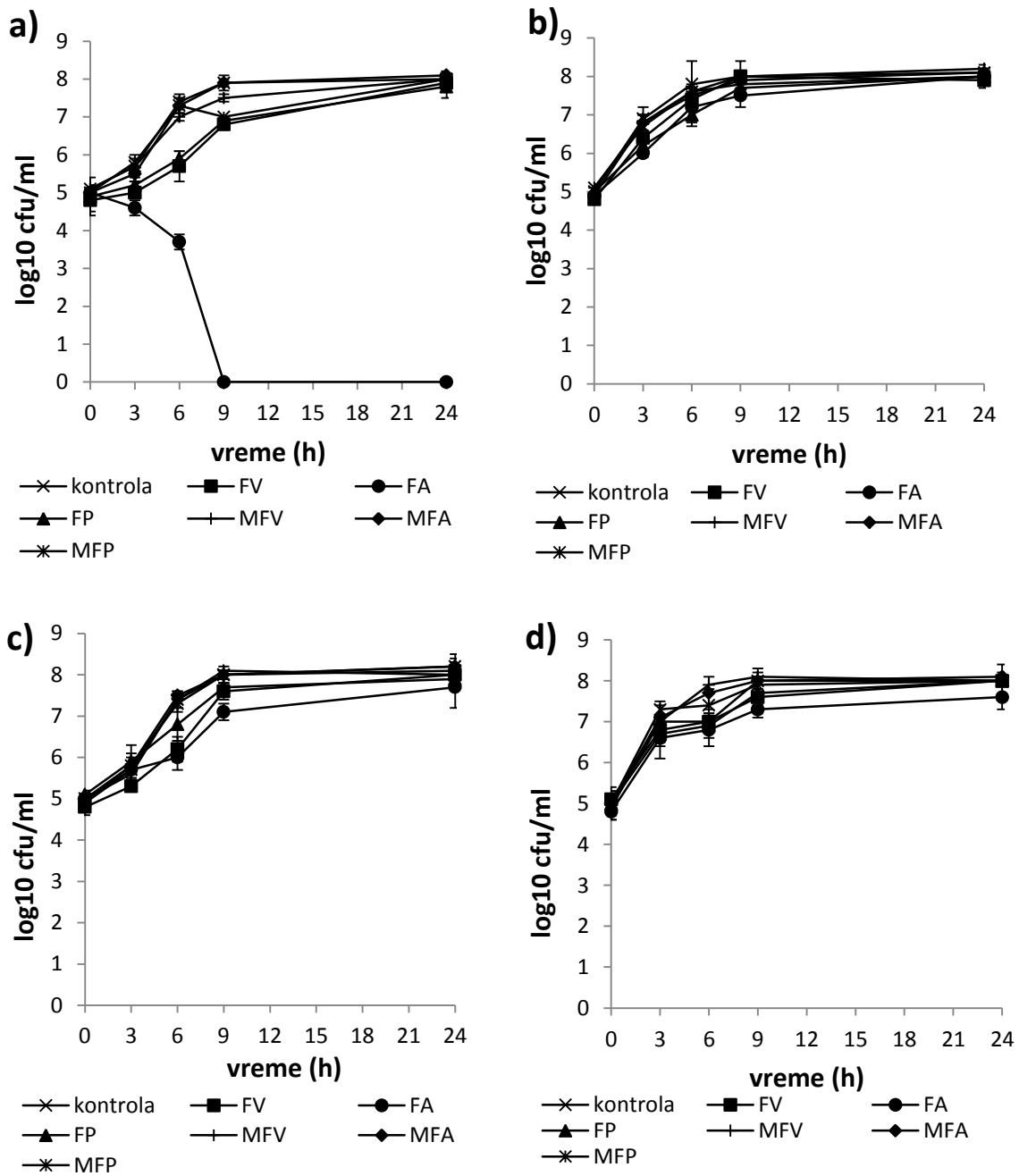
Nijedan od testiranih uzoraka gljive *F. fomentarius* nije ispoljio antimikrobno dejstvo prema kvascima *Candida albicans* i *Cryptococcus neoformans*. Rezultati dobijeni pomoću ove metode bili su u saglasnosti sa rezultatima mikrodilucionog testa.



Slika 12. Kinetika rasta a) *Staphylococcus aureus* 6538, b) *Enterococcus faecalis* 29212, c) *Geobacillus stearothermophilus* 7953 i d) *Bacillus cereus* 10876, u prisustvu ekstrakata gljive *F. fomentarius*.



Slika 13. Kinetika rasta a) *Listeria monocytogenes* 19115, b) *Pseudomonas aeruginosa* 27853, c) *Escherichia coli* 25922 i d) *Salmonella enteritidis* 13076, u prisustvu ekstrakata gljive *F. fomentarius*.



Slika 14. Kinetika rasta a) *Proteus hauseri* 13315, b) *Shigella sonnei* 29930, c) *Yersinia enterocolitica* 27729 i d) *Escherichia coli* 0157:H7 35150, u prisustvu ekstrakata gljive *F. fomentarius*.

Na sve testirane mikroorganizme primenjena je ista koncentracija ekstrakata, 2.5 mg/ml. Sirovi polisaharidni ekstrakti gljive *F. fomentarius* pokazali su se kao nadmoćni antimikrobni agensi u odnosu na enzimski tretirane.

Sirovi alkalni ekstrakt ispoljio je efekat na *S. aureus* odmah po dodavanju tako da već nakon 6 h nije bilo vijabilnih ćelija (Slika 12.). Sirovi vodeni ekstrakt delovao je na istu bakteriju bakteriostatički, dok je MFP ispoljio stimulatívno dejstvo koje se manifestovalo intenzivnim rastom *S. aureus* u odnosu na kontrolu.

FV je delovao baktericidno na *E. faecalis* a dinamika rasta (Slika 12.) ukazuje da je mikroorganizam uspevao da se razvija neko vreme, ali da je nakon 6 h došlo do naglog pada broja vijabilnih ćelija i dalje se nastavilo do potpunog uništenja ćelija ove bakterije. Testiranjem antimikrobne sposobnosti pomoću mikrodilucione metode ustnaovljeno je da MBC iznosi 2.5 mg/ml. Makrodilucionim testom je ovaj rezultat potvrđen. FA i FP su u izvesnoj manjoj meri inhibirali rast *E. faecalis*, dok kod modifikovanih uzoraka nije zabeležena antimikrobna aktivnost pri koncentraciji od 2.5 mg/ml. MIC vrednosti za ovu bakteriju bile su veoma niske, 0.312 mg/ml pri dodatku FA i 0.156 mg/ml kada se doda FP. Zato je bilo očekivano da supresija rasta bude intenzivnija, mada je rast bio značajno slabiji u odnosu na kontrolni uzorak.

Sporogene bakterije *G. stearothermophilus* i *B. cereus* bile su otporne prema ekstraktima *F. fomentarius*, pri čemu su FV i FA postigli inhibiciju tokom lag faze rasta *B. cereus*. Ipak, posle 12 h ćelije ove bakterije su uspele da se adaptiraju, nastave svoj životni ciklus, da bi nakon 24 h njihov broj bio isti kao kod kontrole.

L. monocytogenes bila je osetljiva na sirove polisaharidne ekstrakte, FV i FA, pri čemu je FA bio nešto efikasniji i smanjenje brojnosti bakterijske populacije se javilo ranije nego kada je bakterija inkubirana sa FV (Slika 13.). Oba pomenuta ekstrakta uništala su *L. monocytogenes* za 24 h. Antimikrobno dejstvo modifikovanih ekstrakata nije zabeleženo pri testiranoj koncentraciji, što se poklapa i sa rezultatima datim u Tabeli 14.

Makrodilucionim postupkom dokazana je sposobnost sirovih polisaharidnih ekstrakata *F. fomentarius* da inhibiraju rast *P. aeruginosa* tokom 9 h. Sa druge strane *E. coli* nije bila pogođena dodatkom ekstrakata i nesmetano se razvijala.

Ispitujući kinetiku rasta *S. enteritidis* u prisustvu ekstrakata *F. fomentarius* utvrđeno je da FA deluje mikrobicidno odmah po dodavanju u medijum za rast. FV i FP delovali su inhibitorno tokom prvih 9 h. Modifikovani ekstrakti nisu delovali pri koncentraciji od 2.5 mg/ml. Jako mikrobicidno dejstvo demonstrirano od strane FA na *P. hauseri* u mikrodilucionom testu i ovde je potvrđeno; broj ćelija se značajno smanjivao odmah nakon što je ekstrakt dodat.

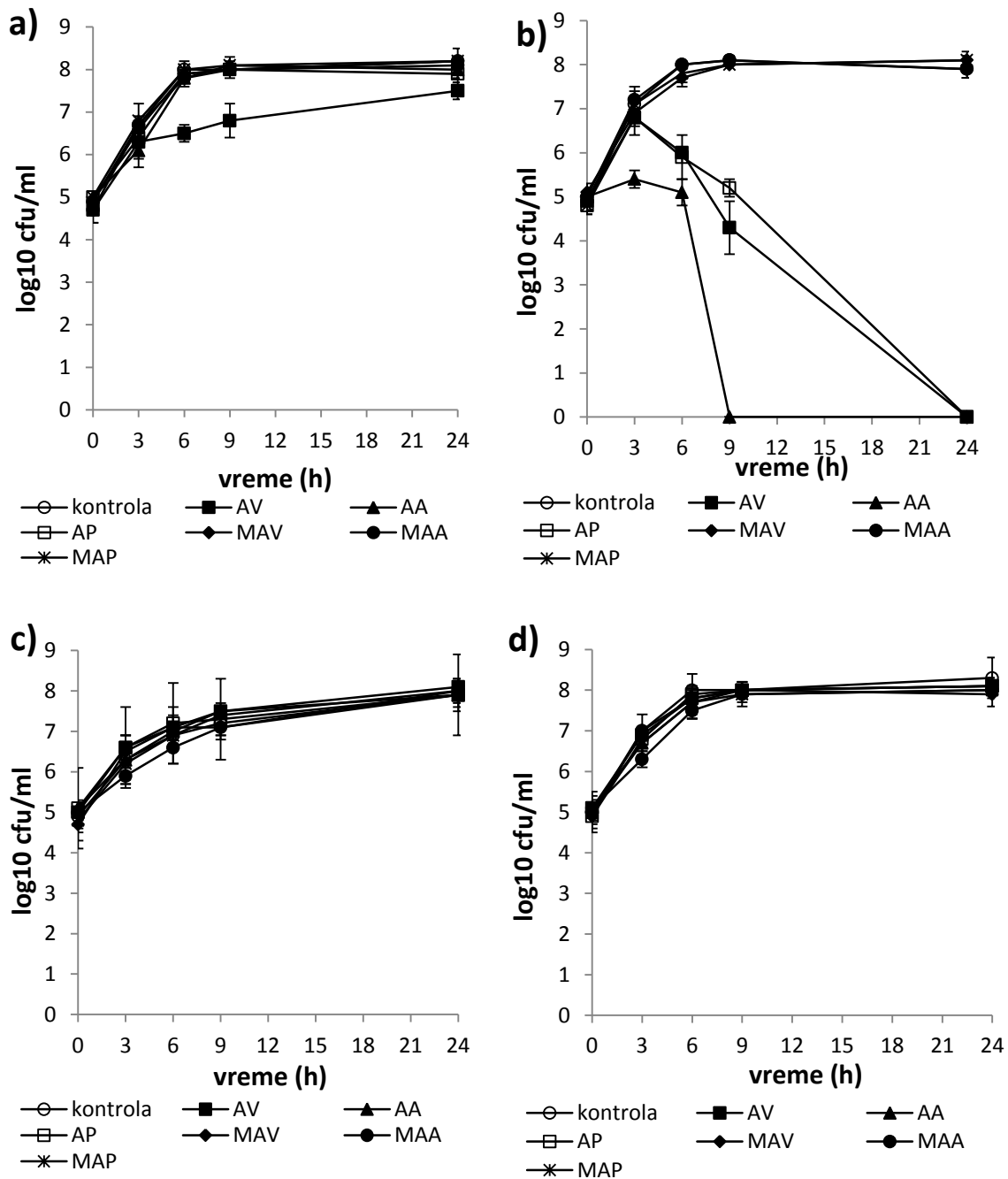
Kinetika rasta *S. sonnei* i *E. coli* O157:H7 nije bila značajno narušena dodavanjem ekstrakata *F. fomentarius*, dok je u slučaju *Y. enterocolitica* registrovano slabo inhibitorno delovanje FV, FA i FP (Slika 14.).

5.8.3.2. Antimikrobna aktivnost gljive *Auricularia auricula-judae*

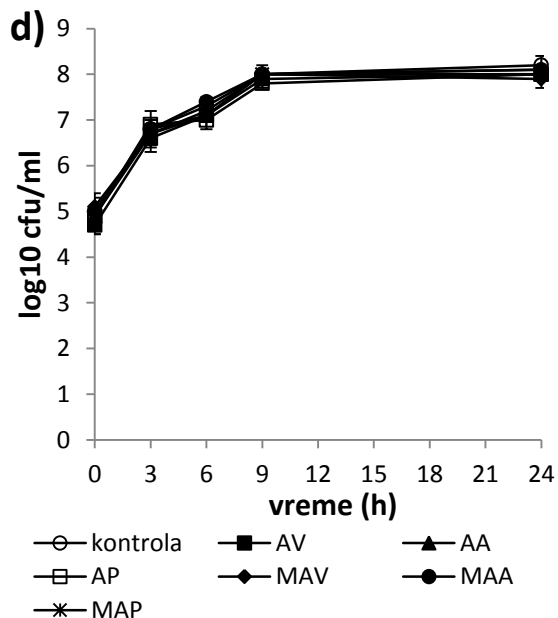
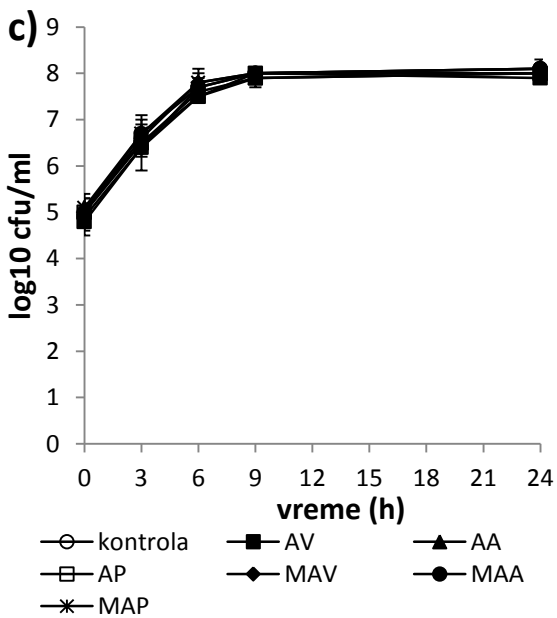
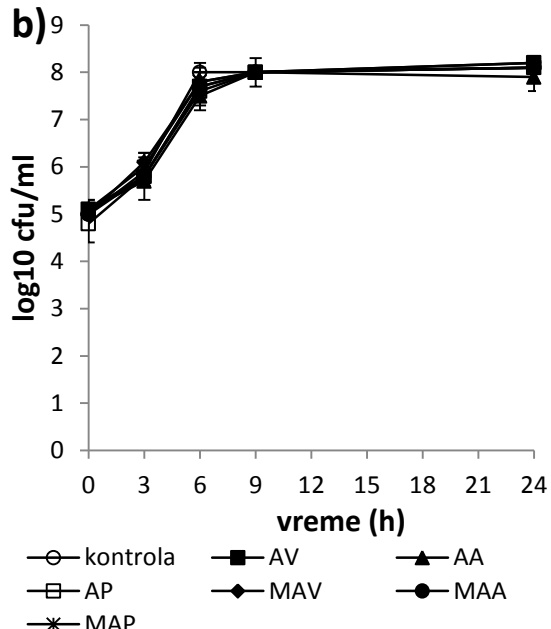
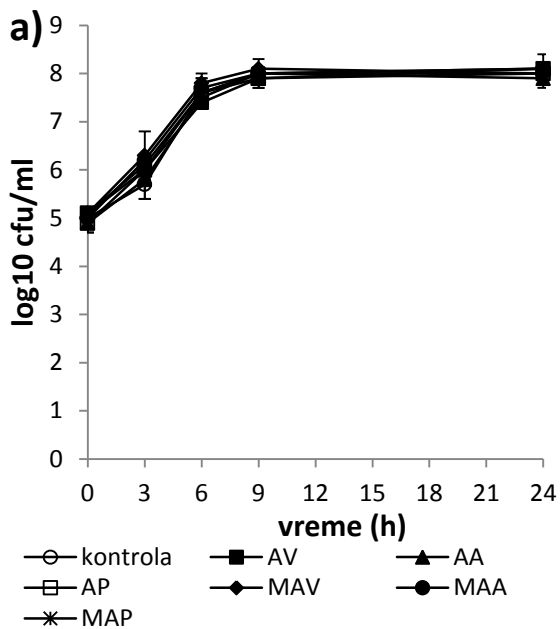
Snažno mikrobicidno delovanje ekstrakata gljive *A. auricula-judae* zabeleženo je prema bakteriji *E. faecalis* što su pokazali i rezultati mikrodilucione metode (Tabela 15.). Sve do 6 h bakterijska populacija odoleva prisustvu ekstrakata, da bi nakon 6 h došlo do drastičnog pada brojnosti populacije, naročito pri inkubiranju sa sirovim alkalnim ekstraktom (Slika 15.). Vodeni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakt su takođe delovali mikrobicidno. U početku se bakterija razvijala nesmetano, a redukcija broja ćelija se javila nakon 3 h.

Sirovi vodeni ekstrakt inhibirao je i rast *S. aureus*, mada nakon 9 h populacija počinje da se oporavlja, da bi nakon 24 h broj ćelija bio blizak broju registrovanom u kontrolnom uzorku. Modifikovani ekstrakti nisu delovali antimikrobno na *S. aureus* i *E. faecalis* pri ispitivanoj koncentraciji.

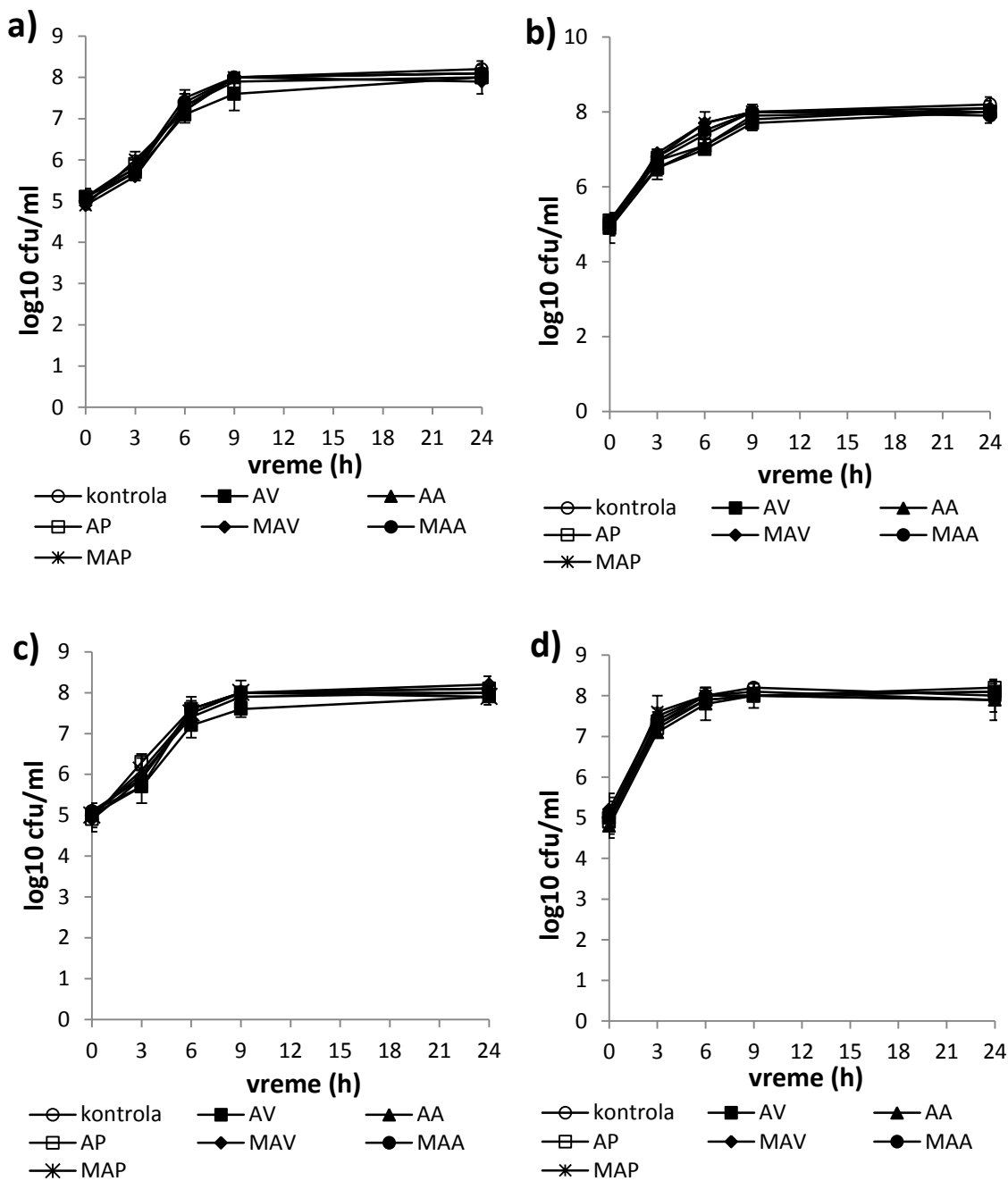
Sporogene vrste su se gotovo nesmetano razvijale u prisustvu ekstrakata *A. auricula judae*.



Slika 15. Kinetika rasta a) *Staphylococcus aureus* 6538, b) *Enterococcus faecalis* 29212, c) *Geobacillus stearothermophilus* 7953 i d) *Bacillus cereus* 10876, u prisustvu ekstrakata gljive *A. auricula-judae*.



Slika 16. Kinetika rasta a) *Listeria monocytogenes* 19115, b) *Pseudomonas aeruginosa* 27853, c) *Escherichia coli* 25922 i d) *Salmonella enteritidis* 13076, u prisustvu ekstraktata gljive *A. auricula-judae*.



Slika 17. Kinetika rasta a) *Proteus hauseri* 13315, b) *Shigella sonnei* 29930, c) *Yersinia enterocolitica* 27729 i d) *Escherichia coli* 0157:H7 35150, u prisustvu ekstrakata gljive *A. auricula-judae*.

Ekstrakti gljive *A. auricula-judae* nisu bili efikasni prema Gram negativnim bakterijama pri koncentraciji od 2.5 mg/ml. Mikrodilucioni metod je pokazao da ekstrakti ove gljive deluju i na Gram negativne vrste ali pri 2-8 puta višim koncentracijama. Sa druge strane, na graficima se može uočiti mikrobistatičko delovanje u slučajevima gde se testirana koncentracija poklapa ili približava MIC vrednostima za konkretni ekstrakt.

Ni jedan od testiranih uzoraka gljive *A. auricula-judae* nije ispoljio antimikrobno dejstvo prema kvascima *Candida albicans* 24443 i *Cryptococcys neoformans* 76484.

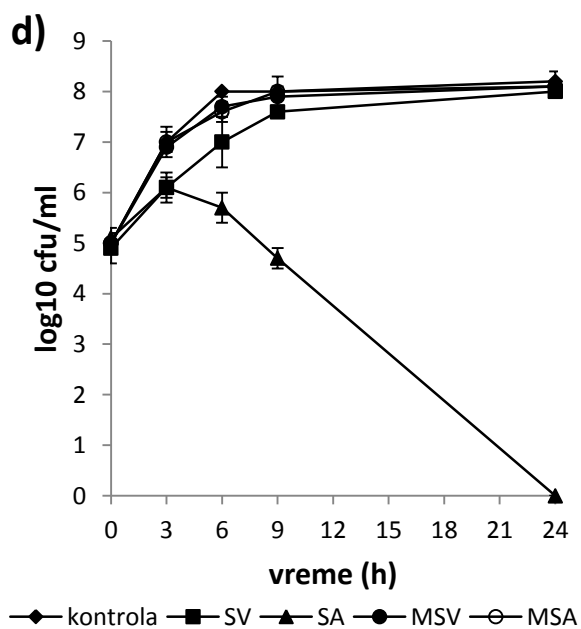
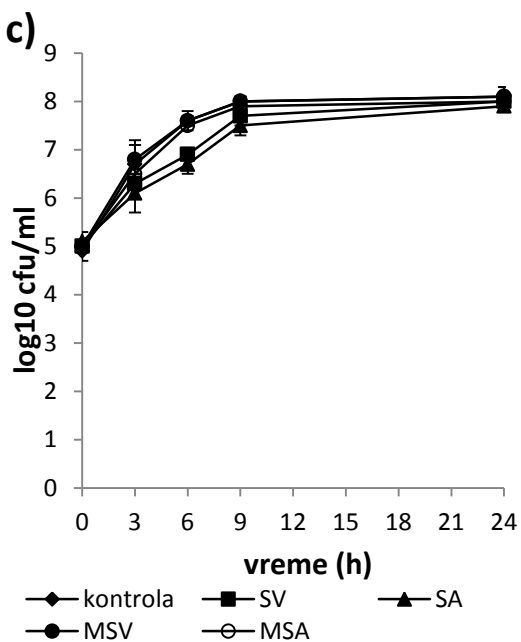
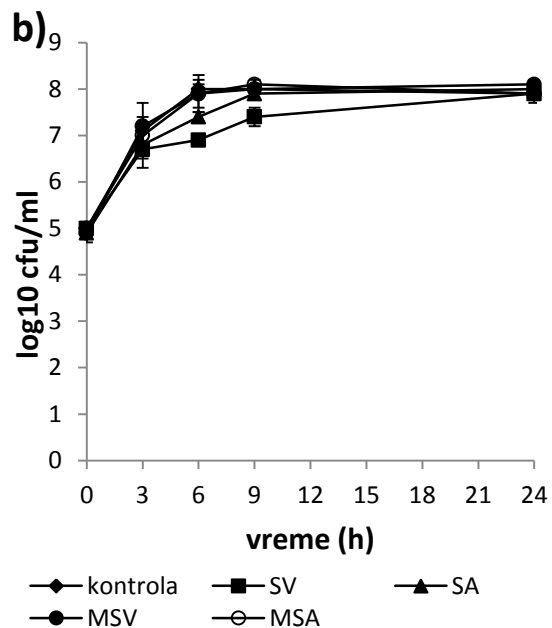
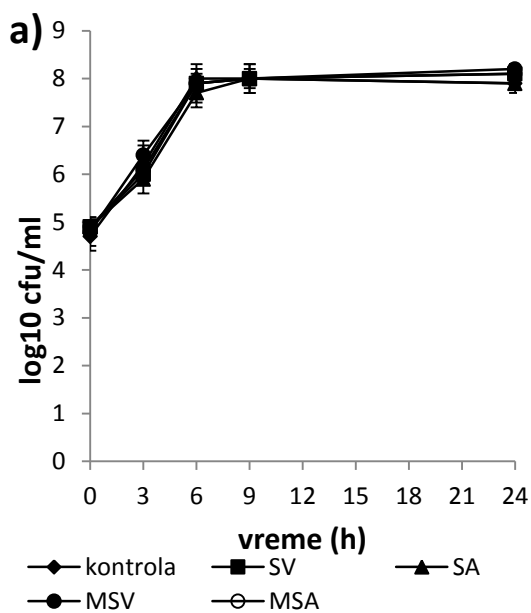
5.8.3.3. Antimikrobna aktivnost gljive *Sparassis crispa*

Gram pozitivne bakterije bile su osetljivije u prisustvu ekstrakata gljive *S. crispa* u odnosu na Gram negativne vrste. Ista zavisnost demonstrirana je i u mikrodilucionom testu. Osim toga, modifikovani ekstrakti su pri koncentraciji od 2.5 mg/ml ispoljili značajno slabiju antimikrobnu aktivnost od sirovih polisaharidnih ekstrakata.

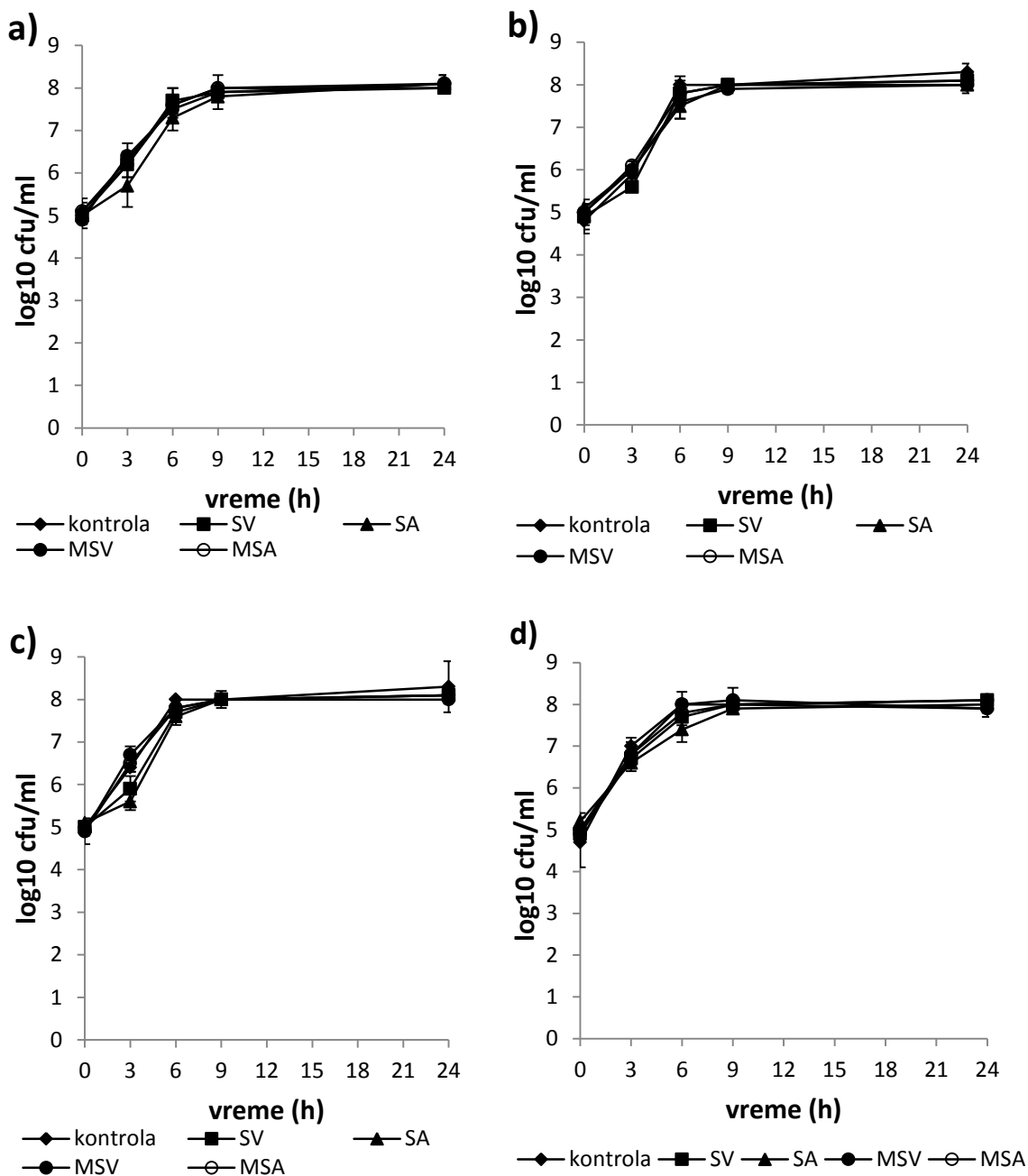
Dinamika rasta *E. faecalis* bila je narušena u periodu od 3 do 9 h, tj. u eksponencijalnoj fazi rasta, da bi bakterijska populacija u drugoj polovini vremena inkubacije ponovo uspostavila normalan rast (Slika 18.). Kao i kod *E. faecalis*, sirovi alkalni i vodeni ekstrakt ispoljili su inhibitorno dejstvo tokom eksponencijalne faze rasta *G. stearothermophilus*. Ni druga sporogena bakterija testirana ovom metodom nije bila sposobna da se neometano razvija uz dodatak ekstrakata *S. crispa*, a alkalni ekstrakt demonstrirao je mikrobicidno dejstvo, i to kroz postepeni pad broja ćelija, počevši od 3 h po dodavanju ekstrakata. Sirovi vodeni ekstrakt delovao je bakteriostatički na *B. cereus* sve do 9 h.

Gram negativne bakterije su se razvijale bez značajnijih smetnji nakon što su u medijum za njihovo gajenje dodati ekstrakti *S. crispa* (Slika 19. i Slika 20.).

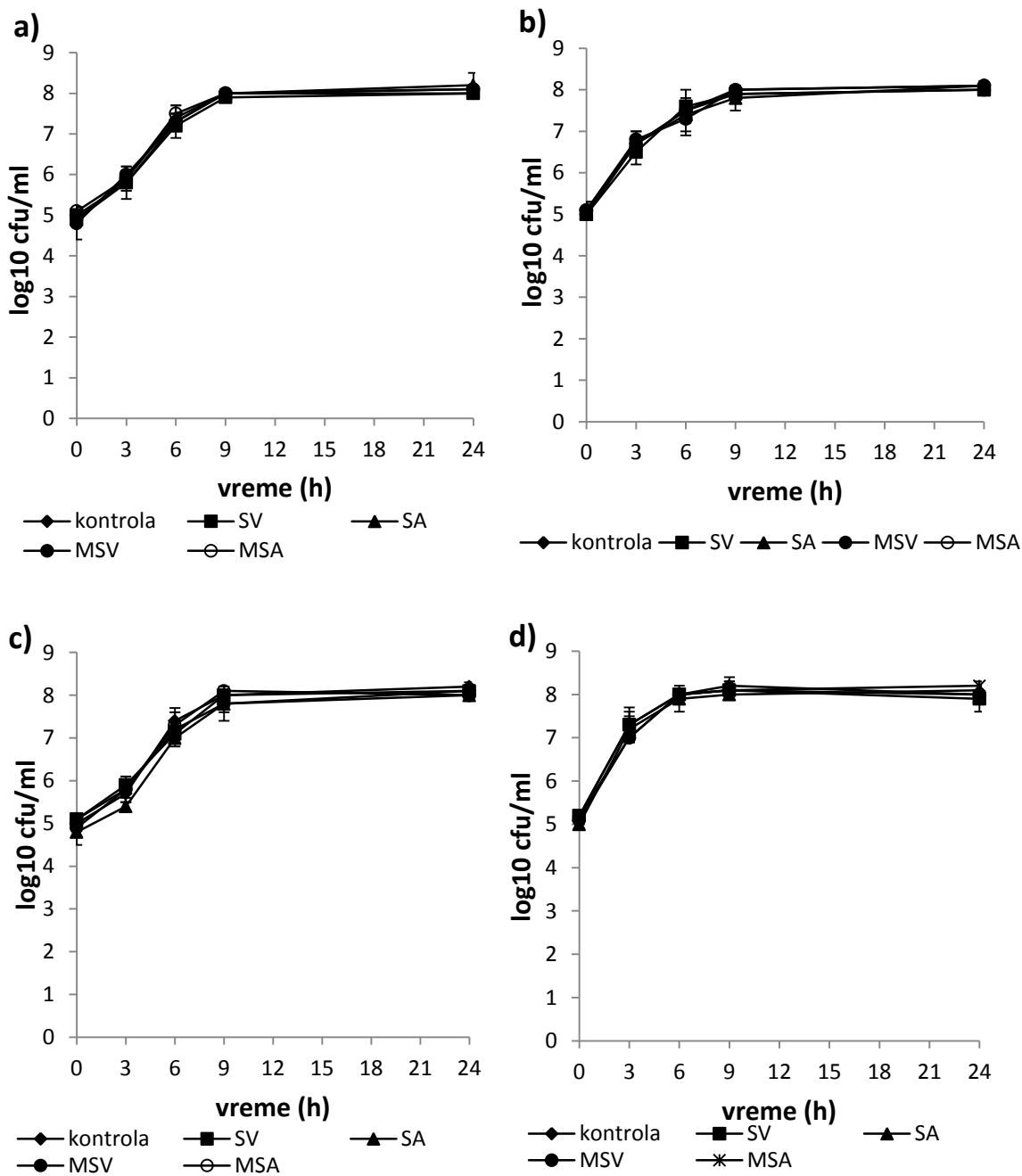
Nijedan od testiranih uzoraka gljive *S. crispa* nije ispoljio antimikrobno dejstvo prema kvascima *Candida albicans* 24443 i *Cryptococcys neoformans* 76484.



Slika 18. Kinetika rasta a) *Staphylococcus aureus* 6538, b) *Enterococcus faecalis* 29212, c) *Geobacillus stearothermophilus* 7953 i d) *Bacillus cereus* 10876, u prisustvu ekstrakata gljive *S. crispa*.



Slika 19. Kinetika rasta a) *Listeria monocytogenes* 19115, b) *Pseudomonas aeruginosa* 27853, c) *Escherichia coli* 25922 i d) *Salmonella enteritidis* 13076, u prisustvu ekstraktata gljive *S. crista*.



Slika 20. Kinetika rasta a) *Proteus hauseri* 13315, b) *Shigella sonnei* 29930, c) *Yersinia enterocolitica* 27729 i d) *Escherichia coli* 0157:H7 35150, u prisustvu ekstrakata gljive *S. crista*.

Kao i kod prethodne dve gljive najefikasniji je bio vreli alkalni ekstrakt, što ukazuje na činjenicu da se alkalnom ekstrakcijom dobija ekstrakt čiji sastav i odnos pojedinih komponenata najviše utiče na inhibiciju i eliminaciju bakterijskih ćelija.

Bakterija *E. faecalis* pokazala se kao najmanje otporna na ekstrakte gljiva *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crispa*. Ovakav efekat je od značaja za savremenu kliničku praksu zbog infekcija koje ova bakterija izaziva, ali i ekonomskih gubitaka koji su u vezi sa komplikacijama nastalim delovanjem *E. faecalis*. Dobijeni rezultati ukazuju na potencijal sve tri ispitivane gljive kao izvora antimikrobnih komponenata. Osim što su sve gljive delovale na patogene izazivače trovanja hranom, one su efikasne i prema bakterijama koje pokazuju rezistentnost prema postojećim antibioticima.

Rezultati makrodilucione metode u saglasnosti su sa rezultatima mikrodilucione metode, čime je potvrđena superiornost ovih metoda nad disk difuzionim postupkom testiranja antimikrobne aktivnosti.

5.9. Antioksidativna aktivnost ekstrakata gljiva

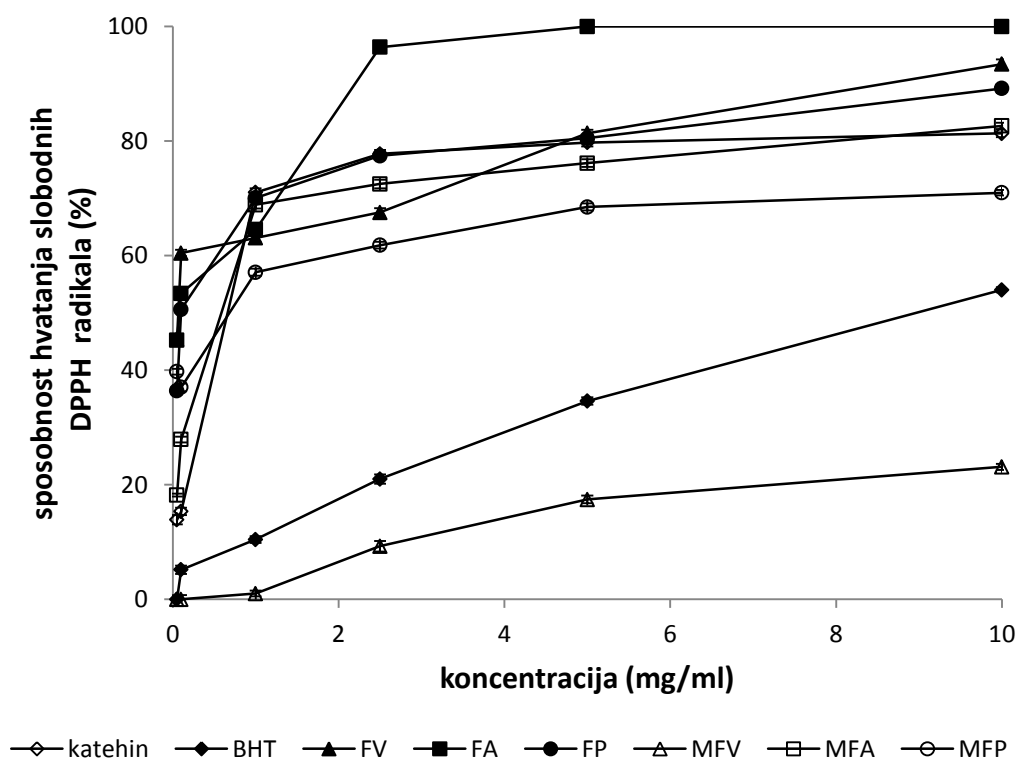
Procena antioksidativne sposobnosti neke supstancene može se izvršiti primenom samo jedne metode (Özyürek et al., 2011). Zato i nije pravilno rezultate izražavati kao totalni antioksidativni kapacitet već se koristi kombinacija više različitih antioksidativnih metoda, koje ovu problematiku objašnjavaju sarazličitih aspekata. Korelacija rezultata brojnih antioksidativnih metoda nije moguća (Apak et al., 2004). Zato je u ovom radu primenjen kombinovani pristup, tj. antioksidativna aktivnost ekstrakata gljiva sagledana je kroz rezultate nekoliko aktuelnih metoda.

5.9.1. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala je metoda bazirana na reakciji transfera atoma vodonika. Reakcionu smešu čine dve komponente: antioksidant i oksidant, a interakcija ili njen izostanak se manifestuje promenom boje oksidanta. Stepem promene boje proporcionalan je koncentraciji antioksidanta (Huang et al., 2005). U slučaju ove metode oksidant je DPPH radikal koji je ljubičaste boje. U prisustvu antioksidanta dolazi do gubitka protona pa DPPH radikal biva konvertovan u 1,1-difenil-2-pikril hidrazil. Reakcija se manifestuje gubitkom boje, tj. snižavanjem vrednosti apsorbance. Sposobnost antioksidanta da uhvati slobodne DPPH radikale potiče od sposobnosti doniranja vodonika. Ova metoda zavisi od uslova reakcije: svetlosti, kiseonika, pH, tipa rastvarača. Kako je DPPH rastvoren u organskom rastvaraču postoje ograničenja u određivanju hidrofilnih komponenata. Sa druge strane nema paralelnih reakcija poput heliranja jona metala, niti inhibicije enzima kao što je to slučaj sa metodama koje podrazumevaju korišćenje laboratorijski dobijenih radikala (Ren et al., 2014). Imajući u vidu ograničenja i prednosti metoda se najčešće koristi kao skrining antioksidativne aktivnosti (Ren et al., 2014).

5.9.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Ekstrakti FV, FA i FP gljive *F. fomentarius* ispoljili su sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala u znatno većoj meri nego njihovi modifikovani oblici: MFV, MFA i MFP (Slika 21.). Kod svih uzoraka antioksidativna aktivnost, praćena kroz ovu metodu, bila je u funkciji koncentracije. Sa povećanjem koncentracije uzorka povećavala se i sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Tako je vreli alkalni ekstrakt pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (10 mg/ml) hvatao sve prisutne slobodne DPPH radikale, dok je vreli vodeni ekstrakt uspevao da uhvati nešto manje slobodnih DPPH radikala (93.44%) pri istoj koncentraciji.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 21. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *F. fomentarius*.

Sirovi ekstrakti su istovremeno i značajno jači antioksidanti u odnosu na komercijalna sredstva, katehin i BHT. Ovi odnosi vidljivi su u Tabeli 17., odnosno na osnovu EC₅₀ vrednosti. Kod svih ekstrakata, osim MFV, EC₅₀ vrednosti su značajno niže u odnosu na katehin i BHT.

U cilju dovođenja u vezu hemijskog sastava ekstrakata i antioksidativne sposobnosti ispitana je korelacija između komponenata ekstrakata i sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala. Analiza je pokazala umereno jaku negativnu korelaciju između fenolnih jedinjenja ($r = -0.6688$), kao i između β -glukana ($r = -0.6263$), i sposobnosti ekstrakata da uhvate slobodne DPPH radikale. Ove vrednosti ukazuju da su β -glukani i fenolna jedinjenja u ekstraktima gljive *F. fomentarius* skoro jednako važna za njihovu antioksidativnu sposobnost. Verovatno da komponente deluju sinergistički, mada to nije bilo moguće precizno utvrditi. Nesumnjivo, fenolna jedinjenja su u velikoj meri odgovorna za antioksidativnu sposobnost ekstrakata gljiva, što potvrđuju brojni autori (Klaus et al., 2013; Kozarski et al., 2015; Petrović et al., 2016).

Tabela 17. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius* u antioksidativnoj metodi-sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
Katehin	0.59 ± 0.45^{ab}
BHT	>10.00
FV	0.05 ± 0.52^b
FA	0.07 ± 0.60^{b,c}
FP	0.14 ± 0.67^c
MFV	>10.00
MFA	0.34 ± 0.58^d
MFP	0.43 ± 0.71^e

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je uhvaćeno 50% DPPH radikala.

EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

U radu Karaman i saradnika (2014) *F. fomentarius* pripremljen u formi etanolnog ekstrakta imao je IC₅₀ 1.61 mg/ml, što je značajno niža vrednost u odnosu na rezultate dobijene u našem radu, a korelaciona analiza je pokazala snažnu zavisnost ($r = 0.83$) između sadržaja fenolnih jedinjenja i sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala. Ipak, literaturni navodi se ne ograničavaju samo na fenolna jedinjenja, a polisaharidi se navode kao druga bitna grupa molekula odgovorna za antioksidativnu sposobnost gljiva.

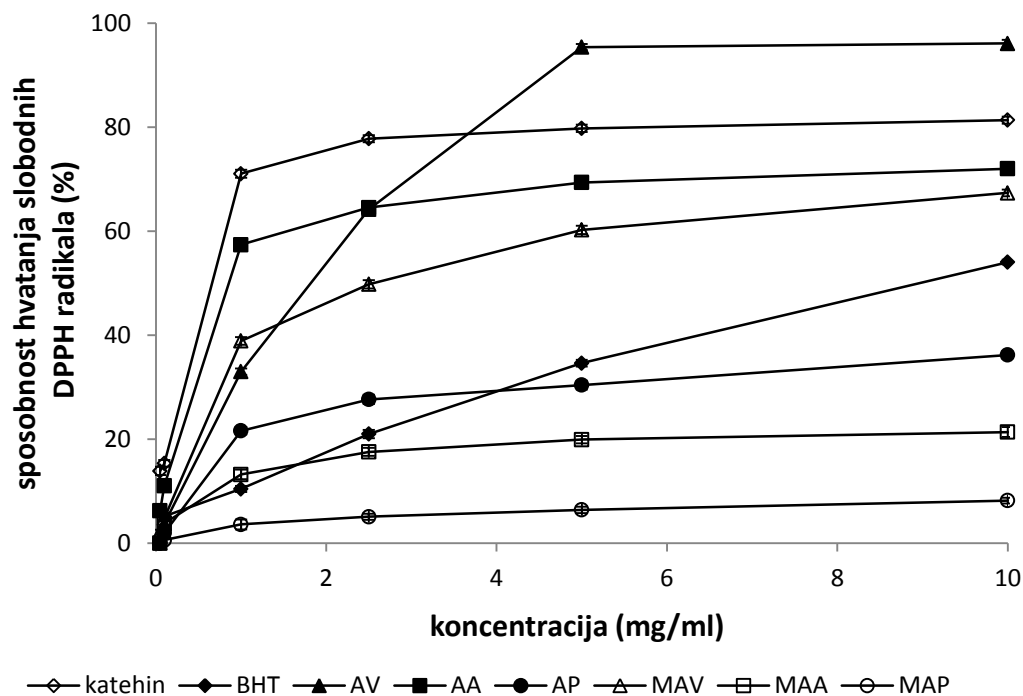
Antioksidativni efekat polisaharida se ostvaruje putem različitih mehanizama među kojima je i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Kozarski et al., 2015). Kao najznačajniji se ističu β-glukani kao molekuli sposobni da relativno lako doniraju vodonik; utoliko lakše što su više razgranati (Kozarski et al., 2015). Analiza hemijskog sastava ekstrakata gljive *F. fomentarius* pokazuje da ovakva korelacija postoji, odnosno, da su enzimski tretirani uzorci, koji su izgubili deo β-glukana ali i bočnih nizova, slabiji antioksidansi od ekstrakata koji nisu modifikovani dodatkom enzima. Za enzimsku modifikaciju je, između ostalog, korišćena izoamilaza, enzim koji katalizuje hidrolizu α-(1→6)-glikozidne veze koja se vezuje za sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala (Ren et al., 2014). Gubitkom α-(1→6)-glikozidne veze modifikovanim ekstraktima je očigledno smanjena antioksidativna sposobnost u odnosu na slobodne radikale tipa DPPH.

Zavisnost antioksidativne sposobnosti od koncentracije ekstrakta bila je prisutna kod svih ekstrakta testiranih u ovom radu, a u vezi je sa sposobnošću polisaharidnih gradivnih jedinica da doniraju vodonik i tako redukuju DPPH (Ren et al., 2014).

5.9.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala bila je izražena kod nemodifikovanih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* i rasla je sa porastom koncentracije. Ekstrakti koji su prošli enzimski tretman bili su značajno slabiji donori vodonika, a povećanje aktivnosti u odnosu na koncentraciju je postojalo, mada je trend rasta bio slabijeg intenziteta nego u slučaju AV, AA i AP. Najnižu EC₅₀ vrednost pokazao je vreli alkalni

ekstrakt (0.16 ± 0.68 mg/ml) ali se ovako intenzivno dejstvo nije očevalo pri većim koncentracijama. Tako je pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (10 mg/ml) najjače antioksidativno dejstvo ispoljio sirovi vodeni ekstrakt, $96.1 \pm 0.43\%$ uhvaćenih slobodnih DPPH radikala. Ovaj ekstrakt je istovremeno bio i efikasniji od katehina i BHT.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 22. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *A. auricula-judae*.

Oke i Aslim (2011) su pripremali vodeni i metanolni ekstrakt *A. auricula-judae* i ustanovili da vodeni ekstrakt ima jaču sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, $IC_{50} = 0.309 \pm 0.021$ mg/ml. Oni su utvrdili da vodeni ekstrakt ima visok sadržaj fenolnih jedinjenja, u prvom redu katehina i siringinske kiseline, koji su dobri inhibitori DPPH. Sa Slike 22. se može uočiti da je antioksidativna sposobnost vrelog vodenog ekstrakta zaista bila bliska katehinu. Iako polifenolni profil ekstrakata nije obrađivan u ovom radu, izmeren je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja a pokazalo se da je njihov nivo najviši upravo u vodenom ekstraktu. AV testiran u našem radu bio je skoro pet puta slabiji od ekstrakta

analiziranog u radu Oke i Aslim (2011). Dijalizom i alkoholnom precipitacijom vreli vodeni ekstrakt je izgubio brojne male molekule, među kojima i fenolna jedinjenja, što je rezultovalo smanjenjem antioksidativne sposobnosti testirane u ovoj metodi.

Tabela 18. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* u antioksidativnoj metodi-sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
Katehin	0.59 ± 0.45^{ab}
BHT	>10.00
AV	1.52 ± 0.75^b
AA	0.16 ± 0.68^c
AP	>10.00
MAV	2.52 ± 0.81^d
MAA	>10.00
MAP	>10.00

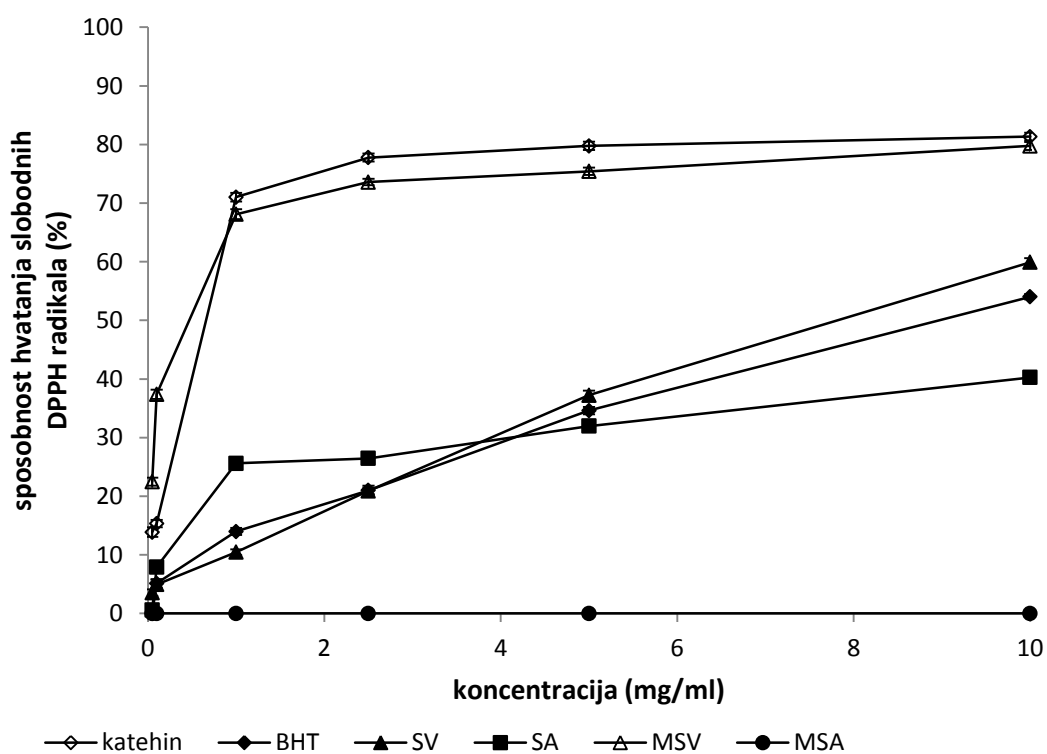
^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je uhvaćeno 50% DPPH radikala. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

Među modifikovanim ekstraktima najizraženiju antioksidativnu sposobnost ispoljio je vodeni ekstrakt, čija je EC₅₀ vrednost iznosila 2.52 ± 0.81 mg/ml, tako da je isti ekstrakt bio efikasniji od BHT (EC₅₀= 20.86 ± 1.03 mg/ml). Kod ekstrakata MAA i MAP nije se mogla utvrditi EC₅₀ vrednost. Na osnovu korelacionog koeficijenta (r) utvrđeno je da je za sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *A. auricula-judae* od presudnog značaja sadržaj fenolna jedinjenja (r = -0.6112) i α-glukana (r = -0.4013). Enzimski tretman je imao za posledicu uklanjanje veće količine fenolnih jedinjenja ali i α-glukana, kao i α-D-glikozidnih veza u molekulima β-glukana. Da su α-glukani od naročitog značaja za antioksidativnu sposobnost lignikolnih gljiva (*Laetiporus sulphureus*) pokazali su i Klaus i saradnici (2013). Sami β-glukani bili su u jakoj pozitivnoj korelaciji sa sposobnošću ekstrakta da redukuje DPPH (r = 0.8267), što može ukazivati na prooksidativno delovanje ovih molekula u slučaju gljive *A. auricula-judae* ili nije posledica samo prisustva ovih molekula već njihove strukture i konformacije (Kozarski et al., 2015).

5.9.1.1. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Ekstrakti gljive *S. crispais*poljili su sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, ali u manjoj meri u odnosu na katehin i BHT (Slika 23.). Efekat je rastao sa porastom koncentracije a zavisnost je bila logaritamska. Najizraženiju antioksidativnu sposobnost pokazao je modifikovani vodeni ekstrakt (MSV), EC_{50} vrednost je iznosila 0.73 ± 0.28 mg/ml, dok modifikovani alkalni ekstrakt (MAA) nije delovao ni pri najvišoj testiranoj koncentraciji (Tabela 19.). Hemijska karakterizacija ovih ekstrakata pokazala je da ne sadrže fenolna jedinjenja, za razliku od druge dve gljive, čime se može objasniti njihov slabiji efekat. Sa druge strane ni jedna druga komponenta (ukupni, α i β -glukani i proteini) nije bila od posebnog značaja za antioksidativnu aktivnost ekstrakata gljive *S. crispa*.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 23. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala ekstrakata gljive *S. crispa*.

Nowacka i saradnici (2014) pripremali su etanolne ekstrakte različitih vrsta gljiva među kojima i *S. crispa* koju su okarakterisali kao vrstu sa umerenom radikalskom aktivnošću, IC₅₀ vrednost je bila između 20 i 50 mg/mg DPPH•. Druga grupa autora testirala je sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala metanolnog ekstrakta gljive *S. crispa* pri čemu je ustanovljena izražena antioksidativna aktivnost, 62% pri koncentraciji od 8 mg/ml (Lee et al., 2013). IC₅₀ vrednost je iznosila 6.79 mg/ml što je jače u odnosu na sirove polisaharidne ekstrakte analizirne u ovom radu. Ovakav efekat pripisali su fenolnim jedinjenjima kojih je u metanolnom ekstraktu bilo u koncentraciji od 15.79 ± 0.95 mg TAE/g. Sa druge strane, naši ekstrakti nisu sadržali fenolna jedinjenja. Enzimskom modifikacijom došlo je do gubitka bočnih nizova u molekulima glukana a MSV se pokazao kao najjači donor vodonika. Razlog može biti bolja izloženost pojedinih funkcionalnih grupa, što ponovo potvrđuje da za antioksidativnu aktivnost nije važno samo prisustvo i koncentracija određenih jedinjenja već i njihova prostorna konformacija, naelektrisanje, te dostupnost funkcionalnih grupa (Kozarski et al., 2012).

Tabela 19. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* u antioksidativnoj metodi-sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
Katehin	0.59 ± 0.45^{ab}
BHT	>10.00
SV	7.85 ± 0.93^b
SA	>10.00
MSV	0.73 ± 0.28^c
MSA	>10.00

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je uhvaćeno 50% DPPH radikala.

EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

Ekstrakti sve tri gljive ispoljili su sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala a najjači efekat zapažen je kod gljive *F. fomentarius*, koja ujedno sadrži i najveću količinu fenolnih jedinjenja. Ekstrakti gljive *S. crispa* nisu sadržali fenolna jedinjenja i imali su

najslabiju antioksidativnu sposobnost. Modifikacija ekstrakata primenom enzima dovela je do smanjenja sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, što je verovatno posledica gubitka fenolnih jedinjenja ali i α -glukana, kao i smanjenja ukupne količine β -glukana, te promena u njihovoj prostornoj organizaciji.

5.9.2. Ispitivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata konjugen dienskom metodom

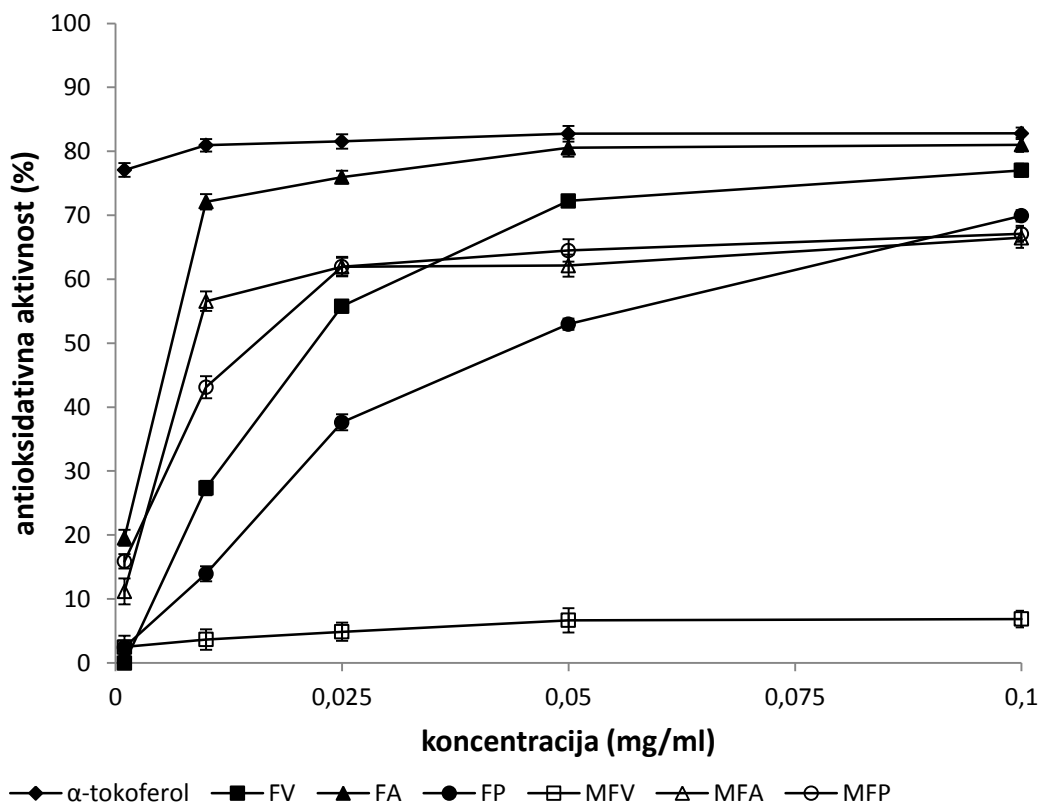
Polinezasićene masne kiseline su važna komponenta hrane i bioloških sistema čijom autooksidacijom dolazi do negativnih promena; u slučaju prehrambenih proizvoda menjaju se ukus, aroma, tekstura i nutritivna vrednost (Kozarski et al., 2011). Sa druge strane u čovekovom organizmu se odvija oksidacija LDL holesterola što u krajnjem slučaju dovodi do arteroskleroze. Uočeno je da je u prisustvu antioksidanata akumulacija lipid-peroksida minimalna a stepen efikasnosti prevencije zavisi od koncentracije antioksidanta (Huang et al., 2005).

Konjugen dienska metoda bazirana je na sposobnosti supstance da uspori oksidaciju konjugovanih diena, koje mogu formirati samo polinezasićene masne kiseline (Huang et al., 2005). Kao supstrat se koristi linoleinska kiselina koja nije potpuno ista kao biološki sistem i daje samo jedan tip konjugovanih diena, pa ova metoda nije dovoljna za kompletnu procenu sposobnosti neke supstance da deluje preventivno u složenim sistemima kao što su hrana ili čovekov organizam.

5.9.2.1. Ispitivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata gljive *Fomes fomentarius* konjugen dienskom metodom

Testiranjem ekstrakata gljive *F. fomentarius* utvrđeno je da antioksidativna sposobnost raste sa porastom koncentracije, i da nijedan od ekstrakata nije bio efikasniji od standarda, α -tokoferola, pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji, 0.1 mg/ml (Slika 24.). Najjaču antioksidativnu sposobnost ispoljili su vreli alkalni i vodeni ekstrakt, a alkalni

ekstrakt je bio značajno efikasniji dostižući EC_{50} vrednost već pri koncentraciji od 0.007 ± 0.020 mg/ml.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 24. Antioksidativne aktivnosti ekstrakata gljive *F. fomentarius* dobijene konjugen dienskom metodom

Nemodifikovani ekstrakti bili su efikasniji u prevenciji lipidne peroksidacije pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji, dok su EC_{50} vrednosti modifikovanog alkalnog i prečišćenog ekstrakta bile iste. Enzimska modifikacija vrelog vodenog ekstrakta dovela je do gotovo potpunog gubitka antioksidativne aktivnosti, pa u ovom slučaju nije uhvaćena EC_{50} vrednost. Korelaciona analiza je u ovom slučaju pokazala da različite komponente koje čine testirane ekstrakte doprinose njihovom ukupnom efektu, najverovatnije u sinergističkoj formi. Utvrđeno je da korelacioni koeficijent između fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti iznosi -0.6664, između ukpnih glukana i antioksidativne

aktivnosti -0.6456, a da je uticaj β -glukana veći nego α -glukana, -0.6263 i -0.3043, navedenim redom. U ovom slučaju i proteini su doprineli sveukupnoj antioksidativnoj sposobnosti, mada ne u velikoj meri, $r = -0.4465$.

Tabela 20. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius* u konjugovanoj dienskoj metodi

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
α -tokoferol	<0.001 ± 0.000 ^{aB}
FV	0.02 ± 0.03 ^b
FA	0.007 ± 0.020 ^c
FP	0.037 ± 0.060 ^d
MFV	>0.100
MFA	0.018 ± 0.020 ^b
MFP	0.018 ± 0.010 ^b

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je antioksidativni efekat 50%.

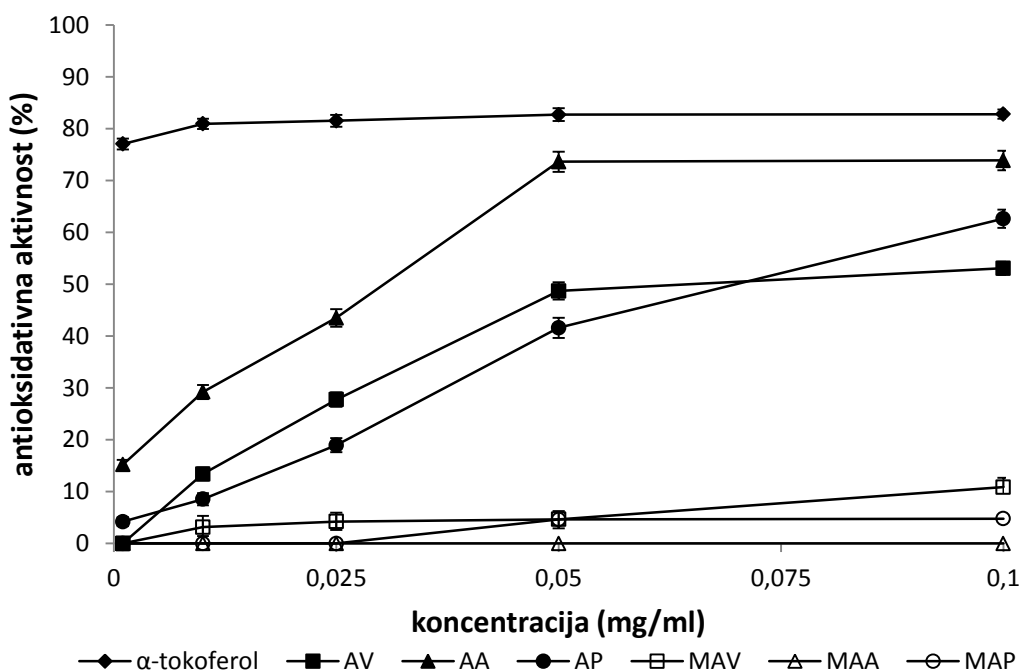
EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

Kao i u radu Petrović i saradnika(2016) i ovde se pokazalo da između koncentracije ekstrakata i antioksidativne aktivnosti postoji logaritamska zavisnost, tj. da je efekat prevencije lipidne peroksidacije pri nižim koncentracijama isključivo u funkciji koncentracije a pri većim koncentracijama komponente ekstrakata deluju prooksidativno u izvesnoj manjoj meri.

5.9.2.2. Ispitivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae* konjugen dienskom metodom

Korišćenjem konjugen dienske metode utvrđeno je da sirovi vodeni, alkalni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakt imaju dobru sposobnost prevencije peroksidacije linoleinske kiseline (53.1 ± 1.26 , 73.89 ± 1.87 i $62.67 \pm 1.76\%$, redosledom kojim su navedeni ekstrakti), pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji od 0.1 mg/ml (Slika 25.).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 25. Antioksidativne aktivnosti ekstrakata gljive *A. auricula-judae* dobijene konjugen dienskom metodom

Najefikasniji je i u ovom slučaju bio vreli alkalni ekstrakt. AA nije sadržao značajno veće količine važnijih grupa molekula pa je verovatno kvalitativna promena fenolnih jedinjenja i glukana, do koje je došlo tokom alkalne ekstrakcije, zaslužna za dobru antioksidativnu sposobnost. Pri istim uslovima i koncentraciji α -tokoferol je bio efikasniji od svih posmatranih ekstrakata. Enzimski tretirani ekstrakti su pretrpeli izmene pri kojima je došlo do drastičnog smanjenja antioksidativne sposobnosti, a modifikovani alkalni ekstrakt je nije ni ispoljio pri testiranim koncentracijama.

Najznačajnije komponente za antioksidativnu aktivnost ekstrakata gljive *A. auricula-judae* bile su fenolna jedinjenja sa negativnim koeficijentom korelacije, $r = -0.6655$ i α -glukani čiji je koeficijent korelacije bio -0.4902 . Vrednosti koeficijenata korelacije ponovo ukazuju da nije postojala izrazito dominantna komponenta koja bi uticala na efekat, već da ekstrakti deluju kao smeša brojnih jedinjenja, ali da se gubitkom ili

smanjenjem neke od njih krajnji antioksidativni efekat neproporcionalno smanjuje. Sve to ukazuje na kompleksan, sinergistički efekat molekula koji čine ekstrakte.

Tabela 21. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* u konjugen dienskoj metodi

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
α-tokoferol	<0.001 ± 0.000^{ab}
AV	0.098 ± 0.030^b
AA	0.017 ± 0.051^c
AP	0.068 ± 0.036^d
MAV	>0.100
MAA	>0.100
MAP	>0.100

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je antioksidativni efekat 50%.

EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

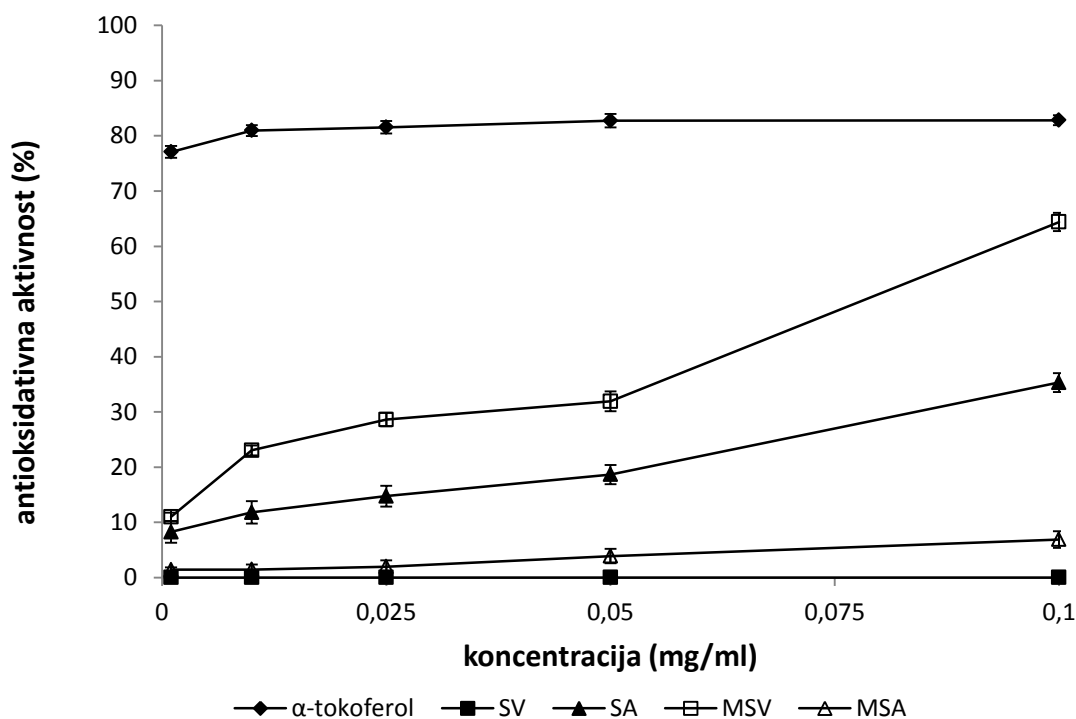
Oke i Aslim (2011) su testirali sposobnost metanolnog i vodenog ekstrakta gljive *A. auricula-judaeda* vrše prevenciju oksidacije linoleinske kiseline u testu izbeljivanja β-karotena. Oba uzorka pokazala su jaku antioksidativnu sposobnost pri testiranim koncentracijama, >80%.

5.9.2.3. Ispitivanje antioksidativnih svojstava ekstrakata gljive *Sparassis crispa* konjugen dienskom metodom

Na osnovu ispitivanja antioksidativne aktivnosti konjugen dienskom metodom utvrđeno je da ekstrakti gljive *S. crispa* nemaju naročito izraženu antioksidativnu sposobnost, izuzev modifikovanog vodenog ekstrakta (Slika 26.). Utvrđena zavisnost bila je logaritamska. Interesantno je da je samo kod ove gljive primena enzimske modifikacije dala bolji rezultat nego što je to bio slučaj sa sirovim ekstraktom. Tako je najjača antioksidativna aktivnost zabeležena kod modifikovanog vodenog ekstrakta čija je EC₅₀

vrednost iznosila 0.054 ± 0.03 mg/ml (Tabela 22.). Glavna razlika između ekstrakata ove i druge dve gljive je odsustvo fenolnih jedinjenja pa su i mehanizmi antioksidativnog delovanja drugačiji, a porast aktivnosti znatno slabiji u odnosu na rast koncentracije.

Dobijeni rezultati ukazuju na složene mehanizme koji utiču na antioksidativnu sposobnost, a koji se razlikuju za druge testirane gljive i posledica su specifičnog hemijskog sastava; količine biomolekula, njihovih međusobnih odnosa, strukture, profila polifenolnih jedinjenja, ali i prisustva kompleksa proteina i polisaharida, kao i fenolnih jedinjenja i polisaharida. Rezultati konjugen dienske metode sugerišu da se efekat enzimskih modifikacija ne može označiti kao isključivo negativan već da varira od vrste do vrste gljive shodno njenim hemijskim specifičnostima.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 26. Antioksidativne aktivnosti ekstrakata gljive *S. crispa* dobijene konjugen dienskom metodom

Tabela 22. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* u konjugen dienskoj metodi

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
α-tokoferol	<0.001 ± 0.00^{ab}
SV	>0.100
SA	>0.100
MSV	0.054 ± 0.03^b
MSA	>0.100

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je antioksidativni efekat 50%.

EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

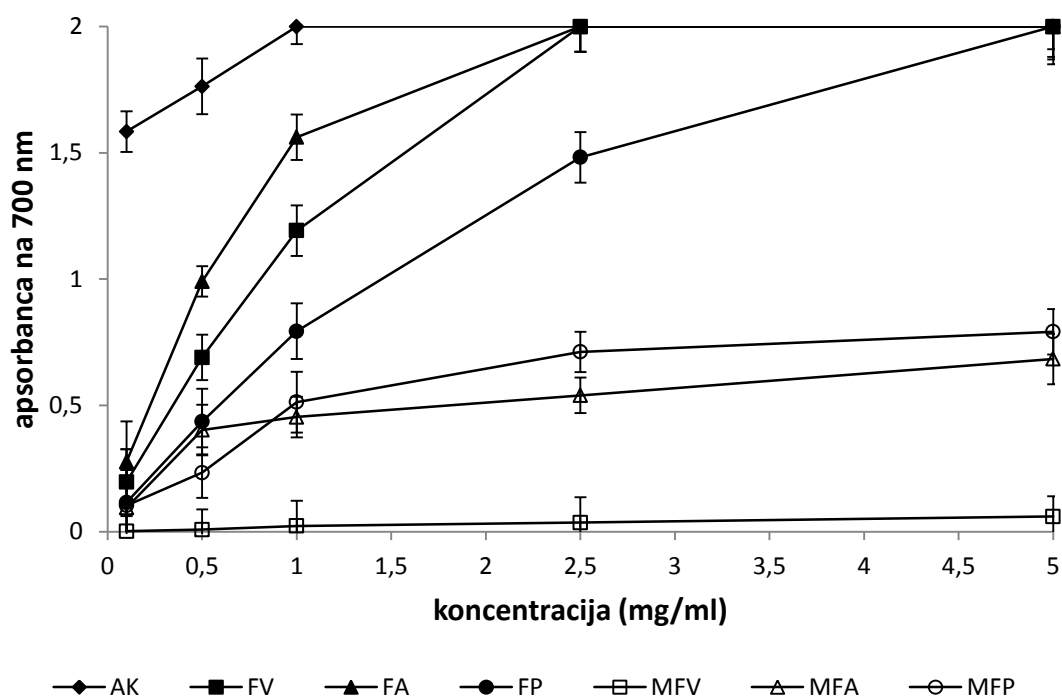
^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

5.9.3. Sposobnost redukcije jona gvožđa (FRAP)

Sposobnost redukcije jona gvožđa je metoda bazirana na reakciji transfera elektrona između antioksidanta i oksidanta (u ovom slučaju je to so gvožđa), pri čemu dolazi do redukcije Fe³⁺ u Fe²⁺. Pozitivna reakcija se manifestuje promenom boje rastvora, od žute do zelene ili plave. Stepenn promene boje je proporcionalan koncentraciji oksidanta. Što je vrednost apsorbance na 700 nm veća to je jača redukciona sposobnost testirane supstance (Khaskheli et al., 2015).

5.9.3.1. Sposobnost redukcije jona gvožđa (FRAP) ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Primenom metode je utvrđeno da sposobnost redukcije jona gvožđa ekstrakata gljive *F. fomentarius* raste sa porastom koncentracije, pri čemu je dinamika rasta intenzivnija kod uzoraka koji nisu prošli kroz enzimsku transformaciju. Takođe, ekstrakti koji nisu modifikovani su bili i efikasniji u ovoj metodi, a pri koncentraciji od 5 mg/ml sva tri uzorka, FV, FA i FP, dostižu maksimalnu sposobnost redukcije jona Fe³⁺ (Slika 27.).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 27. Sposobnost redukcije jona Fe^{3+} ekstrakata gljive *F. fomentarius*

Iako veoma aktivni kao redukciona sredstva svi uzorci su pri nižim koncentracijama bili vidno slabiji od standarda, askorbinske kiseline, čija je EC_{50} vrednost ispod 0.1 mg/ml. Metoda je pokazala da se uklanjanjem α -glikozidnih veza iz molekula β -glukana i gubitkom α -glukana redukciona sposobnost drastično snižava pa EC_{50} vrednosti ovih uzoraka prevazilaze koncentraciju od 5 mg/ml. Najizraženiji gubitak redukcionne sposobnosti izmeren je kod MFV. Sličan efekat zapažen je i kod MFA. Ranija istraživanja su potvrdila da gljiva *F. fomentarius* poseduje sposobnost redukcije jona gvožđa, mada su u pitanju bili metanolni i etanolni ekstrakti, a etanolni ekstrakt se pokazao kao duplo jači (Karaman et al., 2014).

Tabela 23. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius* za sposobnost redukcije jona Fe³⁺

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
Askorbinska kis.	<0.1^{aB}
FV	0.60 ± 0.76^b
FA	0.42 ± 1.12^c
FP	0.98 ± 1.45^d
MFV	>5.00
MFA	>5.00
MFP	>5.00

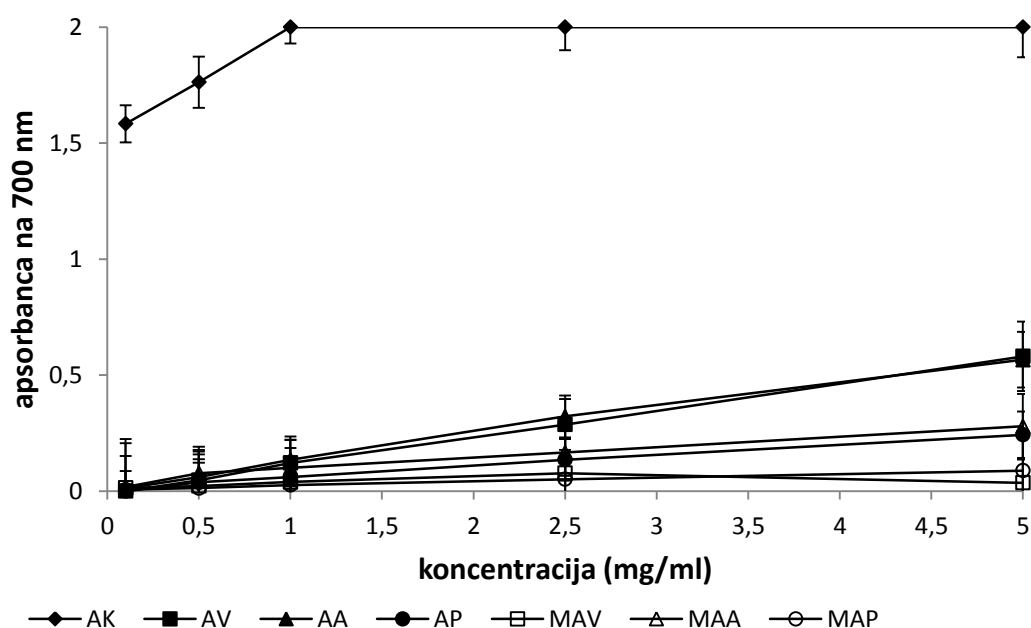
^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbancija 0.5. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

Ekstrakti testirani u ovom radu bili su bolja redukciona sredstva u odnosu na literaturne podatke. Najveći uticaj na redukcionu sposobnost ekstrakata imala su fenolna jedinjenja (r = -0.8398), Tabela 23., što su potvrdili i drugi autori (Karaman et al., 2014). U literaturi se navodi da je zavisnost redukcionne sposobnosti od količine fenolnih jedinjenja izuzetno jaka (r = 0.99), jača nego u našem radu, ali je takav rezultat i očekivan budući da se literaturni navodi odnose na metanolni i etanolni ekstrakt *F. fomentarius* kod kojih se prevashodno ekstrahuju fenolna jedinjenja (Karaman et al., 2014), dok je u našem radu cilj ekstrakcije bilo izdvajanje polisaharidnih komponenata. Osim fenolnih jedinjenja na redukcionu sposobnost je uticao i sadržaj α- i β-glukana (r = -0.6331 i -0.6504) ali i proteina (r = -0.7795). Verovatno je da su navedene grupe jedinjenja delovale zajednički što se odrazilo na vrlo visoku redukcionu sposobnost FV, FA i FP. Korelaciona analiza nije se mogla sprovesti u slučaju modifikovanih ekstrakata jer su EC₅₀ vrednosti premašivale maksimalnu testiranu koncentraciju.

5.9.3.2. Sposobnost redukcije jona gvožđa (FRAP) ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Ekstrakti gljive *A. auricula-judae* bili su vidno slabija redukciona sredstva u poređenju sa askorbinskom kiselinom (Slika 28.). Najjači efekat pokazali su AV i AA, između kojih nije bilo statistički značajne razlike. Ipak, EC_{50} vrednosti ovih ekstrakata nije bilo moguće utvrditi za koncentraciju od 5 mg/ml. Utvrđeno je i da dijaliza i alkoholna precipitacija vrelog vodenog ekstrakta dovode do snižavanja redukcionne sposobnosti, verovatno kao posledica gubitka fenolnih jedinjenja. Enzimska modifikacija nije se odrazila pozitivno na redukcionu moć. Naprotiv, EC_{50} vrednosti ovih ekstrakata prevazilazile su maksimalnu ispitivanu koncentraciju (5 mg/ml) (Tabela 24.).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 28. Sposobnost redukcije jona Fe^{3+} ekstrakata gljive *A. auricula-judae*

Tabela 24. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* za sposobnost redukcije jona Fe³⁺

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
Askorbinska kis.	<0.1 ^B
AV	>5.00
AA	>5.00
AP	>5.00
MAV	>5.00
MAA	>5.00
MAP	>5.00

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbancija 0.5. EC₅₀ vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

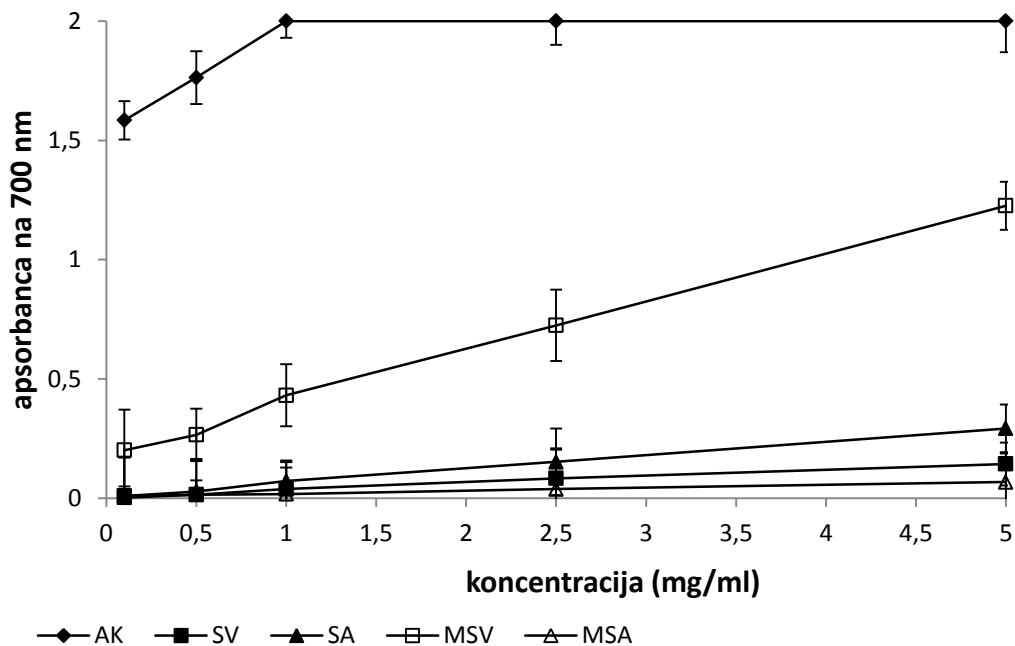
^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

U radu Khaskheli i saradnika (2015) IC₅₀ vrednosti su postignute pri znatno nižim koncentracijama nego u našem radu; tako je redukciona sposobnost vrelog vodenog ekstrakta gljive *A. auricula-judae* pri koncentraciji od 1.5 mg/ml iznosila 73.29%.

Kako nisu utvrđene EC₅₀ vrednosti ekstrakata gljive *A. auricula-judae* nije bilo moguće izraziti ni koeficijent korelacije između sposobnosti redukcije Fe³⁺ jona i različitih komponenata ekstrakata.

5.9.3.3. Sposobnost redukcije jona gvožđa (FRAP) ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Ispitivanje ekstrakata gljive *S. crispa* pokazalo je zavisnost redukcionu sposobnosti od primenjene koncentracije sa linearnim trendom slabog intenziteta. Generalno, ekstrakti nisu imali naročito izraženu sposobnost redukcije jona gvožđa (Slika 29.). Sirovi alkalni ekstrakt je bio jači od vodenog. α-glukani su se pokazali kao jedina među testiranim komponentama ekstrakata koja utiče na redukcionu sposobnost, mada korelacija nije naročito jaka (r = -0.4685).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 29. Sposobnost redukcije jona Fe^{3+} ekstrakata gljive *S. crispa*

Ovi ekstrakti nisu sadržali fenolna jedinjenja pa je mehanizam redukcije jona gvožđa bio nepredvidiv. Tačnije, na primeru ekstrakata gljive *S. crispa* može se uočiti kako odsustvo jedne komponente drastično menja mehanizam delovanja. Kod druge dve gljive, koje sadrže fenolna jedinjenja ni jedna od komponenata ekstrakata nije se značajnije izdvajala kao odgovorna za redukcionu sposobnost. Sa druge strane, odsustvo fenolnih jedinjenja potpuno je menjao odgovor zabeležen kod *S. crispa*.

Jedino u slučaju gljive *S. crispa* enzimaska modifikacija je dovela do poboljšanja antioksidativne sposobnosti testirane ovom metodom, pa je MSV mnogo efikasniji u redukciji jona gvožđa od sirovog vodenog ekstrakta. Ovakav trend nije zabeležen pri modifikaciji alkalnog ekstrakta.

Tabela 25. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* za sposobnost redukcije jona Fe³⁺

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
Askorbinska kis.	<0.01 ± 0.00 ^{aB}
SV	>5.00
SA	>5.00
MSV	3.91 ± 1.25 ^b
MSA	>.00

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbanca 0.5. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

Primenom metode za merenje sposobnosti redukcije jona gvožđa utvrđeno je da ključnu ulogu imaju fenolna jedinjenja, koja se ponašaju kao donori elektrona te tako vrše redukciju Fe³⁺ do Fe²⁺. Shodno tome, ekstrakti gljive *F. fomentarius* bili su najefikasniji, dok je kod ekstrakata gljive *S. crispa* redukciona sposobnost bila najslabije izražena, što je u skladu sa činjenicom da ovi uzorci nisu sadržali fenolna jedinjenja. Enzimaska modifikacija negativno se odrazila na redukcionu moć svi uzoraka osim modifikovanog vodenog ekstrakta gljive *S. crispa*.

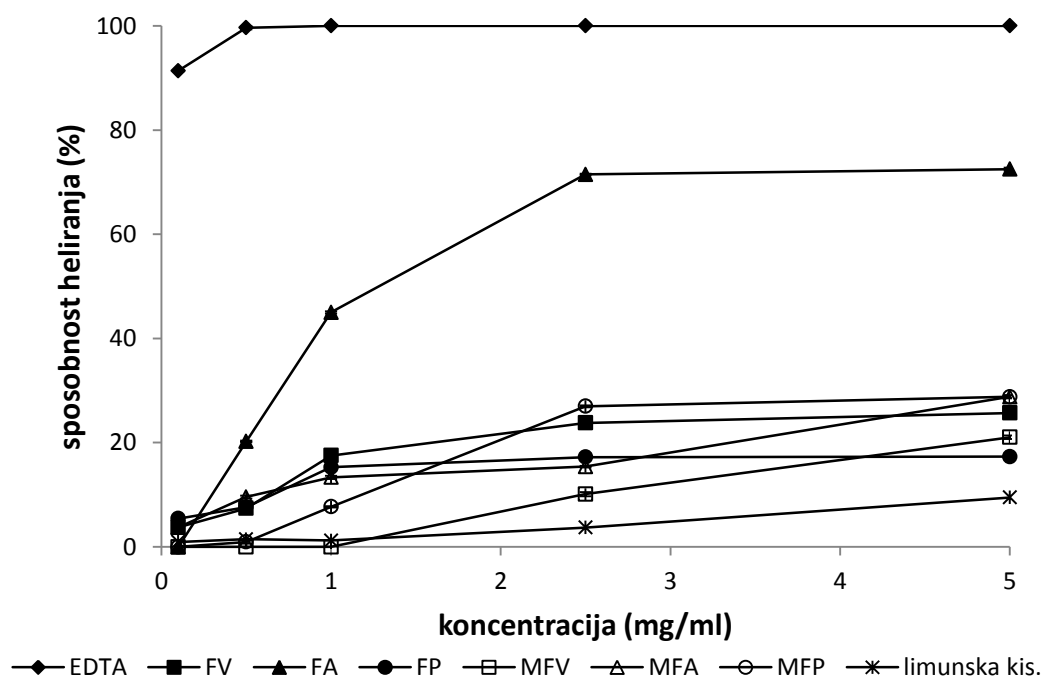
5.9.4. Sposobnost heliranja jona gvožđa

Metalni joni se ponašaju kao katalizatori oksidativnih promena, naročito u hrani, što za posledicu ima degradaciju funkcionalnih komponenata (Granieri et al., 2016). Takvi su divalentni joni prelaznih metala, Fe²⁺ i Cu²⁺, koji u zavisnosti od uslova okoline mogu inicirati lipidnu peroksidaciju. Krajnji efekat je promena ukusa i mirisa (Santos et al., 2017). To je moguće kontrolisati smanjenjem dostupnosti jona metala odnosno primenom helirajućih agenasa. Ova jedinjenja su sposobna da se kompetitivno vežu za jone metala i tako ih prevedu u rastvornu formu (Schenkeveld et al., 2017). Ranija istraživanja su

pokazala da gljive imaju visok antioksidativni kapacitet pri testiranju u *in vitro* uslovima (Islam et al., 2016). Imajući u vidu negativan efekat gvožđa u prehrambenim proizvodima, i antioksidativnu aktivnost gljiva, u radu je ispitana sposobnost ekstrakata da heliraju jone gvožđa.

5.9.4.1. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Ekstrakti gljive *F. fomentarius* ispoljili su sposobnost heliranja jona gvožđa s tim što je kod sirovih ekstrakata zavisnost efekta od koncentracije bila logaritamska, a kod modifikovanih linearna. Svi testirani ekstrakti su bili jači helirajući agensi od limunske kiselina, ali slabiji od EDTA, pri svim testiranim koncentracijama (Slika 30.).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 30. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive *F. fomentarius*

Najizraženiji efekat je zapažen kod vrelog alkalnog ekstrakta ($EC_{50} = 1.36 \pm 0.02$ mg/ml, Tabela 26.), koji je pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji imao sposobnost heliranja od $72.51 \pm 0.26\%$. EDTA je pri istoj koncentraciji ispoljila 100% sposobnost heliranja jona gvožđa.

Tabela 26. Vrednosti EC_{50} polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius* za sposobnost heliranja jona gvožđa

EC_{50} (mg/ml) ^A	
EDTA	$<0.10 \pm 0.00^{aB}$
Limunska kis.	>5.00
FV	>5.00
FA	1.36 ± 0.02^b
FP	>5.00
MFV	>5.00
MFA	>5.00
MFP	>5.00

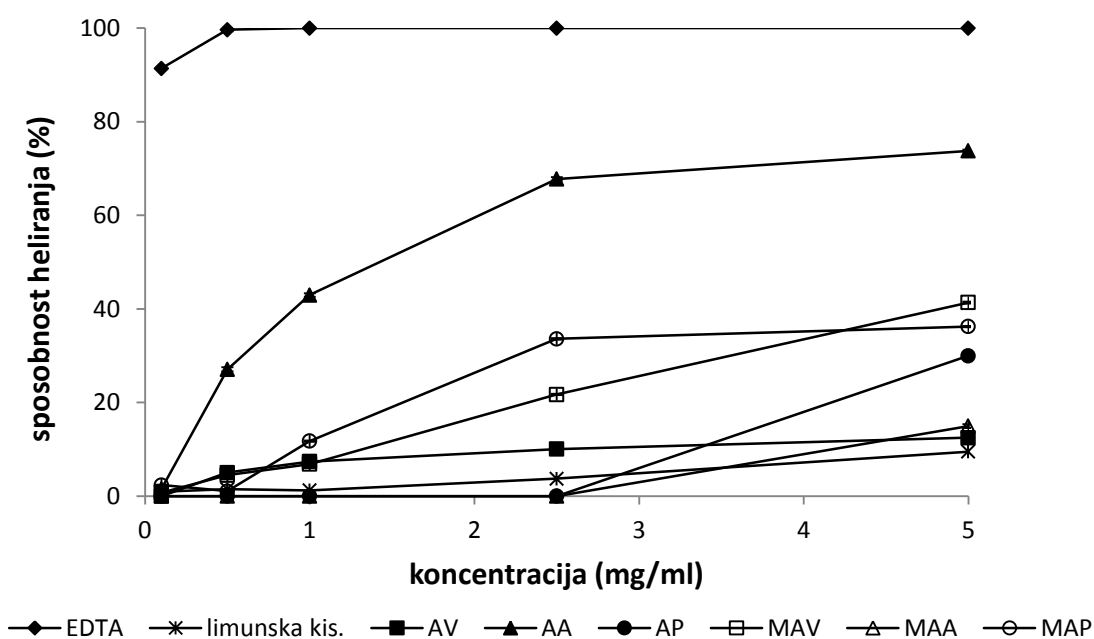
^A EC_{50} vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je helirano 50% fero jona. EC_{50} vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

Isti uticaj načina ekstrakcije zapazili su i Klaus i saradnici (2015), pa je alkalni ekstrakt gljive *Grifola frondosa* bio bolji helator od sirovog vodenog ekstrakta. Modifikovani prečišćeni ekstrakt (MFP) je pri nižim koncentracijama bio slabiji od ostalih uzoraka, uključujući FP, da bi pri koncentraciji od 5 mg/ml prestigao efekat ekstrakta čijom je modifikacijom dobijen, tj. FP. Neki autori sugerišu da je za sposobnost heliranja ekstrakata gljiva odgovorna proteinska komponenta (Petrović et al., 2016). Međutim, u našem radu nije bilo moguće ustanoviti korelaciju sa bilo kojom od komponenata ekstrakata.

5.9.4.2. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstraktata gljive *Auricularia auricula-judae*

Najjaču sposobnost heliranja jona gvožđa među ekstraktima gljive *A. auricula-judae* pokazao je vreli alkalni ekstrakt (AA), dok su ostali bili znatno slabiji. Modifikacija ekstraktata nije imala uniformni efekat, pa je tako vodeni ekstrakt nakon modifikacije bio efikasniji helator jona metala, što je primećeno i kod prečišćenog ekstrakta (Slika 31.) Modifikacija se na alkalni ekstrakt odrazila negativno.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 31. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstraktata gljive *A. auricula-judae*

Zavisnost je kod modifikovanih ekstraktata bila linearna, dok su sirovi ekstrakti pokazivali logaritamsku zavisnost ispitivane antioksidativne sposobnosti od koncentracije.

Primenom kombinovanih rastvarača, Islam i saradnici (2016) su dobili ekstrakt ove gljive čija je sposobnost heliranja jona gvožđa iznosila $1.98 \pm 0.09 \mu\text{mol EDTA E/g}$, što je bila i najniža vrednost među 43 različite vrste gljiva poreklom iz Kine.

Tabela 27. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* za sposobnost heliranja jona gvožđa

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
EDTA	<0.10 ± 0.00^{ab}
Limunska kis.	>5.00
AV	/
AA	1.33 ± 0.01^b
AP	>5.00
MAV	>5.00
MAA	>5.00
MAP	>5.00

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je helirano 50% fero jona. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

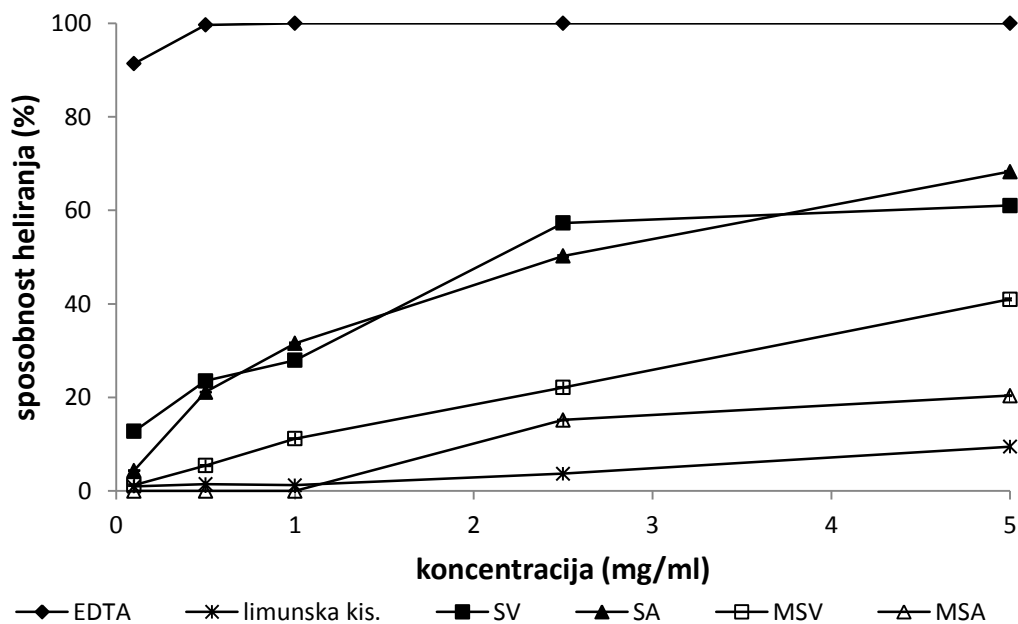
Nisu ustanovljene EC₅₀ vrednosti za testirane koncentracije ekstrakata ove gljive, osim kod alkalnog ekstrakta, te nije moguće ustanoviti kako je sadržaj pojedinih komponenata uticao na sposobnost heliranja fero jona.

5.9.4.3. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Ispitivanjem sposobnosti heliranja jona gvožđa pokazalo se da su svi uzorci bili značajno slabiji helirajući agensi od EDTA, ali i jači od limunske kiseline, pri svim testiranim koncentracijama.

Kako ovi uzorci nisu sadržali fenolna jedinjenja ispitivani efekat je imao najjaču korelaciju sa β-glukanima (r = 0.6971) i α-glukanima (r = -0.663). Kao i kod druge dve gljive zapaženo je da se sa primenom modifikacije menja tip zavisnosti između sposobnosti heliranja i koncentracije uzoraka; kod sirovih ekstrakata veza je logaritamska dok je kod modifikovanih linearna. Time je promena helirajućeg efekta dinamičnija kod prve grupe

uzoraka, a postojeća korelacija ukazuje na značaj količine glukana i njihovih kvalitativnih osobina.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 32. Sposobnost heliranja jona gvožđa ekstrakata gljive *S. crista*

Premda su istraživanja pokazala da su za helirajuću sposobnost gljiva ključna fenolna jedinjenja (naročito pojedinačne frakcije) i proteini, naši rezultati ukazuju da i druge grupe jedinjenja ispoljavaju uticaj (glukani) (Islam et al., 2016; Petrović et al., 2016).

Uzorci gljive *S. crista* nisu sadržali fenolna jedinjenja; ipak, pokazivali su relativno dobru sposobnost heliranja jona Fe^{2+} . Osim toga, svi modifikovani ekstrakti ispoljili su linearnu zavisnost od koncentracije uzorka naspram logaritamske zavisnosti koja je postojala kod sirovih polisaharidnih ekstrakata.

Tabela 28. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* za sposobnost heliranja jona gvožđa

EC ₅₀ (mg/ml) ^A	
EDTA	<0.10 ± 0.00 ^{aB}
Limunska kis.	>5.00
SV	2.07 ± 0.01 ^b
SA	2.29 ± 0.04 ^b
MSV	>5.00
MSA	>5.00

^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je helirano 50% fero jona. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

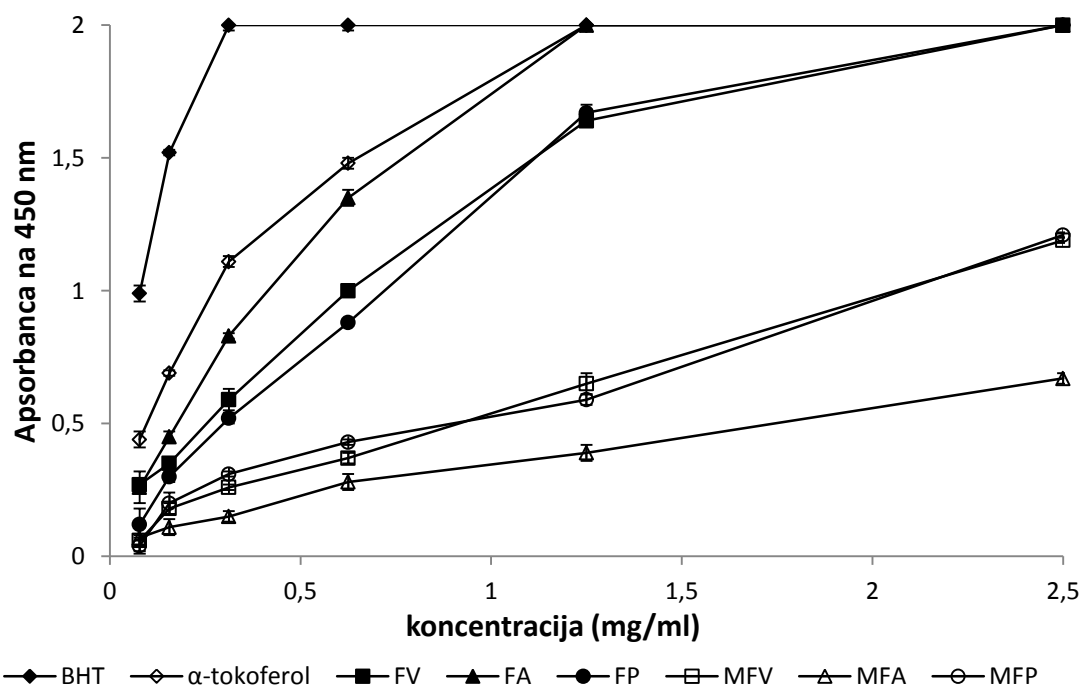
5.9.5. Sposobnost redukcije jona bakra (CUPRAC)

Ova metoda je razvijena kao odgovor na brojne nedostatke postojećih metoda za procenu antioksidativne aktivnosti. Jedan od osnovnih problema kod *in vitro* metoda je pH vrednost, koja je kod FRAP metode izuzetno niska u odnosu na fiziološku vrednost (Özyürek et al., 2011). Takođe, metode favorizuju samo hidrofilne ili samo hidrofobne komponente. Osim toga, postojeće metode koje se koriste za procenu antioksidativne aktivnosti ne uzimaju u obzir sposobnost šećera da redukuju jone metala kao što je bakar (Huang et al., 2005).

CUPRAC metod koristi Cu²⁺kompleksni reagens koji može da oksiduje supstance rastvorne u vodi, kao i u mastima, a reaktivan je u prisustvu svih tipova biološki važnih antioksidanata (Özyürek et al., 2011) Metod se bazira na transferu elektrona, pri fiziološkoj pH vrednosti. Cu²⁺ se redukuje do Cu¹⁺ koji sa neokuproinom gradi stabilan kompleks (Apak et al., 2004; Öztürk et al., 2011).

5.9.5.1. Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Ekstrakti gljive *F. fomentarius*, naročito sirovi, pokazali su se kao jaka redukciona sredstva u ovoj metodi. Poređenje je vršeno u odnosu na BHT i α -tokoferol (Slika 33.). Najefikasniji je bio sirovi alkalni ekstrakt čiji je efekat bio izjednačen sa efektom standarda već pri koncentraciji od 1.25 mg/ml, dok mu je EC_{50} vrednost iznosila 0.34 ± 0.02 (Tabela 29.).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 33. Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *F. fomentarius*

Vreli vodeni i delimično prečišćeni vodeni ekstrakt dostigli su standarde pri maksimalnoj ispitanoj koncentraciji, 2.5 mg/ml. Sposobnost redukcije jona bakra bila je očuvana i pri enzimskoj modifikaciji mada su ovi ekstrakti bili znatno slabiji od sirovih polisaharidnih ekstrakata. Kod sirovih ekstrakata zavisnost je bila logaritamska dok su modifikovani ekstrakti pokazivali linearnu zavisnost sposobnosti heliranja jona bakra od koncentracije.

Korelaciona analiza je pokazala da na redukcionu sposobnost ekstrakata gljive *F. fomentarius* najviše utiču proteini ($r = -0.8944$), α -glukani ($r = -0.8355$) i fenolna jedinjenja ($r = -0.6828$). Sve tri komponente su u značajnoj meri eliminisane prilikom enzimske modifikacije, pa je bilo očekivano da redukciona sposobnost modifikovanih ekstrakata bude manja. I drugi autori su utvrdili da na sposobnost redukcije jona bakra utiču fenolna jedinjenja, kada su u pitanju ekstrakti biljaka (Zengin et al., 2015).

Tabela 29. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *F. fomentarius* za sposobnost redukcije jona bakra

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
BHT	0.079 ± 0.02^{aB}
α-tokoferol	0.25 ± 0.01^b
FV	0.625 ± 0.02^c
FA	0.34 ± 0.02^d
FP	0.71 ± 0.04^e
MFV	2.05 ± 0.01^f
MFA	2.50 ± 0.02^g
MFP	2.04 ± 0.01^f

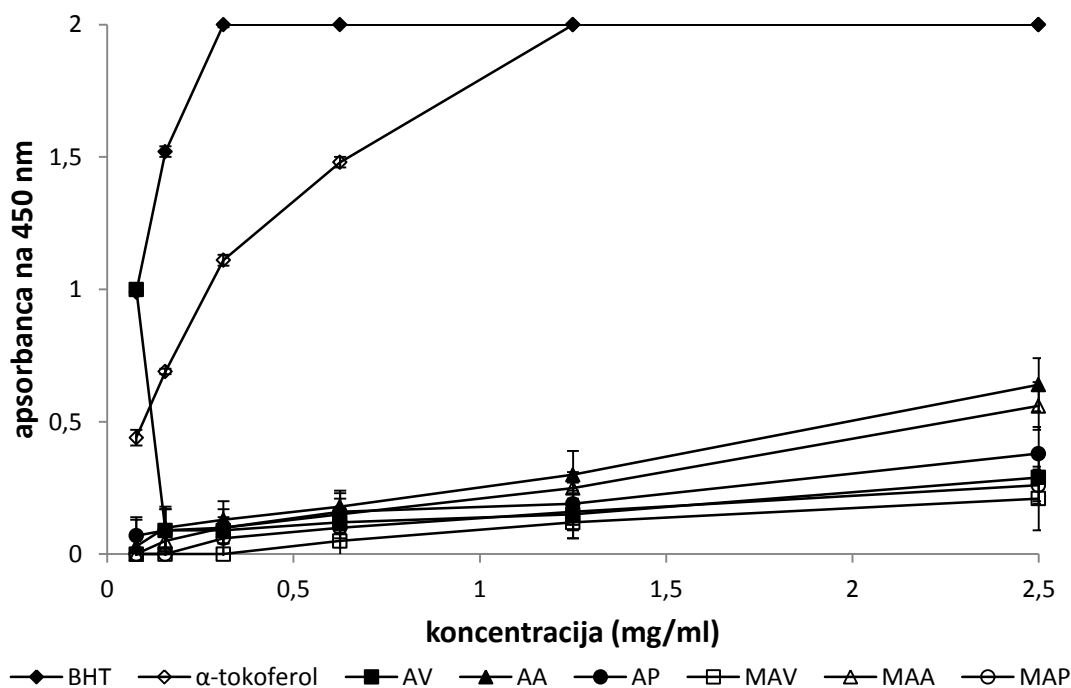
^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbancija 0.5. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

5.9.5.2. Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Ispitivanjem ekstrakata metodom redukcije jona bakra utvrđeno je da između posmatrane reakcije i koncentracije postoji linearna zavisnost, kako kod sirovih tako i kod enzimski tretiranih uzoraka. To nije bio slučaj kod uzoraka dobijenih različitim postupcima ekstrakcije gljive *F. fomentarius* (Slika 33.). Osim toga, ekstrakti *A. auricula-judae* bili su

znatno slabiji nego ekstrakti gljive *F. fomentarius*, a korelaciona analiza je pokazala da u ovom slučaju samo proteini utiču na redukcionu sposobnost ($r = -0.9733$).



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija ($n=3$)

Slika 34. Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *A. auricula-judae*

Iako najefikasniji od svih testiranih ekstrakata ove gljive, AA i MAA bili su slabija redukciona sredstva od α -tokoferola (Slika 34).

Najizraženiji efekat ispoljio je vreli alkalni ekstrakt, dok je sledeći po jačini bio modifikovani alkalni ekstrakt (Slika 34.). Nesumnjivo, alkalnom ekstrakcijom se u kvalitativnom i kvantitativnom smislu ostvaruju najbolji rezultati. Vodeni i modifikovani vodeni ekstrakt bili su najslabiji pri testiranju ovom metodom.

Tabela 30. Vrednosti EC₅₀ polisaharidnih ekstrakata gljive *A. auricula-judae* za sposobnost redukcije jona bakra

	EC ₅₀ (mg/ml) ^A
BHT	0.079 ± 0.02^{ab}
α-tokoferol	0.25 ± 0.01^b
AV	>2.50
AA	2.32 ± 0.02^c
AP	>2.50
MAV	>2.50
MAA	2.48 ± 0.03^d
MAP	>2.50

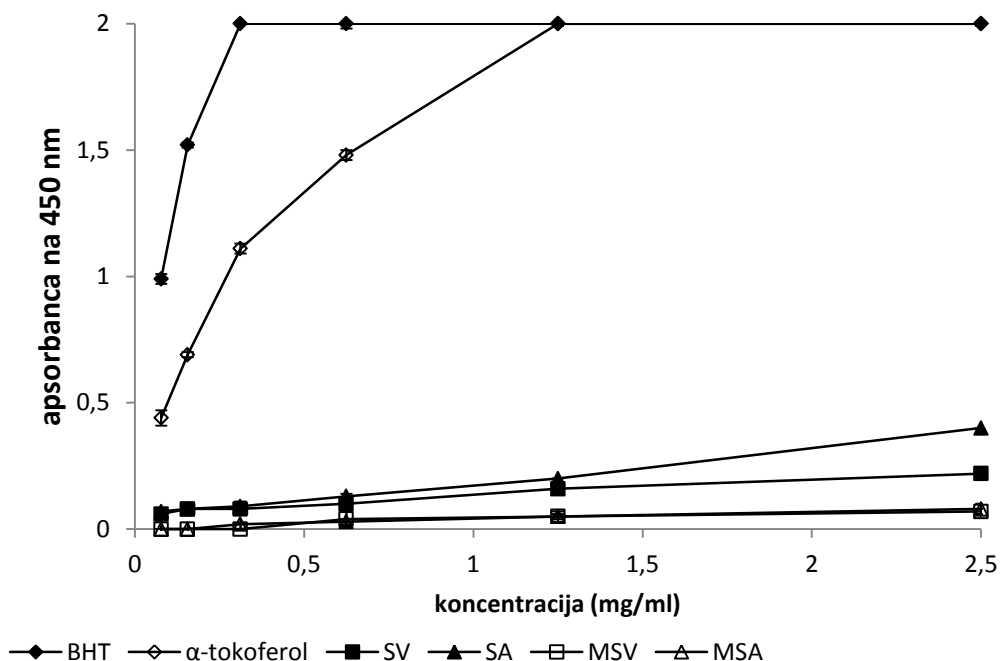
^AEC₅₀ vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbancija 0.5. EC₅₀vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

5.9.5.3. Sposobnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Ekstrakti gljive *S. crispa* ispoljili su relativno slabu sposobnost redukcije jona bakra, a zavisnost je bila linearna. Najizraženiju redukcionu sposobnost ispoljio je sirovi alkalni ekstrakt a zatim sirovi vodeni ekstrakt, dok su modifikovani uzorci bili slabiji redukciono agensi (Slika 35.). Time je ponovo potvrđeno da enzimaska modifikacija dovodi do negativnih promena u odnosu na antioksidativnu sposobnost ispitanu ovom metodom.

Korelacionu zavisnost između pojedinih komponenata ekstrakata i sposobnosti redukcije jona bakra nije bilo moguće utvrditi jer nisu određene EC₅₀ vrednosti. Očigledno, efekat nije posledica samo jedne komponente već nastaje usled sinergizma većeg broja biomolekula i, još uvek, nerasvetljenih mehanizama. U slučaju gubitka jedne od komponenata dolazi do slabljenja redukcionne moći pri čemu se efekat raspoređuje na preostala jedinjenja, ali ne u proporcionalnoj meri. Enzimске modifikacije značajno se odražavaju na sposobnost redukcije posmatranih ekstrakata.



Svi rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija (n=3)

Slika 35. Spособnost redukcije jona bakra ekstrakata gljive *S. crispa*

Tabela 31. Vrednosti EC_{50} polisaharidnih ekstrakata gljive *S. crispa* za sposobnost redukcije jona bakra

	$EC_{50}(\text{mg/ml})^A$
BHT	0.079 ± 0.02^{ab}
α-tokoferol	0.25 ± 0.01^b
SV	>2.50
SA	>2.50
MSV	>2.50
MSA	>2.50

^A EC_{50} vrednost: efektivna koncentracija pri kojoj je apsorbanca 0.5. EC_{50} vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

^BSve vrednosti su izražene kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). Sve vrednosti u okviru kolone obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

Antioksidanti su supstance koje imaju sposobnost da reaguju sa slobodnim radikalima, bilo da obezbeđuju elektrone koji stabilizuju radikale ili prevode radikale do forme koja nije aktivna; na taj način oni štite biološke sisteme od oksidativnog stresa (Ren et al., 2014; Zengin et al., 2015). Antioksidanti mogu biti dobijeni iz prirodnih izvora ili su sintetički. Sintetički antioksidanti su efikasni i neizbežni u mnogim prehrambenim proizvodima ali se sve češće teži njihovoj zameni prirodnim jedinjenjima usled brojnih neželjenih efekata. Sintetski antioksidanti smatraju se odgovornim za oštećenja jetre i karcinogenezu (Ren et al., 2014). Stoga su u poslednje vreme sve interesantniji antioksidanti poreklom iz hrane, odnosno iz različitih biljaka ali i gljiva (Kozarski et al., 2015). Veruje se da hrana bogata antioksidantima može doprineti prevenciji bolesti povezanih sa oksidativnim stresom (Apak et al., 2004).

Zahtevi potrošača uticalisu na naučnu zajednicu i regulatorna tela da pojačaju napore u potrazi za namirnicama i prirodnim izvorima antioksidanata. Pokazalo se da gljive predstavljaju dobar izvor ovih supstanci. Sproveden je skrining brojnih vrsta i u najvećem broju slučajeva gljive su pokazale značajne rezultate (Kozarski et al., 2015), što je potvrđeno i u ovom radu.

5.10. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima (ACE)

Prema podacima svetske zdravstvene organizacije (WHO) srčana ishemija predstavlja najčešći uzrok smrti u poslednjih 15 godina, a procena je da će se ovaj trend zadržati do 2030. godine. Ova koronarna bolest može biti akutna i hronična, pri čemu je hronična ishemija prvenstveno uzrokovana slobodnim radikalima i visokim krvnim pritiskom (Himaya et al., 2012). Kao terapija se koriste vazodilatatori i antikoagulanti, ali i ACE-inhibitori.

Angiotenzin-I-konvertujući enzim je egzopeptidaza prisutna u mnogim tkivima, čija je uloga kontrola krvnog pritiska preko renin-angiotenzin sistema. Ovaj enzim prevodi inaktivni dipeptid angiotenzin I u oktapeptid angiotenzin II, a uz to vrši i inaktivaciju bradikinina, koji se ponaša kao vazokonstriktor (Lee et al., 2004).

Inhibicijom ACE ostvaruje se antihipertenzivni efekt, a savremena medicinska praksa uključuje korišćenje sintetičkih inhibitora. Premda vrlo efikasni ovi preparati imaju brojna neželjena dejstva poput kašlja, alergijskih reakcija, osipa na koži i drugog (Choi et al., 2001; Lee et al., 2004). Otkriće ACE inhibitora u hrani usmerilo je pažnju naučne javnosti u pravcu potrage za supstancama prirodnog porekla koje ne ispoljavaju neželjene efekte. Tako je otkriveno da ACE inhibitore sadrže mahunarke, želatin, kazein, riba, pirinčano vino, sake, peršun, kukuruzni gluten, kvasci i gljive iz razdela *Basidiomycetes* (Choi et al., 2001; Lee et al., 2004).

5.10.1. Sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

U odnosu na komercijalni preparat za snižavanje krvnog pritiska, kaptopril ($EC_{50} = 0.006 \pm 0.000$ mg/ml) svi testirani ekstrakti imali su slabije dejstvo (Tabela 32.). Najefikasniji inhibitor ACE je bio vreli alkalni ekstrakt, potom vreli vodeni, dok je među sirovim ekstraktima delimično prečišćeni vodeni ekstrakt bio najslabiji. Kako su ACE inhibitori uglavnom peptidi, to je bilo očekivano da alkalni ekstrakt, sa najvišim sadržajem proteina, bude i najefikasniji (Lee et al., 2004; Vunduk et al., 2015). Osim toga, FA je imao i najizraženiju sposobnost heliranja jona metala, što se povezuje sa jačom inhibicijom ACE kao posledicom prirode angiotenzin I-konvertujućeg enzima, koji sadrži Zn u svojoj strukturi (Kozarski et al., 2015).

Testiranjem sposobnosti inhibicije ACE ekstrakata gljive *Grifola frondosa*, Choi i saradnici (2004) su utvrdili da vrela vodena ekstrakcija ima nepovoljan uticaj, jer visoka temperatura dovodi do denaturacije proteina. Kakosu svi ekstrakti u ovom radu bili podvrgnuti visokoj temperature ne može se zaključiti kako bi ona uticala na sposobnost inhibicije ACE u uslovima *in vitro*. Iako su bili izloženi povišenoj temperaturi sirovi polisaharidni ekstrakti su ispoljili sposobnost inhibicije ACE. Ovakvo ponašanje moglo je biti posledica različite konformacije polisaharida, ali i njihovog visokog udela, što je moglo delovati kao zaštitni sloj za proteine prisutne u ekstraktima. FP je bio najslabiji među

enzimski netretiranim ekstraktima, a dobijen je dijalizom vrelog vodenog ekstrakta. Time je potvrđeno da su visoka temperatura ekstrakcije i gubitak malih peptidnih frakcija tokom dijalize rezultirali smanjenjem sposobnosti snižavanja krvnog pritiska delovanjem na ACE.

Tabela 32. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujužeg enzima ekstrakata gljive *F. fomentarius*, pri različitim koncentracijama

uzorak	% inhibicije ACE			EC ₅₀ ^B (mg/ml)
	4 mg/ml	2 mg/ml	0.5 mg/ml	
FV	85.41 ± 0.67 ^{a,bA}	61.73 ± 0.48 ^a	31.25 ± 0.69 ^a	0.92 ± 0.12 ^a
FA	88.20 ± 0.52 ^a	68.10 ± 0.51 ^b	41.70 ± 0.67 ^b	0.64 ± 0.10 ^b
FP	71.60 ± 0.55 ^c	50.62 ± 0.54 ^c	14.81 ± 0.70 ^c	1.86 ± 0.15 ^c
MFV	85.53 ± 0.61 ^b	65.79 ± 0.50 ^b	23.68 ± 0.65 ^d	1.20 ± 0.15 ^d
MFA	82.93 ± 0.49 ^b	53.66 ± 0.49 ^d	31.71 ± 0.72 ^a	1.22 ± 0.12 ^d
MFP	78.05 ± 0.57 ^d	53.65 ± 0.53 ^d	15.85 ± 0.70 ^c	1.63 ± 0.09 ^e

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^ARazličita slova u superskriptu u okviru iste kolone ukazuju da se uzorci statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

^BKoncentracija uzorka pri kojoj se postiže 50% inhibicije ACE.

Interesantne promene zapažene su kod modifikovanih uzoraka. Iako je MFP sadržao najviše ukupnih proteina nije bio naročito efikasan u ovoj metodi. Naprotiv, efekat inhibicije MFP je bio najslabiji. To ukazuje na činjenicu da osim proteina na ACE inhibiciju mogu uticati i druge komponente, moguće kompleksi proteina i polisaharida, koji enzimskim tretmanom bivaju narušeni. Osim toga, enzimska modifikacija je uključivala itretman zagrevanja na 100°C tokom 30 minuta, da bi se izvršila inaktivacija enzima. Tokom ovog koraka neminovno je došlo do denaturacije prisutnih proteina koji su time izgubili svoju funkciju.

Korelaciona analiza je pokazala vrlo jak uticaj sadržaja proteina na sposobnost inhibicije ACE kod sirovih ekstrakata ($r = -0.9875$), dok je nakon enzimske modifikacije efekat na ACE bio posledica prisustva ukupnih i β -glukana ($r = 0.8595$ i $r = 0.8531$). Kako je korelacija imala pozitivan predznak to je evidentno da su gubitak proteinskih frakcija i promena strukture uticali na sposobnost ekstrakata da vrše inhibiciju ACE.

5.10.2. Sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Testiranjem sposobnosti ekstrakata gljive *A. auricula-judae* da inhibira ACE utvrđeno je da su svi ekstrakti slabiji inhibitori od kaptoprila. Najefikasnijim se pokazao prečišćeni vodeni ekstrakt, dok je vreli vodeni ekstrakt bio najslabiji ACE inhibitor (Tabela 33.). Kod svih testiranih uzoraka postojala je logaritamska zavisnost efekta od koncentracije, a pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (4 mg/ml) vrednost % inhibicije ACE svih ekstrakata je bila bliska, izuzev za AP. Sadržaj proteina u ekstraktima je bio relativno nizak i nije utvrđena korelacija između ove komponente i posmatranog efekta. Korelacija je utvrđena između % inhibicije ACE i sadržaja ukupnih i β -glukana ($r = -0.582$ i $r = -0.5615$). Pojedinačno gledano na sposobnost inhibicije ACE sirovih ekstrakata najviše su uticala fenolna jedinjenja ($r = 0.8597$) i β -glukani ($r = -0.8035$).

Tabela 33. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima ekstrakata gljive *A. auricula-judae*, pri različitim koncentracijama

uzorak	% inhibicije ACE			EC ₅₀ ^B (mg/ml)
	4 mg/ml	2 mg/ml	0.5 mg/ml	
AV	65.48 ± 0.43 ^{aA}	45.14 ± 0.37 ^a	29.17 ± 0.61 ^{a,b}	1.95 ± 0.09 ^a
AA	64.58 ± 0.48 ^a	50.00 ± 0.42 ^b	33.33 ± 0.65 ^c	1.67 ± 0.10 ^b
AP	79.86 ± 0.54 ^b	63.19 ± 0.46 ^c	30.56 ± 0.52 ^a	1.14 ± 0.11 ^c
MAV	64.29 ± 0.51 ^a	39.28 ± 0.39 ^d	21.43 ± 0.73 ^d	2.43 ± 0.10 ^d
MAA	64.18 ± 0.47 ^a	43.21 ± 0.31 ^{a,b}	26.85 ± 0.68 ^c	2.16 ± 0.12 ^e
MAP	65.32 ± 0.46 ^a	42.78 ± 0.36 ^b	27.11 ± 0.54 ^{b,e}	2.11 ± 0.10 ^f

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^ARazličita slova u superskriptu u okviru iste kolone ukazuju da se uzorci statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Tukey HSD test.

^BKoncentracija uzorka pri kojoj se postiže 50% inhibicije ACE.

Vrela vodena ekstrakcija nepovoljno se odrazila na posmatranu sposobnost sirovih polisaharidnih ekstrakata. Choi i saradnici (2001) su dokazali da visoka temperatura nepovoljno deluje na sposobnost inhibicije ACE, a u radu su testirali različite vrste gljiva, pri čemu su ustanovili da pojedini uzorci imaju vrlo niske koncentracije pri kojima dostižu

50% aktivnosti. Tako je za *G. frondosa* IC₅₀ vrednost iznosila 0.95 mg/ml, za *Coriouis versicolor* 3.5 i za *Pleurotus coccinea* 4.2 mg/ml. U istom radu su ispitivani i različiti ekstrakti gljive *A. auricula-judae*, pri čemu je najslabiji bio vreli vodeni ekstrakt čiji je % inhibicije ACE iznosio 16.4 (Choi et al., 2001).

5.10.3. Sposobnost inhibicije angiotenzin-I-konvertujućeg enzima ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Ekstrakti gljive *S. crispa* pokazali su sposobnost inhibicije ACE, pri čemu je sa povećanjem koncentracije ekstrakta rastao i % inhibicije ACE, a zavisnost je bila logaritamska. Najefikasniji je bio sirovi alkalni ekstrakt, koji je pri najvećoj koncentraciji ostvario inhibiciju ACE od 86.42 ± 0.52% (Tabela 34.).

Tabela 34. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima ekstrakata gljive *S. crispa*, pri različitim koncentracijama

	% inhibicije ACE			EC ₅₀ ^A (mg/ml)
	4 mg/ml	2 mg/ml	0.5 mg/ml	
SV	67.79 ± 0.60 ^{ab}	44.40 ± 0.51 ^a	25.93 ± 0.46 ^a	1.95 ± 0.07 ^a
SA	86.42 ± 0.52 ^b	55.56 ± 0.48 ^b	32.10 ± 0.48 ^b	1.15 ± 0.10 ^b
MSV	82.05 ± 0.47 ^c	42.31 ± 0.50 ^c	19.23 ± 0.50 ^c	2.28 ± 0.10 ^c
MSA	64.21 ± 0.46 ^d	38.23 ± 0.52 ^d	13.09 ± 0.55 ^d	2.58 ± 0.09 ^d

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^ARazličita slova u superskriptu u okviru iste kolone ukazuju da se uzorci statistički značajno razlikuju, p ≤ 0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

^BKoncentracija uzorka pri kojoj se postiže 50% inhibicije ACE.

Testirani ekstrakti su bili znatno slabiji od metanolnog ekstrakta gljive *Cantharellus cibarius* čija je IC₅₀ vrednost bila 0.063 mg/ml (Choi et al., 2001; Kozarski et al., 2015). Na efekat inhibicije ACE najviše su uticali α-glukani (r = -0.9755). Proteini u ovom slučaju nisu bili od značaja (r = 0.255). Enzimaska modifikacija je u značajnoj meri umanjila sposobnost inhibicije ACE najverovatnije usled gubitka α-glukana i denaturacije proteina.

Ipak, i takvi ekstrakti bili su efikasniji od mnogih testiranih od strane drugih autora (Choi et al., 2001).

Ekstrakti sve tri gljive bili su slabiji inhibitori ACE u poređenju sa komercijalnim preparatom za snižavanje krvnog pritiska, kaptoprilom. Korelaciona analiza je pokazala da nisu samo proteini i njihova količina odgovorni za ovakav efekat, već i drugi molekuli, što je u saglasnosti sa rezultatima i tvrdnjama drugih autora (Jabeen i Aslam, 2013; Vunduk et al., 2015; Petrović et al., 2016). Istraživanje je pokazalo da gljive mogu poslužiti kao dobra alternativa komercijalnim sredstvima za regulaciju krvnog pritiska. Osim što su prirodnog porekla ekstrakti gljiva ne poseduju niz neželjenih osobina kao komercijalni preparati, a mogu se unositi kao hrana ili dijetetski suplementi.

5.11. Antitumorna svojstva ekstrakata

Citotoksično/antitumorno dejstvo ekstrakata je ispitivano na odabranim ćelijskim linijama: humani cervikalni adenokarcinom HeLa, mijeloidna leukemija K562 i humani karcinom dojke MDA-MB-453.

5.11.1. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive *Fomes fomentarius*

Svi sirovi ekstrakti ispoljili su umerenu do jaku citotoksičnu aktivnost prema korišćenim ćelijskim linijama. Sirovi vodeni i delimično prečišćeni ekstrakti pokazali su umereni efekat prema HeLa i MDA-MB-453 ćelijama, dok su svi sirovi ekstrakti bili znatno efikasniji prema K562 ćelijskoj liniji (Tabela 35.). Vreli alkalni ekstrakt imao je niske IC₅₀ vrednosti prema sva tri tipa ćelija, a naročito prema K562. Ipak, nije postojala statistički značajana razlika u odnosu na efekat FV, prema istoj ćelijskoj liniji. Modifikovani ekstrakti takođe su pokazali citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama mada znatno slabiju u odnosu na ekstrakte od kojih su dobijeni. Modifikovani vodeni ekstrakt nije pokazao aktivnost pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (3 mg/ml).

Kolundzić i saradnici (2016) takođe su testirali citotoksično dejstvo gljive *F. fomentarius* na različite tumorske linije, između ostalog i na HeLa ćelije. Ispitivani ekstrakti dobijeni različitim postupcima ekstrakcije, uključujući i vodeni ekstrakt, pokazali su sličnu aktivnost kao i FV, FA i FP, uključujući i sve modifikovane ekstrakte.

Prethodna istraživanja su pokazala efikasnost ekstrakata dobijenih iz plodonosnog tela i micelijuma gljive *F. fomentarius* prema različitim malignim ćelijama. Ito i saradnici (1976) navode da tečni ekstrakt ove gljive ispoljava 80% efikasnost prema sarcoma 180 testiranom na miševima, ističući polisaharide kao inhibitore rasta malignih ćelija. Iz submerzno odgajenog micelijuma truda izolovan je endopolisaharid za koji je utvrđeno da ima jako antiproliferativno delovanje na ćelije raka, i to humani rak želudca (SGC-7901 i MKN-45), a kako je citotoksično dejstvo na zdrave kontrolne ćelije bilo zanemarljivo, ekstrakti su označeni kao bezbedni u tretiranju kancera (Chen et al., 2011).

Tabela 35. Vrednosti IC₅₀ ekstrakata gljive *F. fomentarius*

uzorak	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD ^B		
	HeLa	K562	MDA-MB-453
FV	1.00 ± 0.40 ^{aa}	0.32 ± 0.45 ^a	1.13 ± 0.22 ^a
FA	0.56 ± 0.21 ^b	0.31 ± 0.23 ^a	0.88 ± 0.48 ^b
FP	1.10 ± 0.52 ^c	0.59 ± 0.57 ^b	1.50 ± 0.53 ^c
MFV	>3.00	>3.00	>3.00
MFA	1.40 ± 0.14 ^d	0.16 ± 0.26 ^c	1.93 ± 0.20 ^d
MFP	1.25 ± 0.11 ^e	0.36 ± 0.40 ^d	1.49 ± 0.31 ^c

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^ARazličita slova u superskriptu u okviru iste kolone ukazuju da se uzorci statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

^BKoncentracija uzorka pri kojoj je uništeno 50% malignih ćelija.

Ekstrakti testirani u ovom radu imali su efekat čiji je intenzitet zavisio od primenjene koncentracije. Isto su zapazili i Chen i saradnici (2008). U njihovom istraživanju egzopolisaharid dobijen iz micelijuma truda ispoljio je antiproliferativno delovanje, u rasponu koncentracija od 0.125-1 mg/ml, koje je bilo jače što je primenjena koncentracija bila viša. Interesantno je da sirovi alkalni ekstrakt nije sadržao najveću količinu β-glukana. Naprotiv, ovaj ekstrakt imao je daleko niži sadržaj glukanske

komponente nego ostali uzorci (Tabela 5.). Sa druge strane, imao je najviše α -glukana i fenolnih jedinjenja.

Modifikacija ekstrakata primenom enzima dovela je do koncentrisanja β -glukana i gubitka značajnog dela α -glukana pri čemu je došlo i do smanjenja citotoksičnog dejstva. Verovatno je enzimski tretman doprineo gubitku bočnih nizova odgovornih za antiproliferativni efekat (Synytsya i Novak, 2013). Da nisu samo β -glukani važni za sposobnost ekstrakata gljiva da vrše inhibiciju proliferacije tumorskih ćelija-Sarkom 180 pokazali su Song i Du (2012). Aktivni polisaharid koji su testirali sadržao je u najvećoj meri α -glikozidne veze. To potvrđuje i Wasser (2002), navodeći da je za antitumorna svojstva polisaharida neophodno prisustvo β -(1→3) veze ali i β -(1→6) bočnih nizova. Ipak, kako su gljive veoma heterogen biološki materijal isključivo pravilo koje dovodi u vezu strukturu polisaharida i antitumornu aktivnost ne postoji (Wasser, 2002).

Osim polisaharida navodi se da ekstrakti gljive *F. fomentarius* sadrže i druga jedinjenja koja ispoljavaju citotoksično delovanje: estere i laktone, alkohole, aldehide i kumarine (Grienke et al., 2014). Jako citotoksično dejstvo FA može se delom objasniti i visokim sadržajem fenolnih jedinjenja za koja je poznato da ispoljavaju i antitumorno delovanje (Palacios et al., 2011). Takođe, alkalnom ekstrakcijom postiže se izdvajanje glukana koji nisu rastvorljivi u vodi (Wasser i Weiss, 1999).

Petrova i saradnici (2007) su utvrdili da su za antitumornu aktivnost gljive *F. fomentarius* prvenstveno odgovorna jedinjenja nerastvorna u vodi, a da je u osnovi delovanja inhibicija I κ B α fosforilacije, inhibicija I κ B α degradacije ili oba mehanizma istovremeno.

5.11.2. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive *Auricularia auricula-judae*

Ekstrakti gljive *A. auricula-judae* pokazali su veoma slabo citotoksično dejstvo prema datim ćelijskim linijama. Većina nije imala efekat pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji (Tabela 36.). Najjači je bio vreli vodeni ekstrakt što ukazuje da ovaj tip

ekstrakcije pogoduje dobijanju jedinjenja koja ispoljavaju antiproliferativni efekat. Svi ekstrakti testirani u ovom radu bili su slabo rastvorni u vodi, a Moradali i saradnici (2007) navode da se antitumorna aktivnost Judinog uveta povećava sa porastom rastvorljivosti u vodi, što su oni postigli hemijskom modifikacijom.

Tabela 36. Vrednosti IC₅₀ ekstrakata gljive *A. auricula-judae*

uzorak	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD ^B		
	HeLa	K562	MDA-MB-453
AV	>3.00 ^A	2.52 ± 0.12 ^a	2.52 ± 0.16
AA	>3.00	>3.00	>3.00
AP	>3.00	>3.00	>3.00
MAV	>3.00	>3.00	>3.00
MAA	>3.00	>3.00	>3.00
MAP	>3.00	2.67 ± 0.41 ^b	>3.00

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^ARazličita slova u superskriptu u okviru iste kolone ukazuju da se uzorci statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey HSD test.

^BKoncentracija uzorka pri kojoj je uništeno 50% malignih ćelija.

U literaturi se navodi da je polisaharid odgovoran za antitumorno dejstvo *A. auricula-judae* (1→3)-β-glukan dobijen iz plodonosnog tela (Wasseri Weiss, 1999). Song i Du (2010) su zapazili da ekstrakt iste gljive inhibira rast tumorskih ćelija kod miševa. U eksperimentima sprovedenim *in vivo*, na miševima *A. auricula-judae* je ispoljila veoma snažno dejstvo (Shamtsyan et al., 2004).

Kod većine testiranih ekstrakata nije bilo moguće odrediti IC₅₀ vrednost. Oni su bili slabije rastvorni u vodi od sirovih polisaharidnih ekstrakata pa je ovom prilikom potvrđen značaj hidrofilnosti ekstrakata za citotoksičnost prema malignim ćelijama.

5.11.3. Antitumorna svojstva ekstrakata gljive *Sparassis crispa*

Slaba citotoksična aktivnost uočena je kod ekstrakata gljive *S. crispa*, a efekat je zavisio od koncentracije.

Tabela 37. Vrednosti IC₅₀ ekstrakata SV, SA, MSV i MSA gljive *S. crispa*

uzorak	IC ₅₀ (mg/ml) ± SD ^A		
	HeLa	K562	MDA-MB-453
SV	>3.00	>3.00	>3.00
SA	>3.00	>3.00	>3.00
MSV	1.76 ± 0.24	0.37 ± 0.11	2.28 ± 0.30
MSA	>3.00	>3.00	>3.00

Rezultati su dati kao srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3).

^AKoncentracija uzorka pri kojoj je uništeno 50% malignih ćelija.

IC₅₀ vrednost je u većini slučajeva prevazilazila maksimalnu ispitivanu koncentraciju osim kod modifikovanog vodenog ekstrakta, koji je bio jak do umereno jak inhibitor svih testiranih ćelijskih linija (Tabela 37.). Kako su modifikovani ekstrakti izgubili veći deo α -glukana i proteina kvantitativna komponenta ekstrakata nije bila od presudnog uticaja na ovu biološku aktivnost. Verovatnije je da je kod MSV došlo do promene prostorne strukture i bolje izloženosti pojedinih aktivnih grupa.

β -glukan izolovan iz *S. crispa* je kod miševa sa razvijenim malignim oboljenjem doveo do oporavka leukocita uz intenziviranje produkcije IL-6 i INF- γ , tj. do intenzivnije produkcije citokina (Moradali et al., 2007).

Analiza je pokazala da ekstrakti sve tri gljive vrše inhibiciju proliferacije odabranih malignih ćelijskih linija, mada su u pojedinim slučajevima IC₅₀ vrednosti relativno visoke. Ovakvi rezultati upućuju na značaj gljiva u savremenoj medicini, ali još više kao pomoćnih sredstava za lečenje malignih oboljenja i očuvanje pravilnog rada čovekovog organizma.

6. ZAKLJUČAK

U radu su testirani sirovi i enzimski modifikovani ekstrakti gljiva *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crispa*. Cilj je bio utvrditi kako različiti tipovi ekstrakcije ali i primena enzima utiču na hemijsku strukturu ekstrakata i njihove biološke osobine.

1. Način ekstrakcije značajno je uticao na prinose ispitivanih gljiva. Alkalnom ekstrakcijom se potpunije razara ćelijski zid gljiva pa se ovim postupkom dobijaju viši prinosi, što se i potvrdilo kod gljiva *F. fomentarius* i *A. auricula-judae*. Kod gljive *S. crispa* najviši prinos je dobijen vrelom alkalnom ekstrakcijom što je verovatno posledica višeg udela u vodi rastvornih polisaharida. Dijaliza i alkoholna precipitacija uticale su na smanjenje mase sirovog vodenog ekstrakta jer su mali molekuli (< 8-10 kDa) prolazili kroz membranu za dijalizu.
2. Enzimaska modifikacija je dovela do dodatne redukcije prinosa ekstrakata. To se najintenzivnije manifestovalo kod alkalnih ekstrakata, dok promena kod delimično prečišćenih ekstrakata gotovo da nije bila značajna. Dijalizovani, tj. delimično prečišćeni ekstrakti su i najčistiji u pogledu prisustva jedinjenja malih molekulskih masa pa je gubitak mase bio minimalan.
3. Dijalizom i alkoholnom precipitacijom isprana je značajna količina rastvorljivih polisaharida, i to 57% kod *F. fomentarius* i 85% kod *A. auricula-judae*.
4. Gubitak prinosa usled uklanjanja α -glukana nakon primenjenog enzimskog tretmana bio je najizraženiji kod alkalnih ekstrakata *F. fomentarius* (90%) i *A. auricula-judae* (93%), kao i vodenog ekstrakta gljive *S. crispa* (96%). Najniži maseni gubici primećeni su kod modifikovanih dijalizovanih ekstrakata (*F. fomentarius* 13% i *A. auricula-judae* 33%).
5. Sirovi polisaharidni ekstrakti gljiva *A. auricula-judae* i *S. crispa* bili se veoma viskozni što je posledica agregacione sposobnosti nepravilnih pojedinačnih helikoidnih fragmenata glukana koji nastaju tokom ekstrakcije.
6. Sadržaj ukupnih polisaharida je bio viši kod sirovih vodenih ekstrakata, osim kod gljive *A. auricula-judae*. Primena dijalize i alkoholne precipitacije dovela je do koncentrisanja ukupnih polisaharida pa ih je najviše bilo u prečišćenim vodenim

ekstraktima. Nakon enzimske modifikacije snižena je količina ukupnih polisaharida u svim uzorcima.

7. Vreli vodeni ekstrakti sadržali su više ukupnih glukana nego alkalni, osim kod gljive *S. crispa*. Ipak, najviše ukupnih glukana izmereno je u prečišćenim vodenim ekstraktima. Nakon enzimske modifikacije najviše ukupnih glukana bilo je u prečišćenim vodenim ekstraktima gljiva *F. fomentarius* i *A. auricula-judae*. Sadržaj ukupnih glukana se smanjio kod modifikovanog vodenog i prečišćenog ekstrakta dok se kod modifikovanog alkalnog ekstrakta povećao u odnosu na sirove polisaharidne ekstrakte. Kod gljive *S. crispa* trend je bio drugačiji: sadržaj ukupnih glukana bio je niži u oba sirova ekstrakta u poređenju sa modifikovanim uzorcima.
8. Sadržaj α -glukana bio je viši u alkalnim nego u sirovim vodenim ekstraktima, osim kod *A. auricula-judae*. Dijalizom i alkoholnom precipitacijom izvršeno je koncentrisanje α -glukana kod *F. fomentarius*, što nije bio slučaj i sa *A. auricula-judae*. Enzimskim tretmanom je ostvareno uklanjanje α -glukana, i to u najvećoj meri iz uzoraka dobijenih od *F. fomentarius*. Značajno snižen sadržaj α -glukana u svim enzimski tretiranim uzorcima ukazuje na uspešno sproveden postupak modifikacije.
9. U vrelin vodenim ekstraktima je izmeren viši sadržaj β -glukana nego u sirovim alkalnim ekstraktima. Kod gljive *S. crispa* oba načina ekstrakcije dala su istu količinu β -glukana. Najviše β -glukana su sadržali prečišćeni vodeni ekstrakti jer su dijaliza i alkoholna precipitacija dovele do koncentrisanja ove komponente. Enzimskom modifikacijom je sadržaj β -glukana snižen u vodenom i delimično prečišćenom ekstraktu, dok je kod alkalnog došlo do koncentrisanja.
10. Izdvajanju fenolnih jedinjenja najviše je pogodovala vrela vodena ekstrakcija, dok je tokom dijalize došlo do difuzije malih molekula pa je sadržaj fenolnih jedinjenja u prečišćenim vodenim ekstraktima snižen u značajnoj meri. Nakon enzimske modifikacije ekstrakti su sadržali veoma malu količinu fenolnih jedinjenja dok su u pojedinim slučajevima ona u potpunosti uklonjena iz ekstrakata. Pokazalo se da je enzimska modifikacija dobar način da se osim raskidanja veza u molekulima α -glukana i glukana sa mešovitim vezama uklone i fenolna jedinjenja. Ekstrakti gljive *S. crispa* nisu sadržali fenolna jedinjenja.

11. Sadržaj proteina bio je najviši u sirovim alkalnim ekstraktima, osim kod gljive *S. crispa*. Dijalizom i alkoholnom precipitacijom uklonjena je izvesna manja količina proteina, što se dogodilo i tokom enzimske modifikacije. Što je početna količina proteina bila veća to su oni potpunije uklonjeni tokom tretmana enzimima. Modifikacija polisaharidnih ekstrakata primenom enzima doprinosi i deproteinizaciji.
12. Analizom FT-IR spektara potvrđene su hemijske promene detektovane merenjem sadržaja ukupnih polisaharida, glukana, proteina i fenolnih jedinjenja. Osim toga, demonstrirana je i uspešnost postupka enzimske modifikacije, a na osnovu veza specifičnih regiona/traka i glukanskog sastava.
13. Planarnom hromatografijom je utvrđeno da je glukoza dominantan monosaharid u svim ekstraktima ispitivanih gljiva. U manjim količinama uzorci su sadržali manozu, fukozu, galaktozu, ksilozu i glukuronsku kiselinu.
14. Ispitivanjem antimikrobne sposobnosti pomoću disk difuzione metode utvrđeno je da ekstrakti gljiva *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crispa* ispoljavaju antimikrobno dejstvo, ali da je ono slabijeg intenziteta u odnosu na komercijalni antibiotik. Nijedan od ekstrakata nije ispoljio mikrobicidno dejstvo pri testiranoj koncentraciji. Modifikovani ekstrakti su uglavnom bili slabiji antimikrobni agensi u poređenju sa sirovim polisaharidnim efektima. Uočeno je da uzorci koji sadrže više α -glukana ispoljavaju jače antimikrobno dejstvo. Ekstrakti nisu delovali na kvase.
15. Ekstrakti gljive *F. fomentarius* bili su efikasni prema svim testiranim sojevima bakterija, a najosetljivijim se pokazao soj *S. aureus*, kod koga je zona inhibicije iznosila 17.0 ± 0.2 mm, i *Y. enterocolitica* sa zonom inhibicije od 17.5 ± 0.8 mm. U oba slučaja bakteriostatički je delovao sirovi alkalni ekstrakt. Modifikovani ekstrakti su skoro isključivo delovali na Gram negativne bakterije, a najefikasniji se pokazao MFV prema *Y. enterocolitica*, koji je doveo do pojave zone inhibicije od 11.0 ± 0.3 mm.
16. Posmatrajući antimikrobnu aktivnost ekstrakata gljive *A. auricula-judae* utvrđeno je da je bakterija *P. aeruginosa* bila najosetljivija u prisustvu AA, koji je doveo do pojave zone inhibicije od 15.8 ± 0.5 mm. Osetljivom se pokazala i bakterija *E. coli*O157:H7 i to prema sirovim polisaharidnim ekstraktima, tako da su zone

inhibicije bile 15.4 ± 0.3 mm u prisustvu AA, 15.1 ± 0.6 mm pri dodatku AP i 14.6 ± 0.7 mm kada je bakterija inkubirana u prisustvu AV. Modifikovani ekstrakti su u većini slučajeva inhibirali rast Gram pozitivnih bakterija a kao najjači se pokazao MAA i to prema *E. coli*, kod koje je zona inhibicije imala vrednost od 7.6 ± 0.5 mm. Modifikovani ekstrakti nisu delovali antimikrobno na *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. hauseri*, *Y. enterocolitica* i *E. coli O157:H7*.

17. Na osnovu ispitivanja antimikrobne sposobnosti ekstrakata pomoću metode difuzije sa filter diskova ustanovljeno je da su testirane bakterije bile najosetljivije prema sirovom alkalnom ekstraktu gljive *S. crista* koji je u najvećoj meri inhibirao rast *S. enteritidis*, sa zonom inhibicije 18.1 ± 0.5 mm. Bakterije *P. hauseri* i *S. sonnei* nisu bile inhibirane prisustvom ekstrakata gljive *S. crista*. Kod modifikovanih ekstrakata primećen je izostanak antimikrobnog dejstva prema mnogim testiranim sojevima. MSA je bio najefikasniji i to prema *S. enteritidis*. U ovom slučaju zona inhibicije je bila 12.7 ± 0.5 .
18. Ekstrakti gljiva *F. fomentarius*, *A. auricula-judae* i *S. crista* su pokazali mikrobistatičko dejstvo pri vrlo niskim MIC vrednostima a prema mnogim vrstama ustanovljene su i MBC vrednosti. Kao najjači antimikrobni agensi pokazali su se sirovi alkalni ekstrakti dok su modifikovani ekstrakti bili višestruko slabiji, u pojedinim slučajevima i više od 200 puta. Kako su modifikovani ekstrakti sadržali značajno manje količine α -glukana, proteina i fenolnih jedinjenja može se zaključiti da su ove komponente od značaja za antimikrobnu aktivnost ekstrakata testiranih gljiva. Nijedan od ekstrakata nije delovao na kvasce pri primenjenim koncentracijama.
19. Na osnovu rezultata antimikrobnog delovanja dobijenih pomoću mikrodilucione metode ustanovljeno je da su ekstrakti gljive *F. fomentarius* bili podjednako efikasni prema Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama. Najmanje otpornom pokazala se *L. monocytogenes* u prisustvu FV i FA (MIC = 0.039 mg/ml). FV je delovao mikrobicidno prema istoj bakteriji pri koncentraciji od 1.25 mg/ml. Snažno antimikrobno dejstvo ekstrakti su ispoljili i prema *E. faecalis*, *P. hauseri* i *Y. enterocolitica*, pri čemu su MIC vrednosti bile u rasponu od 0.312 do 0.625 mg/ml. Sirovi polisaharidni ekstrakti su najslabije delovali na *E. coli* i *E. coli O157:H7*.

Enzimskim tretmanom umanjeno je antimikrobno dejstvo ekstrakata ove gljive. U pojedinim slučajevima MIC vrednosti su bile više i do 100 puta u odnosu na ekstrakte koji nisu enzimski tretirani (MIC za MFA prema *L. monocytogenes* je bio 5.0 mg/ml). Modifikovani ekstrakti su bili najefikasniji prema *S. aureus* (MIC za MFV i MFA je bio 5.0 mg/ml). Ekstrakti gljive *F. fomentarius* nisu inhibirali rast kvasaca pri testiranim koncentracijama.

20. Gram pozitivne bakterije bile su osetljive kao i Gram negativne na dodatak ekstrakata gljive *A. auricula-judae*. Sirovi polisaharidni ekstrakti imali su izraženije antimikrobno dejstvo od modifikovanih. AV i AP su u najvećoj meri poremetili rast bakterije *E. faecalis* (MIC = 0.039 mg/ml), a sirovi alklni ekstrakt je ubijao ovu bakteriju pri koncentraciji od 1.25 mg/ml. Osetljiva je bila i bakterija *S. sonnei* čiji su rast ekstrakti inhibirali u rasponu koncentracija od 0.625 do 1.25 mg/ml. Dodatak ekstrakata nije uticao na životni ciklus *E. coli*, *S. enteritidis* i *E. coli* O157:H7. Najjača antimikrobna aktivnost modifikovanih ekstrakata ispojlila se prema *B. cereus* i *P. aeruginosa*, 5.0 mg/ml kada su inkubirane sa MAA, dok je MAV inhibirao *E. faecalis* pri istoj koncentraciji. Najdrastičnija promena antimikrobne aktivnosti zapažena je nakon enzimske modifikacije prečišćenog vodenog ekstrakta. U tom slučaju MIC je povećana 256 puta. Rast kvasaca nije bio izmenjen u prisustvu ekstrakata.
21. Inkubiranjem bakterija sa ekstraktima gljive *S. crispa* utvrđena je inhibicija rasta većine ispitivanih sojeva. Najnižu MIC imali su SV i SA u odnosu na *E. faecalis* (0.156 mg/ml) i *B. cereus* (0.156 mg/ml SV i 0.039 mg/ml SA). Sirovi alkalni ekstrakt delovao je baktericidno na *B. cereus* pri koncentraciji 2.5 mg/ml. Ekstrakti su ubijali i *E. faecalis*, *G. stearothermophilus*, *B. cereus*, *S. enteritidis* i *Y. enterocolitica*. Svi testirani mikroorganizmi bili su otporniji prema modifikovanim ekstraktima, a MIC su bile u opsegu od 5-40 mg/ml. Ekstrakti gljive *S. crispa* nisu delovali antimikrobno na kvasce.
22. Imajući u vidu veoma niske MIC vrednosti prema pojedinim bakterijama (*E. faecalis*), kao i MBC, zaključuje se da sirovi polisaharidni ekstrakti mogu predstavljati dobru alternativu komercijalnim antibioticima u borbi sa učestalim razvojem rezistentnosti kod humanih patogena. Osim toga, dodatak ekstrakata u

prehrambene proizvode može biti dobar način da se kontroliše ili spreči razvoj patogena poreklom iz hrane, te tako postigne odgovarajuća bezbednost proizvoda bez primene hemijskih sredstava koja neretko ispoljavaju neželjene efekte na zdravlje potrošača.

23. Makrodilucionom metodom potvrđeni su rezultati mikrodilucione metode u slučajevima gde se MIC/MBC vrednost poklapala ili je bila niža od 2.5 mg/ml. Takođe je potvrđeno da ekstrakti ne ispoljavaju antifungalno dejstvo pri testiranoj koncentraciji. Sirovi polisaharidni ekstrakti bili su efikasniji od modifikovanih, koji su u najboljem slučaju uspevali da inhibiraju rast bakterija u prvih 6 h. Pojedine bakterije, naročito sporogene, bile su inhibirane prisustvom ekstrakata što je usporilo njihov rast i verovatno aktiviralo mehanizme za preživljavanje (sporulaciju), jer su uglavnom posle 12 h uspevale da uspostave normalan životni ciklus, osim u prisustvu alkalnog ekstrakta *S. crispa*. Delovanje na vegetativne forme mahom se javljalo u toku prvih 6-9 h.
24. Makrodilucioni metod je pokazao da je sirovi alkalni ekstrakt *F. fomentarius* najefikasniji prema *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis* i *P. hauseri*, prema kojima je ispoljio mikrobicidno dejstvo, što je u saglasnosti sa MBC vrednostima mikrodilucionog testa. Moglo se zapaziti i da modifikovani ekstrakti gotovo da nisu delovali, tj. da mikrobicidno dejstvo pri koncentraciji od 2.5 mg/ml nije zabeleženo. Dinamika rasta u prisustvu ekstrakata *F. fomentarius* nije bila značajnije izmenjena kod *G. stearothermophilus*, *E. coli*, *S. sonnei*, *Y. enterocolitica* i *E. coli* (O157:H7).
25. Ispitujući kinetiku inaktivacije bakterija pomoću makrodilucione metode utvrđeno je da su sirovi polisaharidni ekstrakti gljive *A. auricula-judae* jači antimikrobni agensi od modifikovanih ekstrakata pri testiranoj koncentraciji. Zapaženo je i da pri uslovima izvođenja metode ekstrakti nisu ispoljili značajniju aktivnost prema Gram negativnim bakterijama, kao ni prema testiranim kvascima. Sirovi vodeni i alkalni ekstrakti doveli su do potepenog smanjenja i uništenja populacije *E. faealis* nakon 3 h od početka inkubacije, dok su na *S. aureus* delovali bakteriostatički.
26. Na osnovu rezultata makrodilucione metode potvrđena je osetljivost Gram pozitivnih bakterija na sirove polisaharidne ekstrakte gljive *S. crispa*. Od posebnog je značaja sposobnost sirovog alkalnog ekstrakta da dovede do uginuća ili inhibicije

rasta sporogenih bakterija, *G. stearothermophilus* i *B. cereus*. Uticaj na kvasce nije zabeležen. Modifikovani ekstrakti nisu značajnije delovali na test mikroorganizme.

27. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala logaritamski se povećavala sa porastom koncentracije ekstrakata testiranih gljiva, a nemodifikovani uzorci su bili jači antioksidanti, osim u slučaju *S. crispa*. Modifikovani vodeni ekstrakt ove gljive ispoljio je najizraženiju aktivnost u ovoj metodi. Sirovi polisaharidni ekstrakti gljive *F. fomentarius* bili su najefikasniji (EC_{50} vrednost im je bila i preko 10 puta niža nego za katehin), a zapaženo je da su sadržali najviše fenolnih jedinjenja za koja je utvrđeno da su u relativno jakoj korelaciji sa ispitivanom antioksidativnom sposobnošću. Način ekstrakcije i hemijski sastav gljiva uticali su na sposobnost ekstrakata da uhvate slobodne DPPH radikale.
28. Testirajući sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije može se zaključiti da su sirovi polisaharidni ekstrakti bili efikasniji, naročito pri nižim koncentracijama (0.025 mg/ml), dok su pri višim koncentracijama delovali prooksidativno. Kod ekstrakata gljive *F. fomentarius* utvrđena je jaka negativna korelacija između antioksidativne sposobnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja, kao i β -glukana. Sadržaj proteini i α -glukana imao je nešto manji značaj. Modifikovani ekstrakti su ispoljili ne mnogo slabiju sposobnost inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline, što je i logično imajući u vidu da su se od sirovih ekstrakata razlikovali prvenstveno po odsustvu α -glukana, a oni u ovom slučaju nisu bili od presudnog značaja. Modifikovani ekstrakti gljive *A. auricula-judae* bili su značajno slabiji od sirovih polisaharidnih ekstrakata, a kao ključan za antioksidativnu sposobnost pokazao sesadržaj α -glukana i fenolnih jedinjenja. Modifikovani alkalni ekstrakt gljive *S. crispa* pokazao je iznenađujuće rezultate u poređenju sa druge dve gljive jer je bio efikasniji od sirovog vodenog i alkalnog ekstrakta. Ekstrakti *S. crispa* nisu sadržali fenolna jedinjenja.
29. Vodena i alkalna ekstrakcija pokazale su se kao dobar način za dobijanje ekstrakata sa izraženom sposobnošću inhibicije lipidne peroksidacije. Efekat je verovatno rezultat sinergističkog delovanja pre nego neke od komponenata, ali se gubitkom jedne od njih nesrazmerno menja antioksidativna sposobnost.

30. Testirajući sposobnost redukcije jona gvožđa utvrđeno je da aktivnost raste sa porastom koncentracije ekstrakata, ali i da su modifikovani ekstrakti slabija redukciona sredstva u poređenju sa sirovim polisaharidnim ekstraktima, osim u slučaju gljive *S. crispa*. Korelaciona analiza je pokazala da je za ovu sposobnost kod gljive *F. fomentarius* najodgovorniji sadržaj fenolnih jedinjenja, uz značajno slabiji doprinos drugih komponenta (proteina, α - i β -glukana). Odsustvo fenolnih jedinjenja očigledno je uzrokovalo promenu mehanizma delovanja u ovoj metodi. Uticaj sadržaja pojedinih komponenta na sposobnost redukcije jona gvožđa kod druge dve gljive nije bilo moguće ustanoviti pri testiranim koncentracijama.
31. Sirovi polisaharidni ekstrakti pokazali su se kao relativno slabi helatori jona gvožđa uz logaritamsku zavisnost od koncentracije, dok je kod modifikovanih ekstrakata zavisnost bila linearna. Nije bilo značajne razlike između efekata dve grupe ekstrakata pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji. Alkalni ekstrakti gljiva *F. fomentarius* i *A. auricula-judae* imali su najizraženiju sposobnost heliranja jona gvožđa. Kod gljiva *F. fomentarius* i *A. auricula-judae* nisu utvrđene EC₅₀ vrednosti pri testiranim koncentracijama niti je ustanovljena korelacija sa nekom od komponenta ekstrakata. Podjednak uticaj sadržaja α - i β -glukana na sposobnost heliranja jona primećen je kod ekstrakata gljive *S. crispa*.
32. Testirajući antioksidativnu sposobnost ekstrakata gljiva pomoću CUPRAC metode uočeno je da ekstrakti poseduju relativno slaba redukciona svojstva pri fiziološki bliskoj vrednosti pH, osim kod gljive *F. fomentarius*. Sirovi polisaharidni ekstrakti ove gljive su pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji dostigli efekat oba primenjena standarda, BHT i α -tokoferola. Kod modifikovanih ekstrakata je utvrđeno značajno smanjenje ove sposobnosti. Sadržaj proteina i α -glukana bioje najznačajniji za ispoljavanje sposobnosti redukcije jona bakra. Kod gljiva *A. auricula-judae* i *S. crispa* nije utvrđena korelacija između redukcije jona bakra i komponenta ekstrakata, te nije bilo moguće precizno utvrditi kako su način ekstrakcije i enzimaska modifikacija uticali na antioksidativnu sposobnost.
33. Sposobnost inhibicije angiotenzin I-konvertujućeg enzima uočena je kod ekstrakata sve tri gljive, mada su svi bili slabiji od komercijalnog preparata za regulaciju krvnog pritiska. Ovo istraživanje je potvrdilo negativan uticaj vrele vodene

ekstrakcije na ovu sposobnost, pa su alkalni ekstrakti bili potentniji od sirovih vodenih ekstrakata. Sadržaj proteina bio je od najvećeg značaja kod ekstrakata gljive *F. fomentarius*, odnosno α i β -glukana kod druge dve gljive. Enzimski modificirani ekstrakti u manjoj meri su inhibirali ACE verovatno zbog transformacije kako proteina tako i glukana.

34. Ekstrakti ispitivanih gljiva ispoljili su umerenu do jaku citotoksičnost prema 3 maligne ćelijske linije. Sirovi polisaharidni ekstrakti bili su efikasniji inhibitori proliferacije ovih ćelija, osim kod gljive *S. crispa*. Ista grupa ekstrakata se i bolje rastvarala u vodi, čime je potvrđen značaj hidrofилности za antitumorno dejstvo ekstrakata gljiva. Korelaciona analiza je pokazala da na ovu biološku osobinu ekstrakata utiču sadržaj fenolnih jedinjenja i sadržaj α -glukana.

Hemijska karakterizacija polisaharidnih ekstrakata tri odabrane medicinski značajne gljive pokazala je da su dominantne komponente α - i β -glukani, dok su fenolna jedinjenja i proteini prisutni u značajno manjoj meri. Osim toga, pokazalo se da je enzimska modifikacija uspešno sprovedena te da su iz uzoraka u značajnoj meri uklonjeni α -glukani, ali i drugi mali molekuli. Hemijski sastav ekstrakata, kao rezultat postupka ekstrakcije, nesumnjivo se odrazio na testirana biološka svojstva.

Utvrđeno je da su α -glukani izuzetno značajni molekuli, čijim gubitkom i strukturnom promenom dolazi do drastičnog gubitka bioloških svojstava ekstrakata. Istraživanje je pokazalo da su gljive dobar izvor biološki vrednih jedinjenja koja se mogu koristiti kao antioksidanti, antimikrobni agensi, u regulaciji/ublažavanju simptoma kardiovaskularnih oboljenja i tumora. Gljive mogu biti vredan deo čovekove ishrane ili dodatak ishrani, bez bojazni od neželjenih posledica koje prate savremene lekove.

7. LITERATURA

- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A., Pintado, M. (2012): Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of Applied Microbiology* 113:466-475.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., Pintado, M., (2013): Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology* 115: 346–357.
- Annunziata, A., Vecchio, R. (2011): Functional food development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Food* 3: 223-228.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004): Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 7970-7981.
- Barros, L., Baptista, P., Ferreira, I.C.F.R. (2007): Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays, *Food and Chemical Toxicology* 45: 1731-1737.
- Björndal, H., Lindberg, B. (1970): Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.) part II. Water-soluble, acidic polysaccharides from the fruit bodies. *Carbohydrate Research* 12: 29-35.
- Blackwell, M. (2011): The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426-438.
- Breitenbach, J. and Kränzlin, F. (1986): Floristic part. In: *Fungi of Switzerland*. Verlag mycologia, Volume 2, 1st edition, Lucerne, Switzerland.
- Certin-Karaca, H., Newman, M.C. (2015): Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Food Bioscience* 11: 8-16.
- Chandrasekaran, G., Kim, G.J., Shin, H.J. (2011): Purification and characterization of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Food Chemistry* 124: 1376-1381.
- Chang, S.T. (2008): Overview of mushroom cultivation and utilization as functional food. In: P.C.K. Cheung (Ed), *Mushrooms as Functional Foods*. Wiley, Hoboken, NJ, pp.

1-33.

- Chaplin, M.F., Kenedy, J. F. (1987): M.F. Chaplin, J.F. Kenedy (Eds), Carbohydrate analysis a practical approach. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 1-23.
- Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.F., Li, Y.Q. (2008): Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology* 99: 3187-3194.
- Chen, W., Zhao, Z., Li, Y. (2011): Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function on gastric cancer intervention. *Carbohydrate Polymers* 85: 369-375.
- Cheung, P.C.K. (2008): Nutritional value and health benefits of mushrooms. In: P.C.K. Cheung (Ed), *Mushrooms as Functional Foods*. Wiley, Hoboken, NJ, pp.71-110.
- Choi, H.S., Cho, H.Y., Yang, H.C., Ra, K.S., Suh, H.J. (2001): Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Research International* 34: 177-182.
- Cushman, D.W., Cheung, H.S. (1971): Spectrometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20: 1637- 1648.
- De Silva, D.D., Rapior, S., Fons, F., Bahkali, A.H., Hyde, K.D. (2012): Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity* 55: 1-35.
- Dietary Supplement Health and Education Act of 1994. Public law 103-417, 103rd congress, Section 3. Definitions.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M. (1994): Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315: 161–169.
- Du Bois, M., Gilles, K.A., Hamitton, J.K., Reders, P.A., Smith, F. (1956): Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Ekanayake, P.M., Park, G., Lee, Y.D., Kim, S.J., Jeong, S.C., Lee, J. (2005): Antioxidant potential of Eel (*Anguilla Japonica* and *Conger Myriaster*) flesh and skin. *Journal of Food Lipids* 12: 34-47.

- Eloff, J.N. (1998): A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64: 711-713.
- Fan, L., Zhang, S., Yu, L., Ma, L., (2006): Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chemistry*, 101: 1158-1163.
- Fujimiya, Y., Yamamoto, H., Noji, M., Suzuki, I. (2000): Peroral effect on tumour progression of soluble β -(1,6)-glucans prepared by acid treatment from *Agaricus blazei*. Murr. (Agaricaceae, Higher basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2:43-49.
- Galichet, a., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., Manfait, M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiology Letters* 197: 179-186.
- Granieri, L., Del Pino, A.M., Mazzoni, M., Mancinelli, L., Proietti, P., Perretti, G., Palmerini, C.A. (2016): Chelating properties of beer: Implications on calcium homeostasis in PE/CA-PJ15 cells. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, <http://dx.doi.org.proxy.kobson.nb.rs:2048/10.1016/j.jnim.2016.12.001>
- Grienke, U., Zoll, M., Peintner, U., Rollinger, J.M. (2014): European medicinal polypores- A modern view on traditional uses. *Ethnopharmacology* 154: 564-583.
- Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Popper, L., Berger, R.G. (2013): An enzyme from *Auricularia auricula-judae* combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity. *Process Biochemistry* 48: 1872-1878.
- Harada, T., Yokobayashi, K., Misaki, A. (1968): Formation of isoamylase by *Pseudomonas*. *Applied Microbiology* 16: 1439-1444.
- Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., Recio, I. (2011): Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science* 165: 23-25.
- Himaya, S.W.A., Ngo, D.H., Ryu, B.M., Kim, S.K. (2012): An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin -1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry* 32: 1872-1882.

- Ho, B., Chen, Q. (1991): Antifertility action of *Auricularia auricula* polysaccharide. *Zhongguo Yacke Daxux Xuebao* 22: 48-49.
- Horie, K., Rakwal, R., Hirano, M., Shibato, J., Nam, H.W., Kim, Y.S., Kouyuma, Y., Aqrawal, G.K., Masuo, Y., Yonekura, M. (2008): Proteomics of two cultivated mushrooms *Sparassis crispa* and *Hericium erinaceum* provides insight into their numerous functional protein components and diversity. *Journal of Proteome Research* 7: 1819-1835.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005): The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 1841-1856.
- Islam, T., Yu, X., Xu, B. (2016): Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. *LWT-Food Science and Technology* 72: 423-431.
- Ito, H., Sugiura, M., Miyazaki, T. (1976): Antitumor polysaccharide fraction from the culture of *Fomes fomentarius*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 24: 2575.
- Jabeen, Q., Aslam, N. (2013): Hypotensive, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory and diuretic activities of the aqueous-methanol extract of *Ipomoea reniformis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12: 769–776.
- Jarić, S., Mitrović, M., Đurđević, 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: 601-619.
- Karaman, M., Stahl, M., Vulić, J., Vesić, M., Čanadanović-Brunet, J. (2014): Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 65: 311-319.
- Khaskheli, S.G., Zheng, W., Sheikh, S.A., Khaskheli, A.A., Liu, Y., Soomro, A.H., Feng, X., Sauer, M.B., Wang, Y.F., Huang, W. (2015): Characterization of *Auricularia auricula* polysaccharides and its antioxidant properties in fresh and pickled product. *International Journal of Biological Macromolecules* 81: 387-395.

- Kiho, T., Sakai, M., Ukai, S., Hara, C., Tanaka, Y. (1985): Anti-inflammatory effect of the polysaccharide from the fruit bodies of *Auricularia* species. *Carbohydrate Research* 142: 344-351.
- Kim, H.S., Kim, J.Y., Ryu, H.S., Park, H.G., Kim, Y.O., Kang, J.S., Kim, H.M., Hong, J.T., Kim, Y., Han, S.B. (2010): Induction of dendritic cell maturation by β -glucan isolated from *Sparassis crispa*. *International Immunopharmacology* 10: 1284-1294.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Smole Možina, S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods* 81: 121-126.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Van Griensven, L.J.L.D. (2011): Antioxidative activities and chemical characterisation of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT-Food Science and Technology* 30: 1-7.
- Klaus, A., Kozarski, M., Nikšić, M., Jakovljević, D., Todorović, N., Stefanoska, I., Van Griensven, L.J.L.D. (2013): The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Nutrition* 64: 599-610.
- Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Zizak, Z., Pavlovic, V., Levic, S., Niksic, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2015): Biological potential of extracts of wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola forndosa*, *Food Research International* 67: 272-283.
- Kolundzić, Grozdanić, N.Đ., Dodevska, M., Milenković, M., Sisto, F., Miani, A., Farronato, G., Kundaković, T. (2016): Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr., Polyporaceae. *Industrial Crops and Products* 79: 110-115.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Jakovljević, D., Helsper, J.P.F.G., Van Griensven, L.J.L.D. (2011): Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129: 1667-1675.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2012): Antioxidative activities and chemical characterization

- of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 144-153.
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrovic, P., Niksic, M., Vrvic, M.M., Van Griensven, L. (2015): Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules* 20: 19489-19525.
- Kruger, N.J. (2002): The Bradford method for protein Quantitation. In: John M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, 2nd edition, pp. 15-21.
- Lee, D.H., Kim, J.H., Park, J.S., Choi, Y.J., Lee, J.S. (2004): Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25: 621-627.
- Lee, J.S. (2005): Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutrition research* 25: 187-195.
- Lee, M.R., Hou, J.G., Begum, S., Xue, J.J., Wang, Y.B., Sung, C.K. (2013): Comparison of constituents, antioxidant potency, and acetylcholinesterase Inhibition in *Lentinus edodes*, *Sparassis crispa* and *Mycocleptodonoides aitchisonii*. *Food Science Biotechnology* 22: 1747-1751.
- Luo, Y., Chen, G., Li, B., Ji, B., Guo, Y., Tian, F. (2009): Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 215-221.
- Ma, Z., Wang, J., Zhang, L., Zhang, Y., Ding, K. (2010): Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricular-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydrate polymers* 80: 977-983.
- Mazarei, F., Jooyandeh, H., Noshad, M., Hojjati, M. (2017): Polysaccharide of caper (*Capparis spinosa L.*) Leaf: Extraction optimization, antioxidant potential and antimicrobial activity. *International Journal of Biological Macromolecules* 95: 224-231.
- McCleary, B.V., Draga, A. (2016): Measurement of β -glucan in mushrooms and mycelial products. *Journal of AOAC International* 99: 364-373.

- Misaki, A., Kakuta, M., Sasuki, T., Tanaka, M., Miyaji, H. (1981): Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1→3)-β-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1→3)-glycosidic linkages. *Carbohydrate Research* 92: 115-129.
- Misaki, A., Nasu, M., Sone, Y., Kishida, E., Kinoshita, C. (1986): Comparison of structure and antitumor activity of polysaccharides isolated from fukurotake, the fruiting body of *Volvariella volvacea*. *Agricultural and Biological Chemistry* 50: 2171-2183.
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A. (2007): Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *International Immunopharmacology* 7: 701-724.
- Moreno, S., T. Scheyer, C. S. Romano, and A. A. Vojnov. (2006): Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* 40: 223–231.
- Mosby, A.D. (2009): *Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing & Health Professions*, 9th edition, Elsevier.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Muraina, I.A., Picard, J., Eloff, J.N. (2009): Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism. *Phytomedicine* 16: 262-264.
- Nguyen, T.L., Chen, J., Hu, Y., Wang, D., Fan, Y., Wang, J., Abula, S., Zhang, J., Qina, T., Chen, X., Chen, X., Khakame, S.K., Dang, B.K. (2012): In vitro antiviral activity of sulfated *Auricularia auricula* polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 90: 1254-1258.
- Noomhorm, A., Anal, A. K., Ahmad, I. (2014): Functional Foods, Nutraceuticals and Probiotics as Functional Food Components. In: Noomhorm, A., Anal, A. K., Ahmad, I. (Eds.), *Functional Foods and Dietary Supplements*. Wiley, Blackwell, pp. 3-19.

- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014): Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT-Food Science and Technology* 30: 1-6.
- Ohno, M., Abe, T. (1991): Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods* 145: 199-203.
- Oke, F., Aslim, B. (2011): Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry* 128: 613-619.
- Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R. (2011): The main and modified CUPRAC methods of antioxidant (activity) measurement. *Trends in analytical Chemistry* 30: 652-664.
- Öztürk, M., Duru, M.E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., Özler, M.A. (2011): In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1353-1360.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martinez, J.A., Garcia-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry* 128: 674-678.
- Park, Y.M., Kim, I.T., Park, H.J. Choi, J.W., Park, K.Y., Lee, J.D., Nam, B.H., Kim, D.G., Lee, J.Y., Lee, K.T. (2004): Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanols extract of *Fomes fomentarius*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27: 1588-1593.
- Park, H.G., Shim, Y.Y., Choi, S.O., Park, W.M. (2009): New method development for nanoparticle extraction of water-soluble beta-(1-N3)-D-glucan from edible mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:2147-54.
- Pegler, D.N. (2001): Useful fungi of the world: Amadou and Chaga. *Mycologist* 15: 153-154.
- Peintner, U., Pöder, R., Pümpel, T. (1998): The iceman's fungi. *Mycological Research* 102: 1153-1162.

- Petrova, R.D., Mahajna, J.L., Reznick, A.Z., Wasser, S.P., Denchev, C.M., Nevo, E. (2007): Fungla substances as modulators of NF-kB activation pathmay. *Molecular Biology Reports* 34: 145-154.
- Petrović, P., Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Nikšić, M., Žižak, Ž., Vuković, N., Šekularac, G., Drmanić, S., Bugarski, B. (2016): Biological potential of puffballs:A comparative analysis. *Journal of Functional Foods* 21: 36-49.
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C.O., Lewis, G., Krissansen, G.W., Buchanan, P.K. (2014): Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 3: 41-51.
- Rhee, S.J., Cho, S.Y., Kim, K.M., Cha, D.S., Park, H.J. (2008): A comparative study of analytical methods for alkali-soluble β -glucan im medicinal mushroom, Chaga (*Innonotus obliquus*). *LWT-Food Science and Technology* 41: 545-549.
- Rowan, N.J., Smith, J.E., Sullivan, R. (2002): Medicinal mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Cancer Research UK, University of Strathclyde.
- Ruthes, A.C., Smiderle, F.R., Iacomini, M. (2015): D-glucans from edible mushrooms: A review on the extraction purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers* 117: 753-761.
- Saar, M. (1991): Fungi in Khanty folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 31: 175-179.
- Santos, J.S., Brizola, V.R.A., Granato. D. (2017): High-troughput assay comparison and standardization for metal chelating screening: A proposal and application. *Food Chemistry* 214: 515-522.
- Sari, M., Prange, A., Lelley, J.I., Hambitzer, R. (2017): Screening of beta-glucan content in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry* 216: 45-51.
- Schenkeveld, W.D.C., Kimber, R.L., Walter, M., Oburger, E., Puschenreiter, M., Kraemer, S.M. (2017): Experimental considerations in metal mobilization from soil by chelating ligands: The influence of soil-solution ratio and pre-equilibration-A case study on Fe acquisition by phytosiderophores. *Science of the Total Environment* 579: 1831-1842.

- Shamtsyan, M., Konusova, V., Maksimova, Y., Goloshchev, A., Panchenko, A., Simbirtsev, A., Petrishchev, N., Denisova, N. (2004): Immunomodulation and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. *Journal of Biotechnology* 113: 77-83.
- Smiderle, F.R., Ruthes, A.C., van Arkle, J., Chanput, W., Iacomini, M., Wichers, H.J., Van Griensven, L.J.L.D. (2011). Polysaccharides from *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* show similarities in their structures and their immunomodulatory effects on human monocytic THP-1 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11: 58.
- Song, G., Du, Q. (2012): Structure characterization and antitumor activity of an $\alpha\beta$ -glucan polysaccharide from *Auricularia polytricha*. *Food Research International* 45: 381-387.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diey, M.T., Garcia, J.B., del Val, A.G., Gorrochategui, J., Hernández, P., Peláez, F., Vicente, F.M. (2000): Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek* 78: 129-139.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Spěvák, J., Erban, V., Kovářiková, E., Čopíková, J. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76: 548-556.
- Synytsya, A., Novak, M. (2013): Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate polymers* 92: 792-809.
- Synytsya, A., Novak, M. (2014): Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine* 2: 17.
- Tada, R., Harada, T., Nagi-Miura, N., Adachi, Y., Nakajama, M., Yadomae, T., Ohno, N. (2007): NMR characterization of the structure of a β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydrate Research* 342: 2611-2618.
- Vaidya, J.G., Rabba, A. (1993): Fungi in folk medicine. *Mycologist* 7: 131-133.
- Vunduk, J., Klaus, A., Kozarski, M., Petrović, P., Žižak, Ž., Nikšić, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2015): Did the Iceman know better? Screening of the medicinal properties

- of the Birch Polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17: 1113-1125.
- Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999): Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: current perspective (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 31-62.
- Wasser, S.P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 258-274.
- Wasser, S.P. (2011): Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 1323-1332.
- Weber, R.W.S., Webster, J. (2006): Teaching techniques for mycology: 24. Patterns of basidiospore germination in *Auricularia* (Heterobasidiomycetes). *Mycologist* 20: 105-108.
- Wetzel, S., Duchesne, L.C., Laporte, M.F. (2006): Nutraceuticals from the forest In: *Bioproducts from Canada's forests, new partnerships in the bioeconomy*. Wetzel, S., Duchesne, L.C. and Laporte, M.F. (Eds.). Springer, The Netherlands, pp. 113-130.
- Wu, Y., Ding, Z.Y., Zhang, K.C. (2006): Improvement of exopolysaccharide production by macro-fungus *Auricularia auricula* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 743-749.
- Yoon, S.J., Yu, M.A., Pyun, Y.R., Hwang, J.K., Chu, D.C., Juneja, L.R., Mourao, P.A.S. (2003): The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research* 112: 151-158.
- Zang, Y., Xiong, J., Zhai, W.Z., Cao, L., Zhang, S.P., Tang, Y., Su, J.J., Yang, G.X., Zhao, Y., Fan, H., Xia, G., Wang, C.G., Hu, J.F. (2013): Fomentarols A-D, sterols from the polypore macrofungus *Fomes fomentarius*. *Phytochemistry* 92: 137-145.
- Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, V., Sajli, L., Đaković, S., Filipović-Grčić, J. (2010). Characterization of β -glucans isplated from brewer's yeast and dried by different methods. *Food Technology and Biotechnology* 48: 189-197.

- Zeng, W.C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L.R., Chen, W.Y. (2012): Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricula* using microwave-assisted extraction. *Carbohydrate Polymers* 89: 694-700.
- Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., Ceylan, O. (2014): A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products* 53: 244-251.
- 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.
- Zhang, Y.C., 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.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B. (2015): Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 165-173.
- Zhu, F., Du, B., Xu, B. (2016): A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids* 52: 275-288.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012): Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers* 90: 1395-1410.

http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html

<http://www.worldometers.info/world-population/#milestones>

<http://www.grida.no/publications/rr/food-crisis/page/3562.aspx>

<http://www.overa.rs>

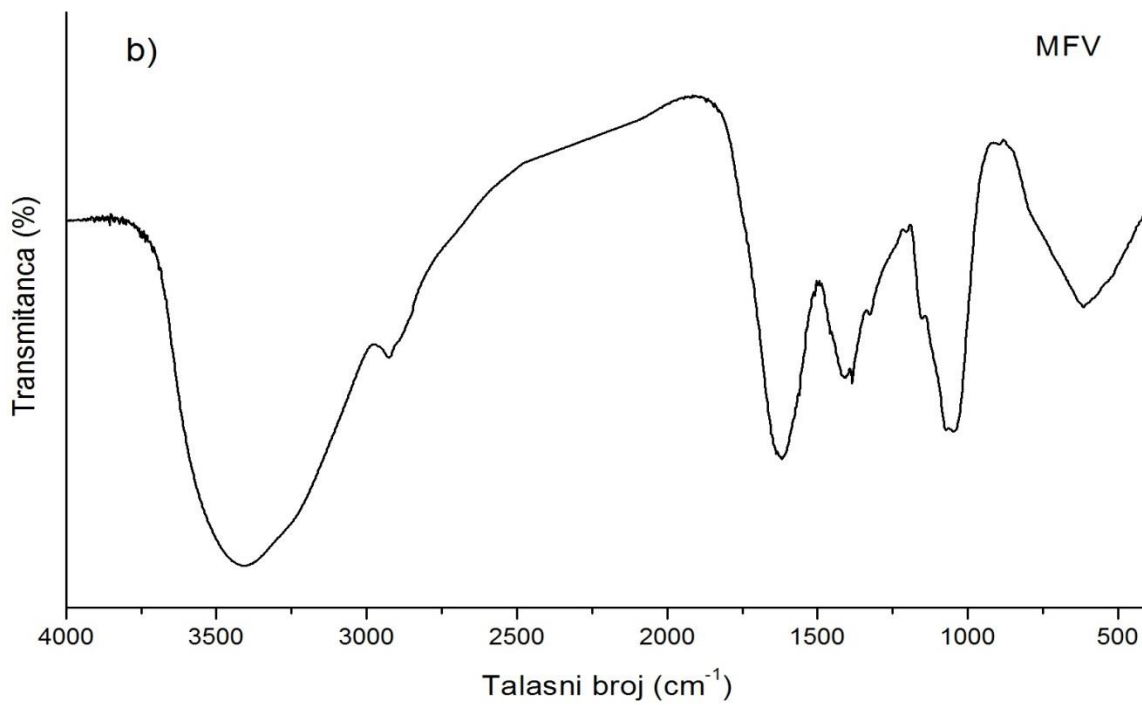
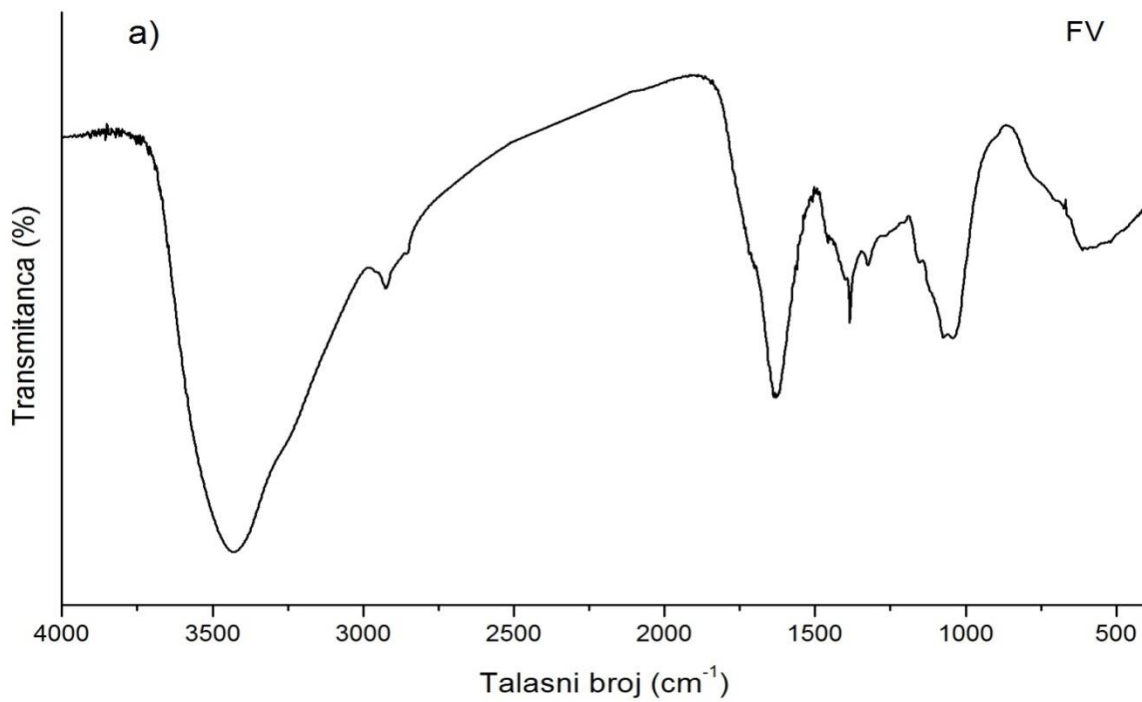
<http://www.amjbot.org/content/98/3/426.full>
www.who.int/healthinfo/global_burden_diseases/estimates/en/index1.html
www.cdc.gov/datastatistics

8. PRILOZI

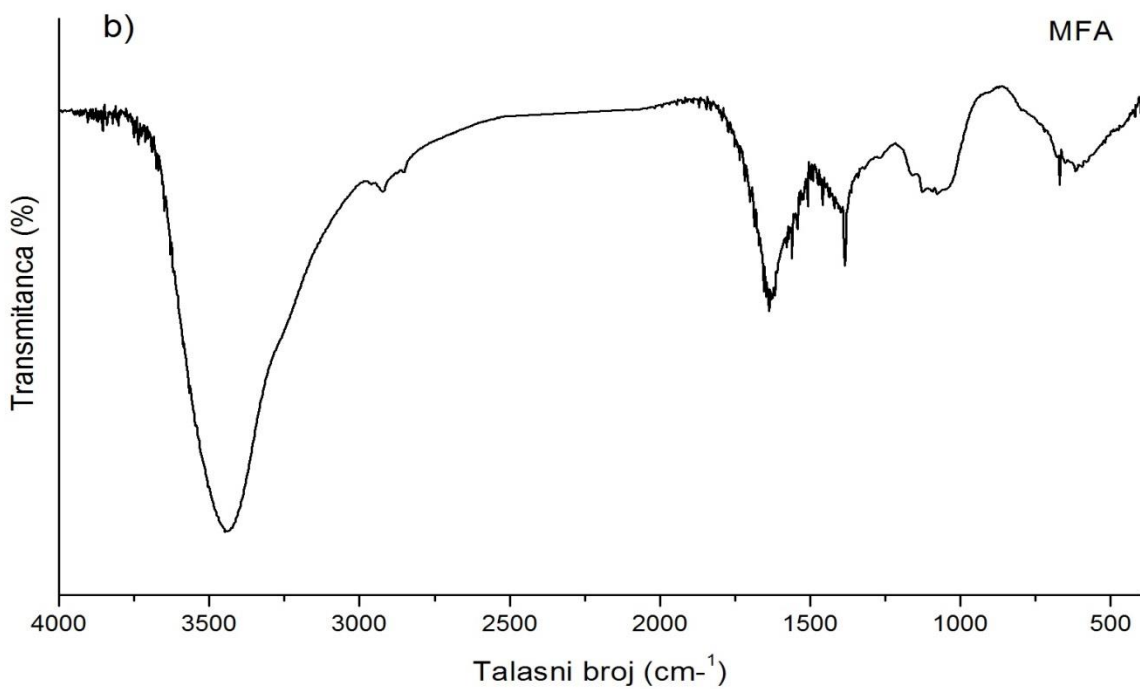
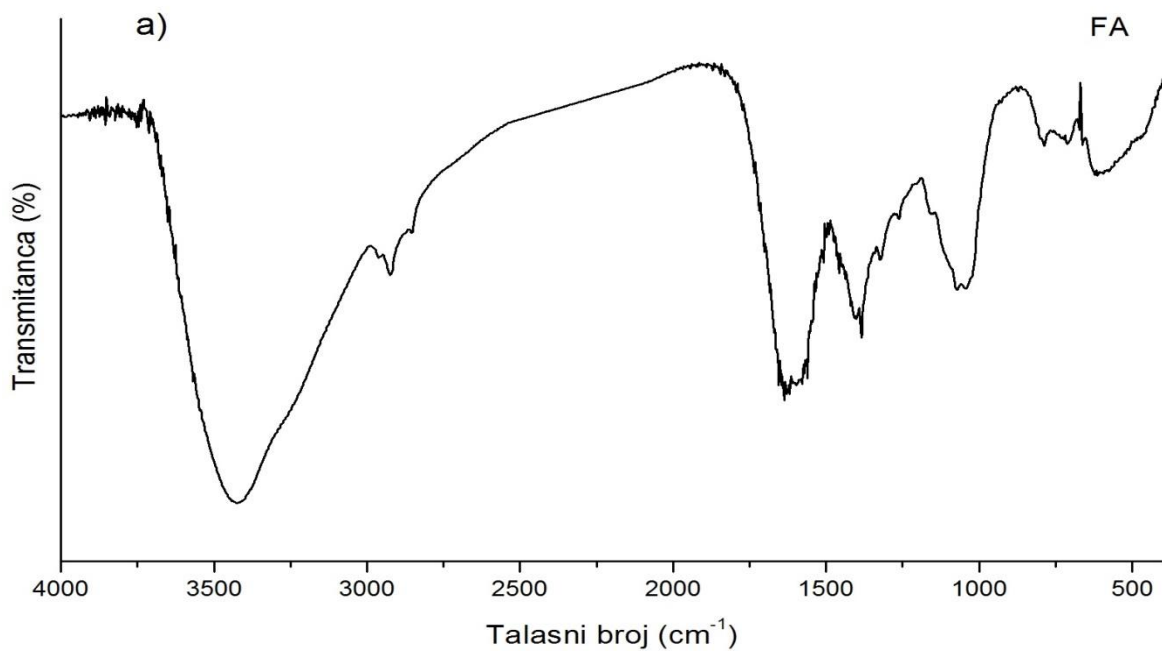
TCY(pYME1) soj		AGLSC soj		struktura
Talasni broj (cm ⁻¹)	Površina trake (%)	Talasni broj (cm ⁻¹)	Površina trake (%)	
806	42.15	808	14.84	manani
822	7.48	/	-	
851	4.26	846	4.97	α-glukani
/	-	860	17.14	
879	17.69	873	39.70	
894	9.27	890	14.13	β-glukani
911	20.56	907	10.03	manani
971	3.58	965	0.20	manani
994	14.62	993	15.61	β(1→6)glukani
1026	23.02	1028	26.74	β(1→4)glukani
1052	19.93	1054	12.85	manani
1077	19.97	1076	25.47	β(1→3)glukani
1103	11.14	1109	12.36	β(1→3)glukani
1141	8.14	1147	7.15	β(1→3)glukani

Preuzeto iz Galichet et al., 2001.

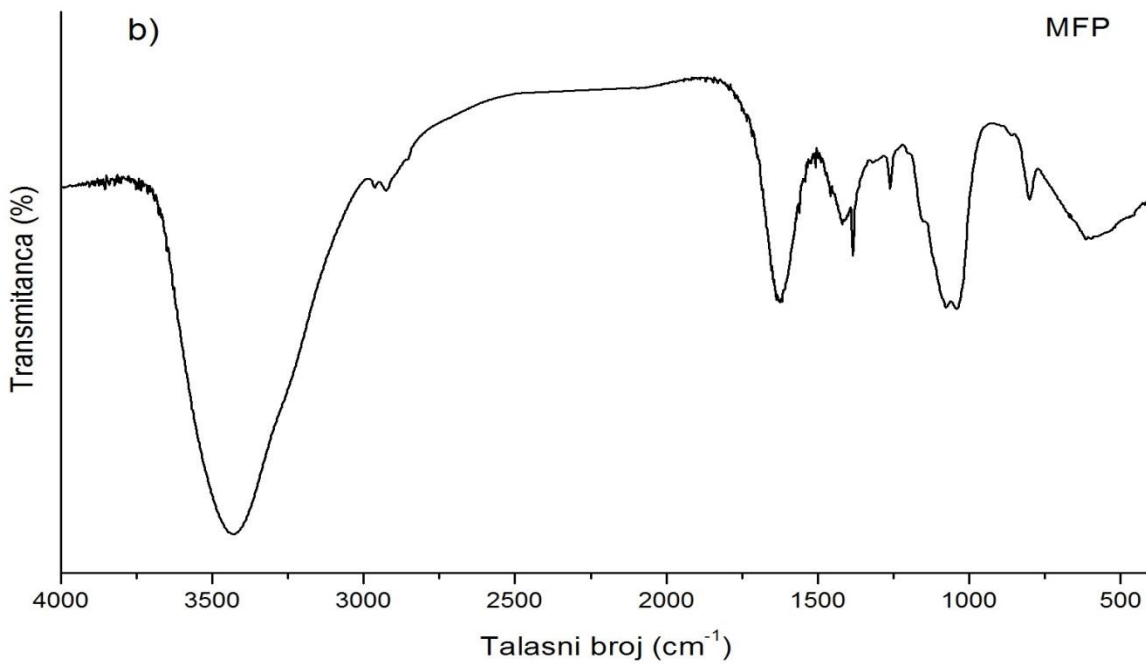
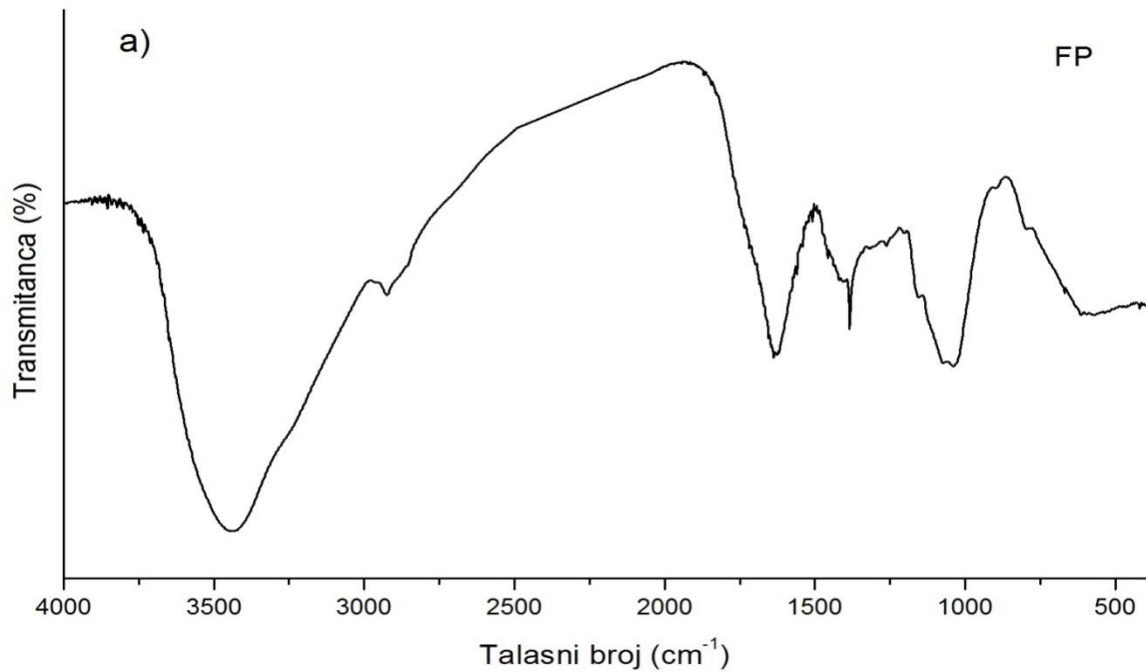
Prilog 1. Površine i strukture dodeljene trakama FT-IR spektra TCY70 i AGLSC sojeva *S. cerevisiae* u opsegu 790-1190 cm⁻¹



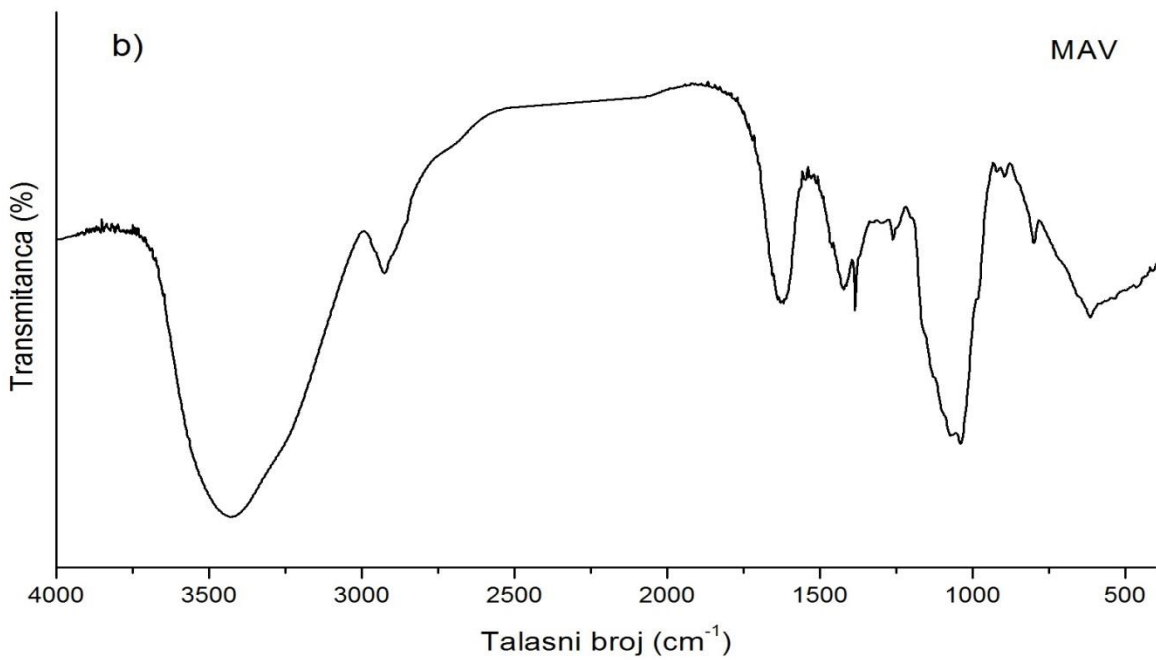
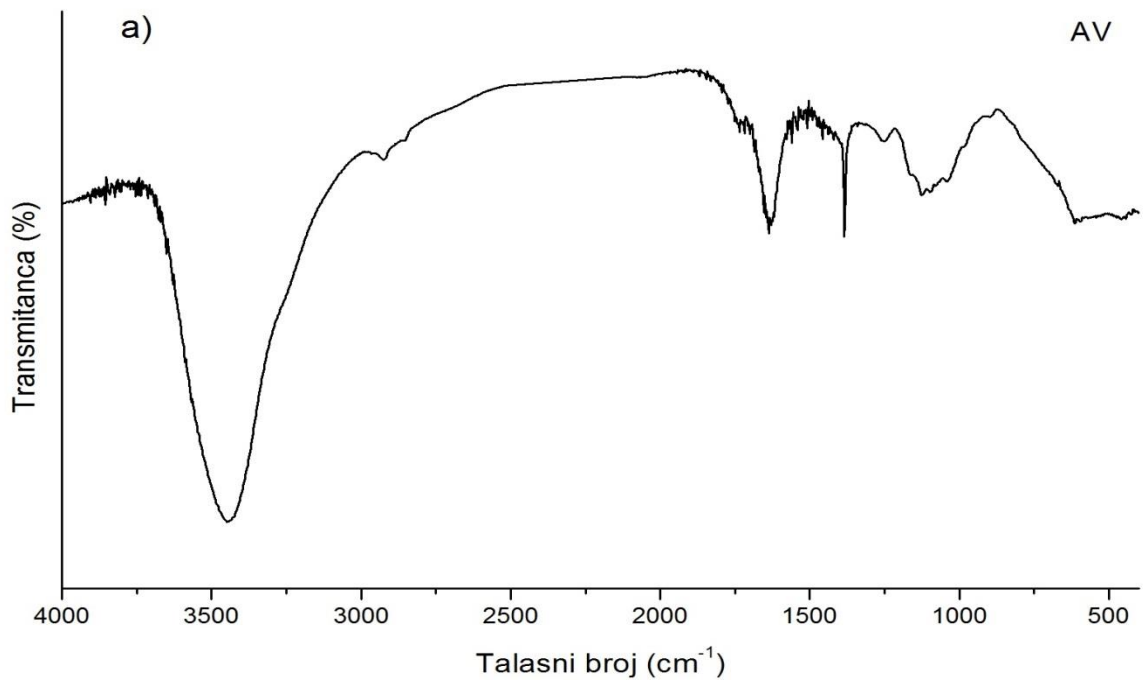
Prilog 2. FT-IR spektar gljive *F. fomentarius*, a) sirovi vodeni ekstrakt, FV; b) modifikovani vodeni ekstrakt, MFV.



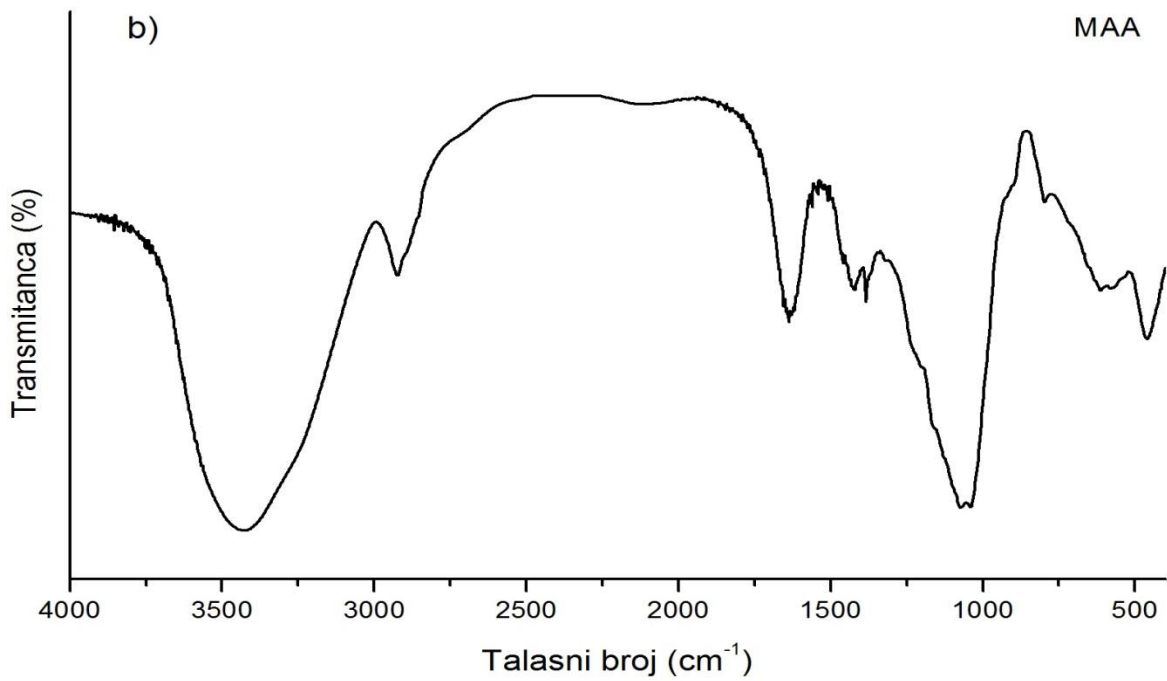
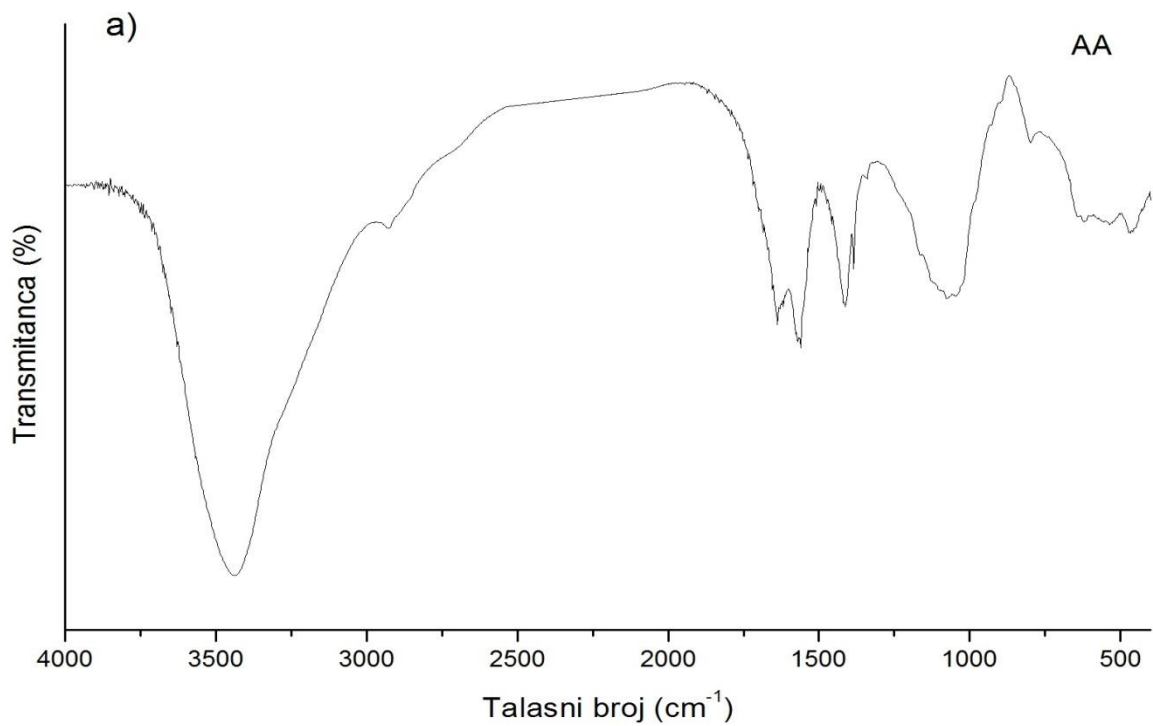
Prilog 3. FT-IR spektar gljive *F. fomentarius*, a) sirovi alkalni ekstrakt, FA; b) modifikovani alkalni ekstrakt, MFA.



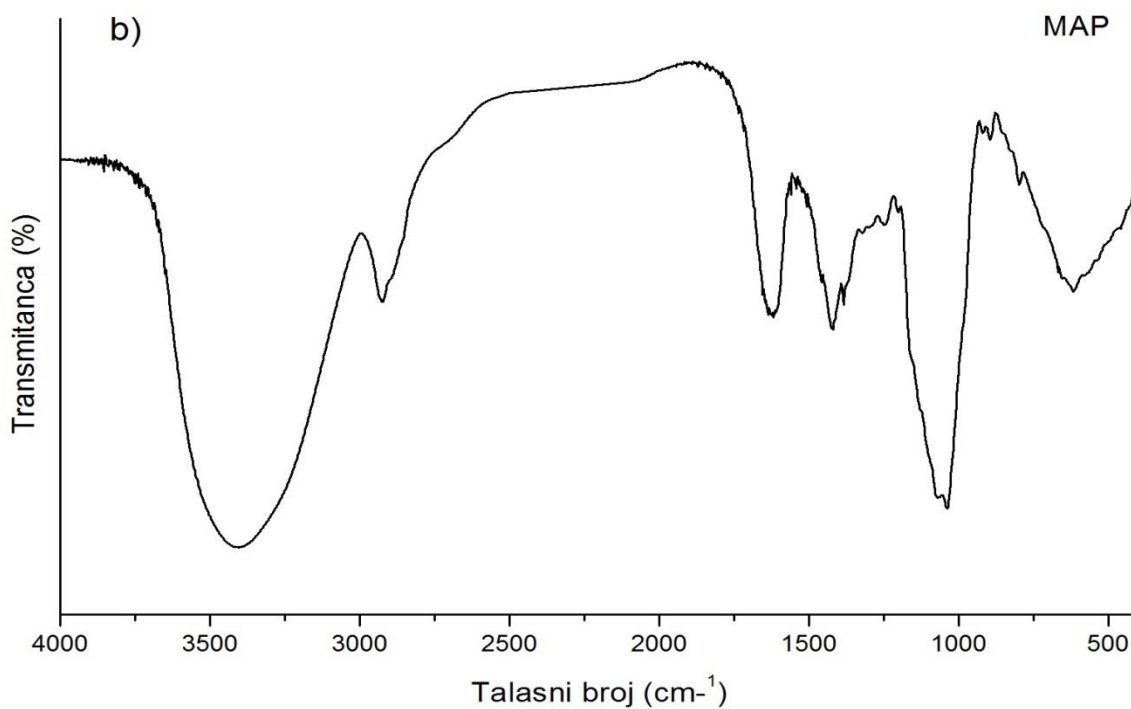
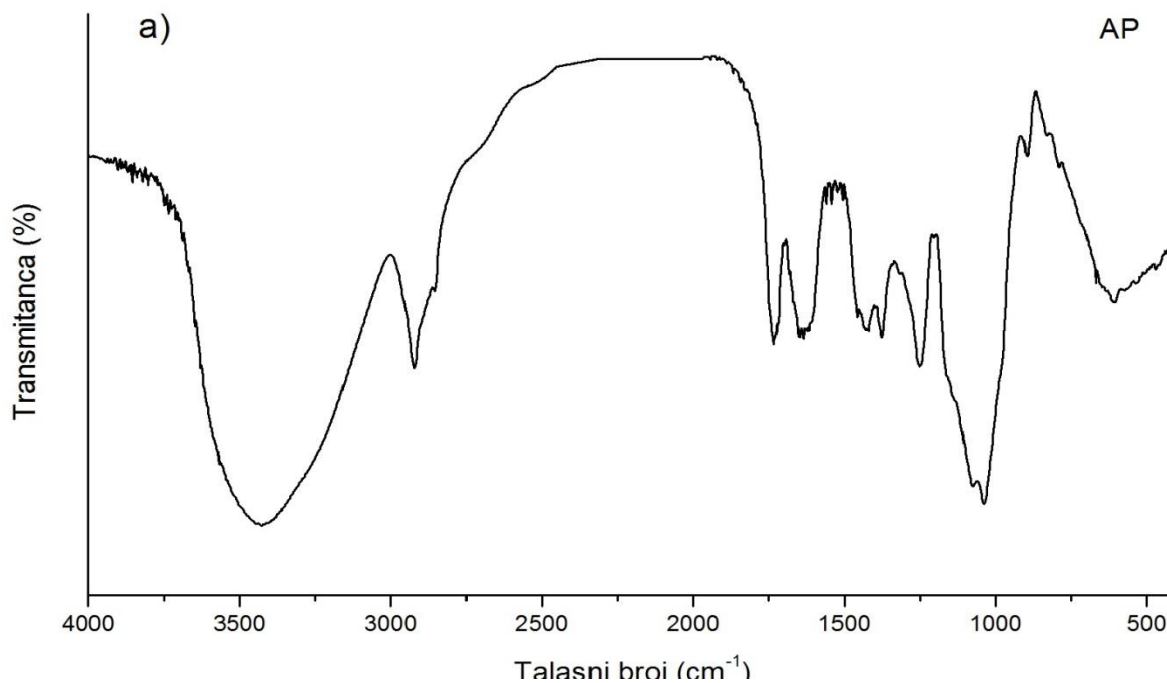
Prilog 4. FT-IR spektar gljive *F. fomentarius*, a) delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, FP; b) modifikovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, MFP.



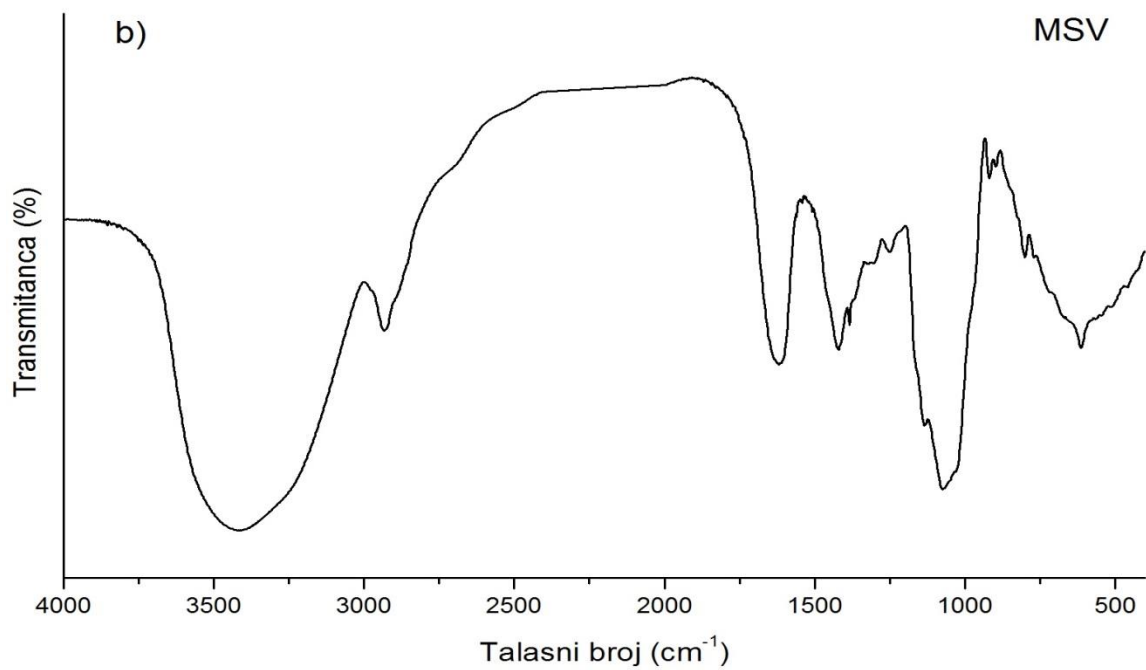
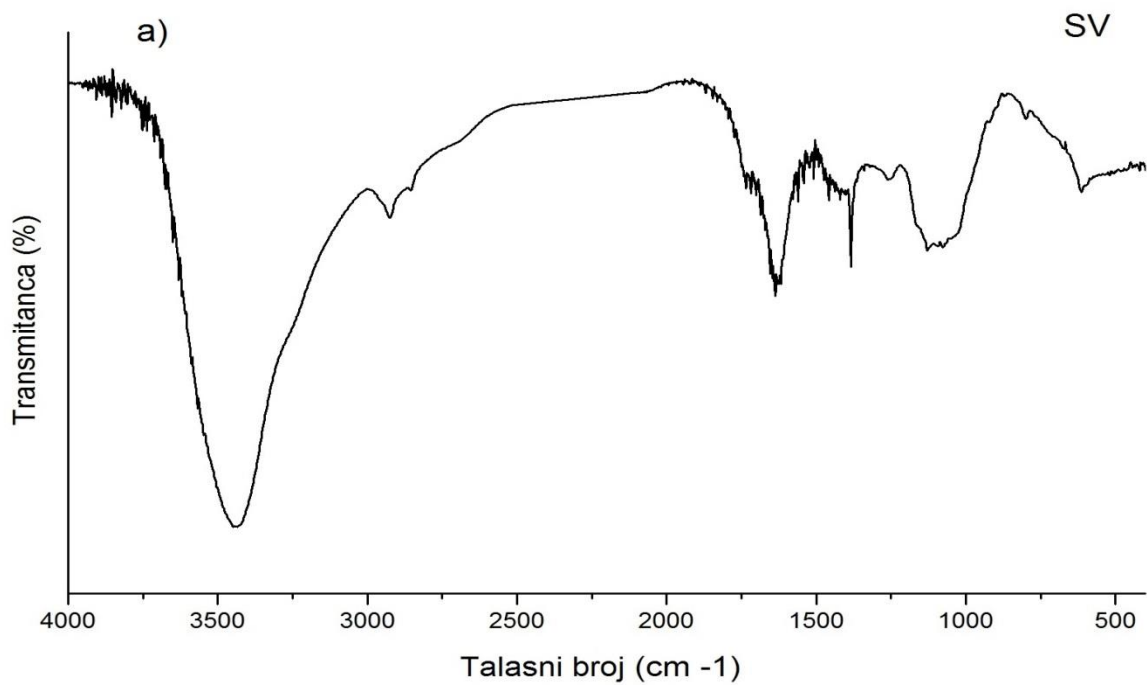
Prilog 5. FT-IR spektar gljive *A. auricula-judae*, a) sirovi vodeni ekstrakt, AV; b) modifikovani vodeni ekstrakt, MAV.



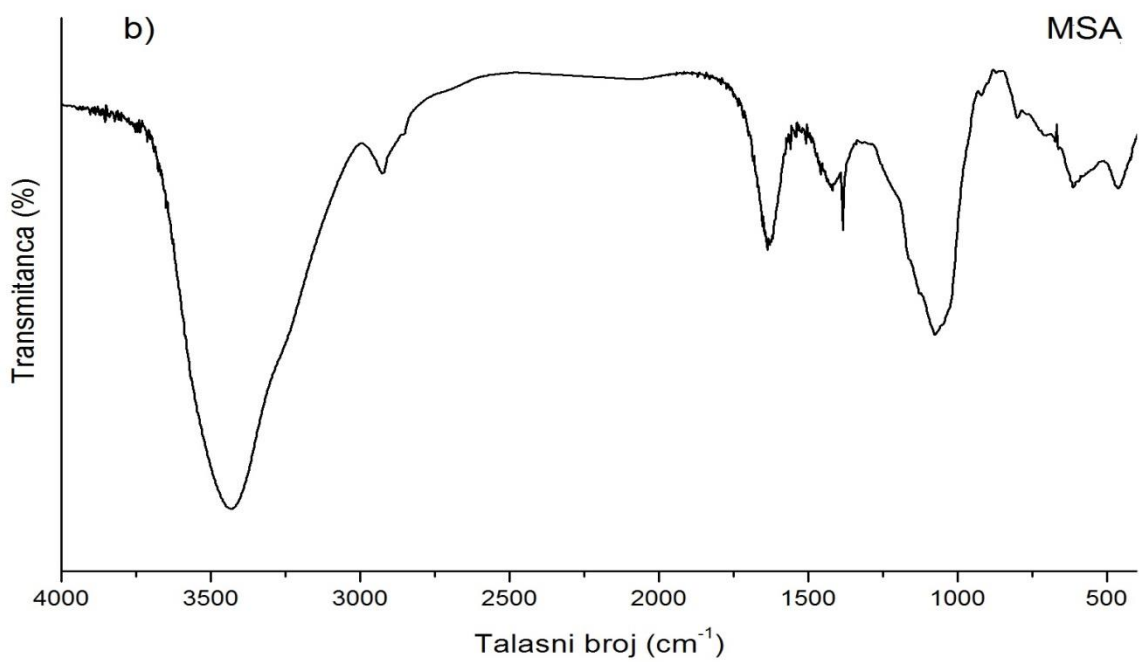
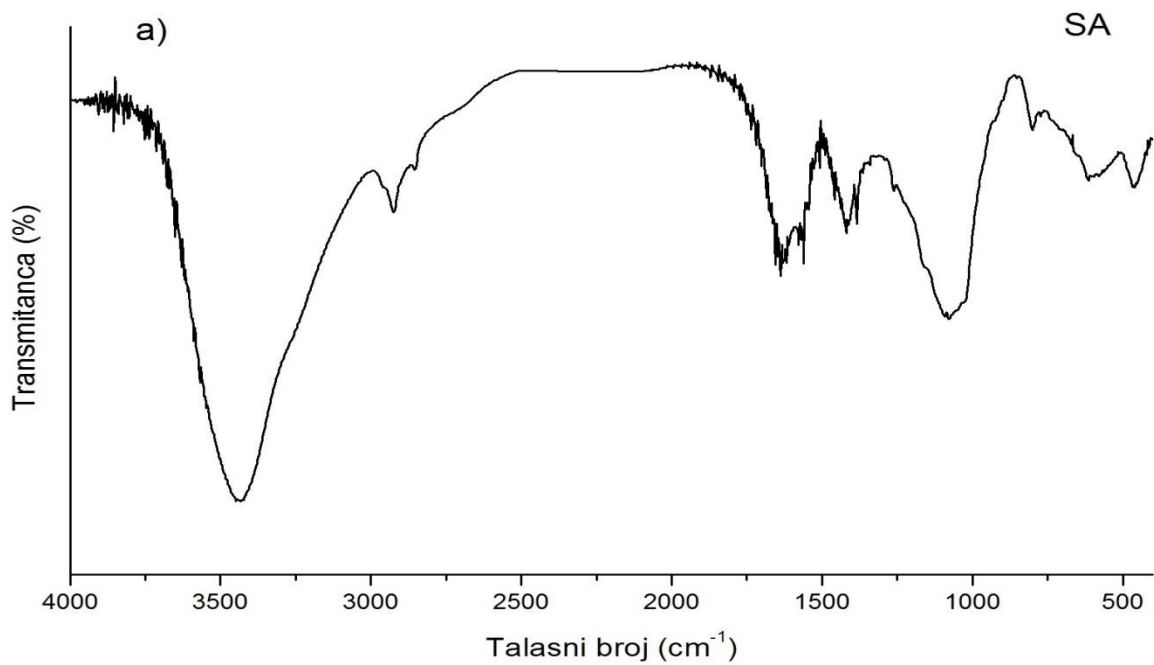
Prilog 6. FT-IR spektar gljive *A. auricula-judae*, a) sirovi alkalni ekstrakt, AA; b) modifikovani alkalni ekstrakt, MAA.



Prilog 7. FT-IR spektar gljive *A. auricula-judae*, a) delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, AP; b) modificovani delimično prečišćeni vodeni ekstrakt, MAP.



Prilog 8 FT-IR spektar gljive *S. crista*, a) sirovi vodeni ekstrakt, SV; b) modificovani vodeni ekstrakt, MSV.



Prilog 9. FT-IR spektar gljive *S. crispa*, a) sirovi alkalni ekstrakt, SA; b) modificovani alkalni ekstrakt, MSA.

BIOGRAFIJA KANDIDATA

Jovana Đ. Vunduk je rođena 04.07.1984. godine u Beogradu, Republika Srbija. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2009. godine sa prosečnom ocenom 8.78 (osam sedamdeset osam) i ocenom 10 (deset) na diplomskom ispitu.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisala je školske 2010/11. godine na smeru Prehrambena tehnologija, uža naučna oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. Od 2011-2014. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. U zvanje istraživača saradnika prvi put je izabrana 30.05.2013. godine odlukom naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a reizabrana je 25.02.2016. godine odlukom naučnog veća Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 06.02.2015. godine zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao istraživač saradnik. Tokom perioda stipendiranja bila je angažovana na Nacionalnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja: „Razvoj novih enzimskih tehnologija za proizvodnju biokatalizatora i biološki aktivnih komponenata hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti kvaliteta i bezbednosti“, br. 46010. Od 06.02.2015. godine angažovana je kao istraživač saradnik na pomenutom Nacionalnom projektu. Osim toga, bila je angažovana i na međunarodnom projektu EU Commission project AREA, FP7-REGPOT-2012-2013-1, No. 316004.

U toku doktorskih studija bila je na dva studijska boravka u inostranstvu u trajanju od 3 (tri) meseca na Institutu za fizičku hemiju Univerziteta Friedrich Schiller u Jeni, i 2 (dve) nedelje na Institutu za hranu Biotehničkog fakulteta u Ljubljani, u okviru EU Comission projekta AREA, br. 316004. Takođe, izabrana je za učesnika letnje škole hemije životne sredine i ekotoksikologije, RECETOX, u Češkoj (2011. godine), i škole inovativnog preduzetništva u Izraelu (2014. godine). Učestvovala je na prvom nacionalnom takmičenju „Ecotrophelia Serbia, 2013“, na kom je kao član „Spark“ tima osvojila prvo

mesto za najbolji ekoinovativni prehrambeni proizvod, kao i na takmičenju „Ecotrphelia Europe, 2013”.

Autor je i koautor 11 (jedanaest) radova objavljenih u uglednim inostranim i domaćim časopisima i preko 20 saopštenja na međunarodnim i domaćim kongresima.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Jovana Vunduk

Broj indeksa 10/30

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*

- Rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/laintelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 24.02.2017.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Jovana Vunduk

Broj Indeksa 10/30

Studijski program Prehrambena tehnologija

Naslov rada Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*

Mentor Prof. dr Miomir Nikšić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenjau **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, 24.02.2017.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Hemijska karakterizacija i biološka svojstva polisaharidnih ekstrakata gljiva *Fomes fomentarius*, *Auricularia auricula-judae* i *Sparassis crispa*

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/lasam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
- 3. Autorstvo – nekomercijalno– bez prerada (CC BY-NC-ND)**
4. Autorstvo – nekomercijalno– deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave.).

Potpis autora

U Beogradu, 24.02.2017.
