

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Jovana D. Petrović

**Biološki potencijal i analiza metabolita jestivih i
lekovitih gljiva iz rodova *Agrocybe*, *Laetiporus*,
Pleurotus i *Polyporus* sa teritorije Srbije**

doktorska disertacija

Beograd, 2018.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Jovana D. Petrović

**Biological potential and metabolite analysis of edible
and medicinal fungi from genera *Agrocybe*, *Laetiporus*,
Pleurotus i *Polyporus* from the territory of Serbia**

doctoral dissertation

Belgrade, 2018.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Jasmina Glamočlija, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Beograd

dr Jelena Vukojević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Marina Soković, naučni savetnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Beograd

dr Slaviša Stanković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Dragana Robajac, naučni saradnik,
Institut za primenu nuklearne energije, Zemun

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je uz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja koje je finansirao projekat: „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala biofungicida” br. 173032.

Srdačno se zahvaljujem mentoru, dr Jasmini Glamočliji i članu komisije, dr Marini Soković koje su me uvele u svet lekovitih gljiva i biljaka, pomogle u izboru teme i radu, ukazale poverenje da učestvujem na projektu i učinile moj napredak mogućim i pored promenjenih okolnosti.

Zahvaljujem prof. dr Jeleni Vukojević na profesionalizmu, konstruktivnim sugestijama i efikasnom vođenju ove doktorske disertacije do samog kraja.

Dr Dragani Robajac se zahvaljujem, pre svega, na bezrezervnoj pomoći, sugestijama i ispravkama, kao i nesebičnom prijateljstvu. Bez tebe ovo ne bi bilo moguće!

Veliko hvala kolegama i koleginicama: DR DEKLJU, dr Ani Ćirić, dr Milošu Nikoliću, Mariji Smiljković i Marini Kostić na pomoći, smehu i opuštenoj atmosferi koje su olakšale višegodišnji rad.

Takođe se zahvaljujem svim kolegama sa Odeljenja za fiziologiju biljaka Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” koji su na ovaj ili onaj način učestvovali u izradi ove teze. Bobani veliko hvala jer si omogućila da se skoncentrišem na svoj rad!

Mojoj majci i Dejanu, kao i celoj porodici za koje sam sigurna da su ponosni na mene -

HVALA!

REZIME

Makromicete su gljive iz podrazdela Ascomycotina i Basidiomycotina koje karakterišu krupna plodnosna tela, dovoljno velika da se vide golim okom i uberu rukom. U ovoj doktorskoj disertaciji makromicete iz rodova: *Agrocybe*, *Laetiporus*, *Pleurotus* i *Polyporus*, sakupljene na teritoriji Srbije, detaljno su analizirane. Ispitivan je sadržaj makronutrijenata i odabranih metabolita u makromicetama i utvrđen je njihov biološki potencijal.

Identifikacija i određivanje sadržaja nutrijenata (ukupnih ugljenih hidrata, proteina, masti i pepela), šećera, tokoferola, masnih, fenolnih i organskih kiselina izvedeno je putem HPLC-a sa različitim detektorima u zavisnosti od jedinjenja od interesa. Radi detaljne procene biološkog potencijala ekstrakata makromiceta, izvedeni su testovi *in vitro* antioksidativne, antimikrobne, anti-quorum sensing i citotoksične aktivnosti, a iz bazidiokarpa *Laetiporus sulphureus* 1 izolovan je i okarakterisan lektin i procenjen njegov antibakterijski potencijal.

Rezultati analize makronutrijenata pokazali su da testirane makromicete imaju povoljan profil nutrijenata zbog čega se mogu preporučiti u ishrani. Karakteriše ih znatna količina ugljenih hidrata i proteina kao i nizak sadržaj masti. Analizom šećera identifikovane su: ramnoza, fruktoza, manitol, glukoza i trehaloza koja je bila i najzastupljeniji šećer sa 16,50 g/100 g suve mase kod *Pleurotus ostreatus* K i 32,60 g/100 g suve mase kod *P. ostreatus* S. U uzorcima testiranih vrsta makromiceta određen je sadržaj četiri izoforme tokoferola (α -, β -, γ - i δ -tokoferol), dok je analizom masnih kiselina potvrđeno prisustvo 27 masnih kiselina, među kojima je nutritivno poželjna linolna kiselina najviše zastupljena u uzorku *Agrocybe aegerita* 1 (78,40%). Među prostim organskim kiselinama utvrđeno je prisustvo: oksalne, kininske, jabučne, limunske i fumarne kiseline, dok su analizom organskih kiselina sa fenolnom grupom identifikovane protokatehinska, *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarna i cinaminska kiselina. Izoloacijom i karakterizacijom lektina iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 pokazano je da je lektin multimerne građe, pI vrednosti \sim 4,6. Rezultati antioksidativne aktivnosti (redukciona sposobnost, DPPH· aktivnost, β -karoten/linolna kiselina i TBARS test) pokazali su da su testirane makromicete moćni *in vitro* antioksidativni agensi više ili manje efikasni u neutralizaciji slobodnih radikala, inhibiciji lipidne peroksidacije i redukcionoj sposobnosti ($EC_{50}/EC_{0,5}$ vrednosti su u opsegu 0,25 - 23,78 mg/mL). Etanolni i metanolni ekstrakti bazidiokarpa testiranih makromiceta pokazali su visok antimikrobni potencijal (u odnosu na vodeni ekstrakt)

na testirane mikroorganizme, a utvrđeno je da pri testiranim koncentracijama lektin ne deluje na bakterije, što ide u prilog tvrdnji da supstance prirodnog porekla biološki efekat ostvaruju zahvaljujući aditivnim i sinergističkim interakcijama većeg broja prisutnih jedinjenja. Metanolni ekstrakti testiranih makromiceta su na subinhibitornom nivou efikasno ometali međucelijsku komunikaciju oportunističkog patogena *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, što je zaključeno nakon smanjenja dijametra njegove kolonije, struktura za kretanje i sinteze pigmenta piocijanina koji je ujedno i faktor virulentnosti. Najbolji antibiofilm efekat postigao je uzorak metanolnog ekstrakta *Polyporus squamosus* 1 (88,30%). Umereni citotoksični potencijal na tumorske ćelijske linije humanog porekla HeLa, NCI-H460 i MCF-7 pokazao je samo polisaharidni ekstrakt uzorka *L. sulphureus* 1. Rezultati preliminarne analize hepatotoksičnosti predočili su da ekstrakti nisu toksični za primarne svinjske hepatocite čime je otvoren put za sigurnu primenu preparata na bazi testiranih makromiceta kod ljudi.

Rezultati sprovedenih istraživanja su pokazali da testirane makromicete imaju potencijal funkcionalne hrane zahvaljujući produkciji biološki aktivnih jedinjenja koja mogu pozitivno delovati na zdravlje, a zahvaljujući sposobnosti eradikacije patogenih mikroorganizama, ekstrakti makromiceta su važni pri formulaciji novih antimikrobnih agenasa.

Upotreba makromiceta ima značajan potencijal u unapređivanju zdravlja, dugovečnosti i kvaliteta života i predstavlja primer jedinstva tradicije i nauke. Dalja proučavanja makromiceta ukazuju na pravce za njihov napredak od funkcionalne hrane do dostupnih medicinskih preparata, a kako su neke od testiranih vrsta uspešno kultivisane, veliki su izgledi da se ovako nešto zaista i dogodi u bliskoj budućnosti.

Ključne reči: jestive makromicete, nutrijenti, odabrani metaboliti, biološka aktivnost, lektini

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

UDK broj: 577.121:582.284.3(497.11)(043.3)

ABSTRACT

Macromycetes are fungi from subdivisions Ascomycotina and Basidiomycotina that are large enough to be seen with naked eye and to be picked by hand. In this thesis, selected species from the genera: *Agrocybe*, *Laetiporus*, *Pleurotus* and *Polyporus* were harvested in Serbia and chemically characterized. Their nutrients profile and selected metabolites as well as their biological potential was evaluated.

Quantification of macronutrients (carbohydrates, proteins, fat and ash), selected sugars, tocopherols, fatty, phenolic and organic acids was determined by means of HPLC coupled with various detectors, depending on the type of desired compound. Regarding the evaluation of biological potential, detailed assessments of antioxidant, antimicrobial, anti-quorum sensing and cytotoxic activities were performed. A lectin was extracted from the fruiting body of *Laetiporus sulphureus* 1 as a compound of interest, and was evaluated for its antibacterial activity.

Results of the macronutrient profile suggest that macromycetes are a rich source of carbohydrates and proteins, with low fat content which makes them excellent candidates for food. Sugar analysis revealed the presence of: rhamnose, fructose, mannitol, glucose and trehalose which was the most abundant sugar with 16,50 g/100 g dry weight in *Pleurotus ostreatus* K and 32,60 g/100 g dry weight in *P. ostreatus* S. Four isoforms of tocopherols (α -, β -, γ - and δ - tocopherol) were quantified in samples, while the fatty acid analysis revealed the presence of 27 fatty acids with linoleic acid as the most abundant polyunsaturated fatty acid in sample *Agrocybe aegerita* 1 (78,40%). Amongst simple organic acids, the following were detected in the samples: oxalic, quinic, malic, citric and fumaric acid. Phenolic group containing organic acids analysis indicated the presence of: protocatechuic, *p*-hydroxybenzoic, *p*-coumaric and cinnamic acid. Isolation and characterization of lectin from the *L. sulphureus* 1 basidiocarp revealed that lectin is a multimer with pI value of ~ 4,6. Results of antioxidant activity which was evaluated using four protocols (reducing power, DPPH· scavenging activity, β -caroten/linoleic acid and TBARS test) indicate that selected macromycetes are potent antioxidant agents that showed ability to neutralize free radicals, inhibit lipid peroxidation and reducing power ($EC_{50}/EC_{0.5}$ is in range of 0,25 – 23,78 mg/mL). Ethanolic and methanolic extracts of mushroom fruiting bodies revealed potent antimicrobial potential against the tested pathogenic microorganisms (compared to the aqueous extracts), while lectin didn't show antibacterial

activity at the tested concentrations, which supports the claim that natural sourced substances achieve their full biological potential thanks to the additive and synergistic interactions of all the present compounds. Methanolic extracts of the selected macromycetes were tested at subinhibitory level for their ability to interfere with bacterial cell-cell communication using *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a model system. Obtained results suggest that mushroom extract very efficiently reduced the diameter of bacterial colony, structures that enable its dispersion, as well as the synthesis of pigment pyocyanin – its virulent factor. The best antibiofilm effect was observed for the methanolic extract of *Polyporus squamosus* (88,30%). Moderate cytotoxic potential was exclusive for polysaccharide extract of *L. sulphureus* 1 against the following carcinogenic cell lines: HeLa, NCI-H460 and MCF-7. In addition, results of the preliminary hepatotoxicity analysis indicate the extracts are non-toxic for the porcine primary cells in tested concentrations, providing the opportunity for safe human consumption of these mushrooms.

All the obtained results indicate that the selected macromycetes have potential as functional foods thanks to the production of biologically active compounds which have beneficial health effects and in addition, given their ability to eradicate pathogenic microorganisms, mushrooms are important in the formulation of new available antimicrobial agents.

Macromycetes are a true example of tradition and novelty unity and they have significant potential in maintaining and improving health, longevity and quality of life. Their current status and future prospects open up new avenues for improving their status from functional foods to proper medicinal products. Since the tested mushrooms have been successfully cultivated, something like this may actually happen in near future.

Keywords: edible macromycetes, nutrients, selected metabolites, biological activity, lectins

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Algology and mycology

UDC number: 577.121:582.284.3(497.11)(043.3)

Lista skraćenica:

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

AHL – laktoni sa acilovanim homoserinom (*engl. acyl-homoserine lactones*)

AS - amonijum sulfat

ATCC - Kolekcija američkog centra kultura (*engl. American Type Culture Collection*)

AOAC - zvanična Asocijacija analitičkih hemičara (*engl. Association of Official Analytical Chemists*)

BCA - bicinhoninska kiselina (*engl. bicinchoninic acid*)

BHA – butil-hidroksianisol

BHT – butil-hidroksitoluen

CBB - coomassie brilliant blue

CF - čistična fibroza

CFU - broj ćelija koje formiraju koloniju (*engl. colony forming unit*)

CM - karboksimetil sefaroza

DAD detektor – detektor niza dioda (*engl. diode array detector*)

DEAE - dietilaminoetil celuloza

dH₂O - destilovana voda

DMEM - hranljiva podloga za ćelijsku kulturu (*engl. Dulbecco's modified eagle medium*)

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH• - 2,2-difenil-2-pikril-hidrazil radikal

DTT - ditiotreitrol (*engl. dithiothreitol*)

EC₅₀ - efektivna koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% radikala

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina

EE - etanolni ekstrakt

FAME - metil-estri masnih kiselina (*engl. fatty acids methyl esters*)

FAO - Organizacija za hranu i poljoprivredu (*engl. Food and Agriculture Organization*)

FBS - serum fetusa govečeta (*engl. fetal bovine serum*)

FID - plameno jonizujući detektor (*engl. flame ionisation detector*)

GAE - ekvivalent galne kiseline (*engl. gallic acid equivalent*)

HeLa - ćelijska linija humanog karcinoma cerviksa

HePG2 - ćelijska linija humanog primarnog karcinoma jetre

HIV - virus humane imunodeficijencije (*engl. human immunodeficiency virus*)

HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (*engl. high performance liquid chromatography*)

HSV - *Herpes simplex* virus

GI₅₀ - koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50%

IEF - izoelektrično fokusiranje (*engl. isoelectric focusing*)

INT - *p*-jodonitrotetrazolijum (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil tetrazolijum hlorid

LB – hranljiva podloga korišćena za gajenje *P. aeruginosa* PAO1 (*engl. lysogeny broth*)

LC - tečna hromatografija (*engl. liquid chromatography*)

MA – malt (sladni) agar korišćen za gajenje mikromiceta

MBK - minimalna baktericidna koncentracija

MCF-7 - ćelijska linija humanog karcinoma dojke

MDA - malondialdehid

ME - metanolni ekstrakt

MFK - minimalna fungicidna koncentracija

MH - hranljiva podloga za gajenje bakterija (Müller-Hinton agar)

MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

MRSA - meticilin rezistentan soj *Staphylococcus aureus* (*engl. methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MW CO - molecular weight cut off (granica molekulske mase)

n.i. - nije identifikovano

NaCl - natrijum hlorid

NaN₃ - natrijum azid

NC - nitrocelulozna membrana

NCBI – Nacionalni centar za biotehnologiju informacija (*engl. The National Center for Biotechnology Information*)

NCI - H460 - ćelijska linija humanog karcinoma nemalih ćelija pluća

NCTC - Nacionalna kolekcija centra kultura (*engl. National Collection of Type Cultures*)

NK cells - limfociti ćelije ubice (*engl. natural killer cells*)

OH• - hidroksil radikal

PAGE - elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (*engl. polyacrylamide gel electrophoresis*)

PAO1 - *Pseudomonas aeruginosa* soj

PBS - fosfatni pufer koji sadrži so natrijum hlorid

pI - izoelektrična tačka

PLP2 - netumorska ćelijska linija svinjske jetre

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid (*engl. phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PUZ - pufer za uzorke

QS - detekcija kvoruma (*engl. quorum sensing*)

R² - koeficijent determinacije

RNK - ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne azotne vrste (*engl. reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivne kiseonične vrste (*engl. reactive oxygen species*)

RPMI - hranljiva podloga za ćelijsku kulturu (*engl. Roswel park memorial institut*)

RSA - aktivnost hvatanja radikala (*engl. radical scavenging activity*)

RSS - reaktivne vrste sumpora (*engl. reactive sulphur species*)

SD - standardna devijacija

SDS - natrijum-dodecilsulfat (*engl. sodium dodecyl sulfate*)

subMIK - subinhibitorne koncentracije

TBARS – reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (*engl. thiobarbituric acid reactive substances*)

TBHQ - *tert*-butilhidrohinon (*engl. tert-butylhydroquinone*)

TCA - trihlorsirćetna kiselina (*engl. trichloroacetic acid*)

TIVP - tip IV pili

TLC - hromatografija na tankom sloju (*engl. thin layer chromatography*)

TSB - hranljiva podloga za gajenje bakterija (*engl. tryptic soy broth*)

UFLC - PDA – ultrabrza tečna hromatografija sa nizom fotodioda (*engl. ultrafast liquid chromatography photodiode array*)

UV svetlost - ultra ljubičasta svetlost (*engl. ultraviolet*)

VE - vodeni ekstrakt

β-ME - β-merkaptoetanol

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Klasifikacija i opis testiranih makromiceta.....	2
1.2. Hemijski sastav, nutritivna svojstva i energetska vrednost makromiceta.....	6
1.2.1. Proteini i amino kiseline	6
1.2.2. Ugljeni hidrati: dostupni ugljeni hidrati i dijetetska vlakna.....	6
1.2.3. Lipidi.....	7
1.2.4. Pepeo i mineralni elementi.....	7
1.2.5. Vitamini	8
1.2.6. Fenolna jedinjenja i organske kiseline	8
1.2.7. Energetska vrednost	9
1.3. Antioksidativna aktivnost	9
1.4. Mikroorganizmi i njihov značaj.....	11
1.4.1. Antimikrobni agensi i rezistentnost	11
1.4.2. Quorum sensing mehanizam i mogući inhibitori.....	12
1.5. Biološki aktivna jedinjenja makromiceta.....	15
1.5.1. Jedinjenja male molekulske mase.....	16
1.5.1.1. Terpeni i terpenoidi	16
1.5.1.2. Ostala biološki aktivna jedinjenja	16
1.5.2. Jedinjenja velike molekulske mase.....	17
1.5.2.1. Polisaharidi	17
1.5.2.2. Peptidi i proteini.....	18
1.5.2.3. Lektini	19
1.6. Biološke aktivnosti makromiceta.....	20
1.6.1. Imunomodulatorna aktivnost	20
1.6.2. Antitumorska aktivnost.....	21
1.6.3. Antioksidativna aktivnost	22
1.6.4. Antihiperholesterolna aktivnost	22
1.6.5. Antihiperглиkemijska aktivnost.....	22
1.6.6. Antimikrobna aktivnost	23
1.6.7. Druge aktivnosti: antiinflamatorna, analgetska, antihistaminska i prebiotička	24

2. Ciljevi istraživanja	25
3. Materijal i metode	26
3.1. Testirane makromicete.....	26
3.2. Priprema ekstrakata.....	26
3.2.1. Priprema metanolnog ekstrakta.....	26
3.2.2. Priprema etanolnog ekstrakta.....	26
3.2.3. Priprema vodenog ekstrakta.....	27
3.3. Hemijska analiza bazidiokarpa testiranih makromiceta	27
3.3.1. Određivanje nutritivne vrednosti	27
3.3.1.1. Ukupni sadržaj proteina	27
3.3.1.2. Ukupni sadržaj masti.....	28
3.3.1.3. Ukupni sadržaj pepela.....	28
3.3.1.4. Ukupni sadržaj ugljenih hidrata i energetska vrednost	28
3.3.2. Hemijska karakterizacija šećera.....	29
3.3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu šećera	29
3.3.2.2. HPLC analiza šećera	29
3.3.3. Hemijska karakterizacija tokoferola	30
3.3.3.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu tokoferola.....	30
3.3.3.2. HPLC analiza tokoferola.....	30
3.3.4. Hemijska karakterizacija organskih kiselina	31
3.3.4.1. Hemijska analiza prostih organskih kiselina	31
3.3.4.1.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu prostih organskih kiselina.....	31
3.3.4.1.2. HPLC analiza prostih organskih kiselina.....	31
3.3.4.2. Hemijska karakterizacija organskih kiselina sa fenolnom grupom (fenolnih kiselina).....	32
3.3.4.2.1. Ekstrakcija fenolnih kiselina	32
3.3.4.2.2. HPLC-DAD-ESI/MS analiza fenolnih kiselina	32
3.3.4.3. Hemijska karakterizacija masnih kiselina.....	33
3.3.5. Izolacija i karakterizacija lektina iz bazidiokarpa <i>L. sulphureus</i>	33
3.3.5.1. Ekstrakcija neprečišćenih lektina.....	34
3.3.5.2. Određivanje hemaglutinacione aktivnosti.....	35
3.3.5.3. Karakterizacija izolovanih lektina.....	36

3.3.5.3.1. Nativna i SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)	36
3.3.5.3.2. Izoelektrično fokusiranje (IEF)	36
3.3.5.3.3. Western blotting	36
3.3.5.4. Detekcija lektinske aktivnosti na NC membrani	36
3.3.5.5. Izolacija lektina putem jonoizmenjivačke hromatografije	37
3.3.5.6. Izolacija i prečišćavanje lektina putem afinitetne hromatografije	37
3.3.5.6.1. Ekstrakcija lektina za afinitetnu hromatografiju	38
3.3.5.6.2. Prečišćavanje lektina afinitetnom hromatografijom	38
3.4. Ukupni sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost	38
3.4.1. Priprema ekstrakata	39
3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	39
3.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti testiranih makromiceta	39
3.4.3.1. Fericijanid metoda/metoda Pruskog plavog	39
3.4.3.2. DPPH test	40
3.4.3.3. β -Karoten/linolna kiselina test	40
3.4.3.4. TBARS test (Thiobarbituric acid reactive substances): reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline	41
3.5. Test mikroorganizmi i ispitivanje antimikrobne aktivnosti	42
3.5.1. Test bakterije	42
3.5.2. Test mikromicete	42
3.5.3. Hranljive podloge	42
3.5.4. <i>In vitro</i> testovi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata makromiceta	43
3.5.4.1. Mikrodiluciona metoda – antibakterijska aktivnost	43
3.5.4.2. Mikrodiluciona metoda – antifungalna aktivnost	44
3.5.4.3. Bioautografska metoda – antibakterijska aktivnost	44
3.5.5. Ispitivanje anti-QS aktivnosti ekstrakata testiranih makromiceta	45
3.5.5.1. Metoda za određivanje pokretljivosti	45
3.5.5.2. Metoda za određivanje produkcije pigmenta piocijanina kod <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	46
3.5.5.3. Metoda za određivanje antibiofilm aktivnosti kod <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	46
3.6. Određivanje citotoksične aktivnosti testiranih makromiceta	47
3.6.1. Određivanje citotoksične aktivnosti na maligne ćelijske linije humanog porekla	47
3.6.2. Određivanje citotoksične aktivnosti na primarne ćelije svinjske jetre	48

3.7. Statistička analiza.....	48
4. Rezultati i diskusija.....	50
4.1. Identifikacija makromiceta	50
4.2. Nutritivna svojstva testiranih makromiceta	50
4.3. Sadržaj i hemijski sastav odabranih metabolita testiranih makromiceta	56
4.3.1. Šećeri.....	56
4.3.2. Tokoferoli	58
4.3.3. Organske kiseline.....	61
4.3.3.1. Proste organske kiseline (organske kiseline)	61
4.3.3.2. Organske kiseline sa fenolnom grupom (fenolne kiseline).....	63
4.3.3.3. Masne kiseline.....	66
4.3.4. Lektini	71
4.3.4.1. Izolacija lektina	74
4.4. Biološke aktivnosti testiranih makromiceta.....	76
4.4.1. Antioksidativna aktivnost	76
4.4.2. Antimikrobna aktivnost	83
4.4.2.1. Antibakterijska aktivnost.....	83
4.4.2.1.1. Antibakterijska aktivnost sirovih ekstrakata	83
4.4.2.1.2. Antibakterijska aktivnost lektina.....	87
4.4.2.2. Antifungalna aktivnost sirovih ekstrakata	93
4.4.2.3. Anti - QS aktivnosti	102
4.4.2.3.1. Pokretljivost	102
4.4.2.3.2. Inhibicija produkcije piocijanina	106
4.4.2.3.3. Antibiofilm aktivnost	107
4.4.3. Citotoksična aktivnost.....	109
4.5. Opšta diskusija.....	112
5. Zaključci	115
6. Prilog.....	118
7. Literatura.....	123

Lekovi i hrana imaju zajedničko poreklo.

Kineska izreka

1. Uvod

Makromicete (predstavnicu podrazdela Ascomycotina i Basidiomycotina) su gljive čiji predstavnici imaju zajedničke karakteristike: krupna plodonosna tela (hipogeična ili epigeična), dovoljno velika da se vide golim okom i uberu rukom i ne predstavljaju taksonomsku kategoriju (Chang i Miles, 2004). Jestive vrste korišćene su još pre 13 000 godina u Čileu, a najdetaljniji podaci o upotrebi gljiva u medicinske svrhe su stari gotovo 3000 godina i potiču iz Tradicionalne kineske medicine. Lekovita sredstva prirodnog porekla su bila osnova i za savremenu kliničku praksu zemalja Dalekog istoka (Nestler, 2002; Tang i dr., 2008; Shi i dr., 2014; Martins, 2017). Upotreba makromiceta u medicinske svrhe je donedavno marginalizovana u zemljama zapadne hemisfere i cenjena su samo njihova organoleptička svojstva. Danas je situacija značajno promenjena, na šta ukazuju intenzivna proučavanja u oblasti medicinske mikologije (Wasser, 2002; Morris i dr., 2017). Broj trenutno opisanih vrsta makromiceta je blizu 14 000, od čega je oko 700 vrsta sa lekovitim svojstvima (Stajić, 2015). Ipak, katkad je teško odrediti granicu između jestivih gljiva i onih sa medicinskim svojstvima. Mnoge jestive vrste poseduju i terapeutska svojstva, a neke vrste korišćene u medicinske svrhe su i jestive (Valverde i dr., 2015). Bojazan od prekomerne eksploatacije samoniklih vrsta dovela je do razvoja tehnologija za komercijalno gajenje velikog broja vrsta makromiceta u drugoj polovini XX-og veka, što je 2006. godine donelo prihod od 36 milijardi dolara i učinilo gajenje gljiva značajnom granom ekonomije. Potencijal makromiceta izuzetno je visok i u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, biotehnologiji, poljoprivredi, šumarstvu, bioremedijaciji i drugim granama privrede (Lindequist i dr., 2005; Lange, 2014; Stajić, 2015).

Makromicete proizvode niz bioaktivnih jedinjenja kroz puteve primarnog i/ili sekundarnog metabolizma. Dok su primarni metaboliti esencijalni za rast i razviće organizma, sekundarni metaboliti sintetisani su iz viška nekih intermedijera primarnog metabolizma ili nastaju kao posledica poremećenog primarnog metabolizma (Muntañola-Cvetković, 1987). Zahvaljujući povoljnim klimatskim i geografskim uslovima, diverzitet makromiceta u Srbiji je veliki, a nedostatak podataka o bioaktivnim svojstvima autohtonih vrsta povećao je interesovanje domaće naučne javnosti za njihovim proučavanjem (Karaman i dr., 2010).

1.1. Klasifikacija i opis testiranih makromiceta

Podrazdeo: Basidiomycotina

Klasa: Hymenomycetes

Red: Agaricales

Familija: Bolbitiaceae

Rod: Agrocybe

Agrocybe aegerita (V.Brig.) Singer

Plodonosno telo *A. aegerita* je mesnato i menja oblik tokom različitih razvojnih stadijuma gljive, u ranoj razvojnoj fazi je polukružnog oblika, zatim zvonast, dok se u zrelijoj fazi širi. Boja plodonosnog tela je tamno smeđa u sredini, a svetlija prema krajevima. Himenofor je listast, a listići su sive i svetlobraon boje i u početnoj fazi sazrevanja prekriveni delimičnim velom. Drška je relativno dugačka u odnosu na prečnik šešira, često blago povijena i pri dnu tanja. Centralno je postavljena i često kolenasta sa prolaznom suknjicom. Plodonosna tela su najčešće saprobi panjeva jablana odakle i potiče srpsko narodno ime ove vrste – jablanovača i formiraju se od proleća do jeseni u umerenoj klimatskoj zoni Severne Amerike, Evrope i Azije (Hadžić i Vukojević, 2008; 2013). Komercijalno se gaji na različitom poljoprivrednom lignoceluloznom otpadu - slama, ljuske od kikirikija i dr. U Italiji i Japanu se smatra delikatesnom vrstom (Philippoussis i dr., 2001; Isikhuemhen i dr., 2009).



Slika 1. Plodonosna tela *Agrocybe aegerita* na prirodnom staništu (fotografija N. Lazić)

Podrazdeo: Basidiomycotina

Klasa: Hymenomycetes

Red: Aphyllophorales

Familija: Polyporaceae

Rod: Laetiporus

Laetiporus sulphureus (Bull.) Murrill

Plodonosna tela vrste *L. sulphureus* su lepezasta (širine i do 50 cm), zonirano raspoređena (5-50 bazidiokarpa), suđerasta kao mlada, a kasnije plutaste konzistencije. Boja plodonosnog tela je izrazito žuto-narandžasta, himenofor je cevast i žut, a pore izuzetno sitne i okrugle. Plodonosna tela su pričvršćena lateralno za stablo. Narodna imena pod kojima je vrsta poznata kod nas su šumska lepeza i šumsko pile (Hadžić i Vukojević, 2008; 2013). Ova lignikolna makromiceta raste na stablima listopadnog i četinarskog drveća tokom proleća i leta u umerenoj zoni Azije, Evrope i Severne Amerike. Plodonosna tela su jestiva nakon termičke obrade, iako postoje podaci o gastrointestinalnim smetnjama i promenama u centralnom nervnom sistemu nakon konzumiranja kod dece i starijih ljudi (Appleton i dr., 1988). Bazidiokarpi su uspešno gajeni na supstratu od mešane piljevine (Pleszczyńska i dr., 2013).



Slika 2. Plodonosna tela *Laetiporus sulphureus* na prirodnom staništu (fotografija M. Nešković)

Podrazdeo: Basidiomycotina

Klasa: Hymenomycetes

Red: Aphyllophorales

Familija: Polyporaceae

Rod: Pleurotus

Pleurotus ostreatus (Jacq.) P.Kumm.

Plodnosna tela *P. ostreatus* su lepezasta, široka 5-25 cm, pojedinačna ili u grupama. Boja bazidiokarpa varira od beličaste do sive i tamno braon. Himenofor je listast, a listići prljavo bele ili sive boje, retki i široki. Drška je glatka ili sa romboidnom mrežom pri vrhu, ispunjena, ekscentrična ili lateralna. Bazidiokarpi *P. ostreatus* rastu najčešće u listopadnim šumama od proleća do sredine zime. U srpskom narodu ova vrsta je poznata kao bukovača jer najčešće naseljava panjeve bukve (Hadžić i Vukojević, 2008; 2013). Mogućnosti gajenja na različitim supstratima su izuzetno velike, uključujući i razne vrste otpadnog materijala (Gregori i dr., 2007; Sánchez, 2010; Kunjadia i dr., 2014). Sánchez (2010) navodi da je ovo druga najčešće komercijalno gajena makromiceta koja ima značajnu ekonomsku i ekološku vrednost, kao i mnogobrojna medicinska svojstva.



Slika 3. Plodnosna tela *Pleurotus ostreatus* na prirodnom staništu (fotografija J. Petrović)

Podrazdeo: Basidiomycotina

Klasa: Hymenomycetes

Red: Aphyllophorales

Familija: Polyporaceae

Rod: Polyporus

Polyporus squamosus (Huds.) Fr.

Plodonosno telo *P. squamosus* raste pojedinačno ili u grupama, širine je ~ 80 cm i debljine ~ 10 cm, nekada teško i do 2 kg. Obično je braon-žute boje, lepezastog ili polusferičnog oblika, ulegnuto; na površini su lepljive ljsupe (skvamule) koje često imaju dlačice. Drška je debela, kratka i lateralno postavljena; može biti zašiljena ili sa gomoljstvim završetkom. Himenofor je cevast, prljavobeo, žućkast ili svetlobraon, a pore su okrugle ili romboidalne. (Hadžić i Vukojević, 2008; 2013). U srpskom narodu ova vrsta je poznata kao škripavac. Kosmopolitski je rasprostranjena i raste u rano leto na različitim vrstama drveća (javor, topola, vrba).



Slika 4. Plodonosna tela *Polyporus squamosus* na prirodnom staništu (fotografija N. Lazić)

1.2. Hemijski sastav, nutritivna svojstva i energetska vrednost makromiceta

Samonikle jestive makromicete su cenjene širom sveta zbog neponovljivog mirisa, ukusa i teksture, kao i povoljnih hemijskih i nutritivnih svojstava (Barros, 2008a; Guillamón i dr., 2010). Ističu se visokim sadržajem ugljenih hidrata, proteina specifičnog aminokiselinskog sastava, nezasićenih masnih kiselina i dijetetskih vlakana (Barros i dr., 2007a; Barros, 2008a; Rathee, 2012). Pored navedenih, makromicete sadrže u manjoj količini i niz drugih biološki aktivnih jedinjenja: fenole, terpenoide, steroide, lektine, vitamine i dr. (Valentão i dr., 2005b; Barros, 2008a; Zhong, 2009). Podaci ukazuju da je njihova hemijska kompozicija pod uticajem genetičke strukture i faktora spoljašnje sredine - kompozicije supstrata na kome rastu, klimatskih faktora i dr. (Fernandes i dr., 2016; Barroetaveña i Toledo, 2017).

1.2.1. Proteini i amino kiseline

Prema podacima FAO (Food and Agriculture Organization), proteini makromiceta su više nutritivne vrednosti nego proteini biljaka (FAO, 1991; Kalač, 2013) i sadrže slobodne aminokiseline, amide i srodna azotna jedinjenja: metionin sulfoksid, β -alanin, cističnu kiselinu, hidrokisiprolin, fosfoserin, kreatinin, citrulin i dr. (Chang i Miles, 2004; Kalač, 2013). Ukupni sadržaj proteina u suvim plodonosnim telima varira između vrsta u opsegu od 12,00 g/100 g suve mase kod *Sarcodon aspratus*, do 59,40 g/100 g suve mase kod *Lepista nuda*. Poznato je i da sadržaj proteina zavisi od faze razvića i dela bazidiokarpa koji je analiziran (Kalač, 2009; Barroetaveña i Toledo, 2017). Nutritivni doprinos slobodnih amino kiselina je nizak i iznosi ~ 1% suve mase (Barroetaveña i Toledo, 2017).

1.2.2. Ugljeni hidrati: dostupni ugljeni hidrati i dijetetska vlakna

Ugljene hidrate makromiceta čine: monosaharidi (pentoze, metilpentoze, heksoze), disaharidi, amino-šećeri, alkoholni šećeri, šećerne kiseline, polisaharidi i dr. (Kalač, 2013; Barroetaveña i Toledo, 2017). Kako su naveli Barroetaveña i Toledo (2017), ugljeni hidrati makromiceta su sa nutritivnog aspekta podeljeni na one koji podležu digestiji i apsorpciji u digestivnom traktu i obezbeđuju ćelijama energiju (monosaharidi, disaharidi, trisaharidi, skrob i maltooligosaharidi) i dijetetska vlakna, koja su nesvarljiva i kroz debelo crevo sisara prolaze nepromenjena čineći supstrat za fermentaciju mikrobioti intestinuma (celuloza, hemiceluloza, pektin, oligosaharidi, hitin i dr.). Makromicete karakteriše i visok sadržaj trehaloze, arabinoze, fruktoze, glukoze i dr., dok je sadržaj rezervnog polisaharida glikogena ograničen, pa je i njegov

unos kroz ishranu praktično zanemarljiv (Barros, 2008a; Barroetaveña i Toledo, 2017). Sadržaj dijetetskih vlakana kod različitih vrsta je u opsegu 8,30 g/100 g suve mase kod *Craterellus odoratus* do 37,00 g/100 g suve mase kod *Pleurotus djamor* i veoma je važan sa medicinskog aspekta, jer vlakna značajno poboljšavaju funkciju digestivnog trakta, vezuju vodu, usporavaju apsorpciju šećera i masti iz hrane i time regulišu nivo holesterola i glukoze u krvi (Barroetaveña i Toledo, 2017).

1.2.3. Lipidi

Lipide čine jedinjenja koja učestvuju u građi ćelijske membrane, deluju kao hormoni ili njihovi prekursori, pomažu u digestivnom procesu i čine važan izvor energije, pa je njihov balansiran unos u organizam apsolutno neophodan za održavanje zdravlja (Ribeiro i dr., 2009). Lipidi makromiceta su karakteristični zbog visokog udela nutritivno poželjnih, nezasićenih masnih kiselina koje čine i do 72% ukupnog sadržaja lipida (Chang i Miles, 2004). Nezasićene masne kiseline višestruko su značajne za ljude, pa je određivanje ovog parametra jedan od faktora pri definisanju makromiceta kao namirnica korisnih za ljudsko zdravlje. Prema podacima Kalača (2009), kod većine analiziranih makromiceta prevladavaju polinezasićena linolna (C18:2) i α -linolenska kiselina (C18:3), mononezasićena oleinska kiselina (C18:1), ali je često detektovana i nutritivno nepoželjna zasićena palmitinska kiselina (C16:0). Nezasićene masne kiseline su prekursori aromatičnih jedinjenja koja gljivama daju specifičan miris, pa je tako linolna kiselina prekursor 1-okten-3-ol koje je dominantno aromatično jedinjenje kod većine gljiva (Reis i dr., 2011a; Kalač, 2013). Unos nezasićenih masnih kiselina visoko koreliše sa metaboličkim funkcijama jer ove kiseline utiču na nivo triglicerida i snižavaju rizik od kardiovaskularnih oboljenja, hipertenzije i artritisa (Voet i Voet, 2004).

1.2.4. Pepeo i mineralni elementi

Sadržaj pepela je varijabilniji kod samoniklih makromiceta nego kod komercijalno gajenih kao posledica većeg diverziteta supstrata na kojima rastu samonikle vrste. Najniža vrednost je određena kod *Boletus edulis* 5,53 g/100 g suve mase, a najviša kod *Russula olivacea* 37,78 g/100 g suve mase (Grangeia i dr., 2011; Heleno i dr., 2011). Makromicete u bazidiokarpima akumuliraju u znatnim količinama sledeće mineralne elemente: kalijum, natrijum, kalcijum, fosfor, magnezijum i gvožđe, a u znatnoj količini mogu akumulirati i teške metale kao što su: živa, nikl, kadmijum koji se konzumiranjem plodonosnih tela unose u

organizam u nepromenjenom obliku i mogu izazvati neželjene zdravstvene efekte (Kalač, 2010; 2013; Barroetaveña i Toledo, 2017).

1.2.5. Vitamini

Makromicete sadrže vitamine B kompleksa i to pre svega tiamin - B₁, riboflavin - B₂ i niacin - B₃ (Barroetaveña i Toledo, 2017). Sadržaj tiamina varira u opsegu 0,02 – 1,60 mg/100 g suve mase, riboflavina 0,30 – 4,50 mg/100 g suve mase i niacina 1,20 – 6,60 mg/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete (Wang i dr., 2014; Barroetaveña i Toledo, 2017). Tiamin je kokarboksilaza u regulaciji metabolizma ugljenih hidrata makromiceta, dok je biotin kofaktor u reakcijama karboksilacije tokom sinteze masnih kiselina (Chang i Miles, 2004). Takođe, makromicete u znatnoj količini u bazidiokarpima sadrže tokoferole, koji zahvaljujući sposobnosti efikasne eliminacije slobodnih radikala predstavljaju važne antioksidanse (Heleno i dr., 2010; Carochi i Ferreira, 2013). Visok unos tokoferola putem namirnica može smanjiti rizik od nastajanja nekih hroničnih oboljenja koja se dovode u vezu sa oksidativnim stresom, pre svega kardiovaskularnih i malignih (Heleno i dr., 2010). Ukupni sadržaj tokoferola varira od 0,002 mg/100 g suve mase kod *Lepista sordida* do čak 0,45 mg/100 g suve mase kod *Suillus luteus* (Barroetaveña i Toledo, 2017). Veliki broj vrsta makromiceta sintetiše i jednako važne prekursore nekih vitamina: γ -ergosterol (prekursor vitamina D₂) i β -karoten (prekursor vitamina A) (Kalač, 2012).

1.2.6. Fenolna jedinjenja i organske kiseline

Fenolna jedinjenja i organske kiseline doprinose organoleptičkim karakteristikama makromiceta, a zahvaljujući antioksidativnom kapacitetu ova jedinjenja imaju i protektivnu ulogu (Barros i dr., 2009; Barros i dr., 2013). Fenolna jedinjenja obuhvataju različite podklase jedinjenja raznovrsne strukture, kao što su: fenolne kiseline, flavonoidi, fenilpropanoidi koji su jednostavni molekuli, kao i visoko polimerizovane lignane, tanine, oksidovane polifenole i dr. (Ferreira i dr., 2009). Prema hemijskoj strukturi, to su aromatična hidroksilovana jedinjenja sa jednom ili više hidroksilnih grupa koja se često izoluju iz namirnica prirodnog porekla, voća, povrća i makromiceta. U uzorcima makromiceta najčešće identifikovane fenolne kiseline su podeljene u dve velike podgrupe, derivate hidroksibezoeve kiseline i derivate hidrocinaaminske kiseline (Ferreira i dr., 2009). Ovi derivati su najčešće deo kompleksnijih struktura, mada se mogu u znatno manjoj meri detektovati i u slobodnoj formi. Iako nisu od nutritivne važnosti,

fenolna jedinjenja imaju specifične lekovite efekte, smanjuju rizik od hroničnih oboljenja i značajno unapređuju stabilnost prehrambenih proizvoda, što se dovodi u vezu sa visokim antioksidativnim kapacitetom (Ferreira i dr., 2009). Prosečan dnevni unos putem ishrane iznosi 200 mg/danu (Helena i dr., 2015).

Organske kiseline su slabo degradovane tokom skladištenja, pa efikasno održavaju organoleptičke karakteristike namirnica. Koncentracija organskih kiselina određuje i ukus makromiceta, a zahvaljujući visokom antioksidativnom potencijalu deluju preventivno na različita oboljenja. Sadržaj organskih kiselina je viši u bazidiokarpu makromiceta nego u miceliji, a najčešće identifikovane organske kiseline makromiceta su: oksalna, fumarna, kininska, jabučna, limunska kiselina i dr. (Pereira i dr., 2009; Barros i dr., 2013).

1.2.7. Energetska vrednost

Makromicete su izuzetno vrednovana hrana zahvaljujući visokom sadržaju ugljenih hidrata i proteina kao i niskom sadržaju masti. Kalorijski sadržaj većine vrsta je nizak, najčešće u opsegu 350 - 400 kcal/100 g suve mase, mada postoje značajna odstupanja između vrsta, kao i u okviru iste vrste različitog geografskog porekla, što se ne može pouzdano pripisati nekom određenom faktoru (Kalač, 2013; Barroetaveña i Toledo, 2017). Energetska vrednost makromiceta se računa prema Regulativi Evropskog Parlamenta br. 1169/2011:

$$E \text{ (kcal/100 g)} = 4 \times (\text{g}_{\text{proteina}} + \text{g}_{\text{kupni dostupni ugljeni hidrati}}) + 2 \times (\text{g}_{\text{dijetetskih vlakana}}) + 9 \times (\text{g}_{\text{masti}})$$

1.3. Antioksidativna aktivnost

Energija potrebna za funkcionisanje bioloških sistema se oslobađa iz reakcija oksidacije i redukcije koje su katalizovane enzimima (Voet i Voet, 2014), ali su reakcije oksidacije koje se smatraju vitalnim za funkcionisanje organizama paradoksalno i osnova za produkciju slobodnih radikala i neradikalnih intermedijera koji oštećuju ćelijske strukture (De Silva i dr., 2013). Slobodni radikali su reaktivni oblici hemijskih jedinjenja koji sadrže nespareni elektron koji kruži u perifernom omotaču oko nukleusa. U biološkim sistemima najčešće nastaju kao međuproizvod u metabolizmu kiseonika, azota i sumpora, pa se na taj način formiraju tri tipa reaktivnih vrsta: kiseonika (ROS - Reactive Oxygen Species), azota (RNS - Reactive Nitrogen Species) i sumpora (RSS - Reactive Sulphur Species) (Carocho i Ferreira, 2013). Slobodni radikali nastaju pod uticajem faktora koji su svrstani u unutrašnje i spoljašnje. Unutrašnji faktori

su rezultat ćelijskog metabolizma u mitohondrijama, peroksizomima, inflamacionih procesa, fagocitoze, ishemije i fizičke aktivnosti, a produkcija slobodnih radikala koji su nastali na ovaj način je „uobičajena” (Carocho i Ferreira, 2013). Spoljašnji faktori koji utiču na porast produkcije slobodnih radikala bez njihove adekvatne neutralizacije su brojni i uključuju zagađivače spoljašnje sredine, radijaciju, pesticide, duvanski dim i dr. (Lobo i dr., 2010; Carocho i Ferreira, 2013).

Balans između produkcije i neutralizacije slobodnih radikalskih vrsta je neophodno ostvariti u svim organizmima, jer prilikom prekomerne produkcije reaktivnih vrsta bez njihove adekvatne neutralizacije, reaktivne radikalske vrste se nagomilavaju i deluju na ćelijske strukture (proteine, DNK i RNK molekule, šećere i lipide) (Hepel i Andreescu, 2015). Ćelija je nakon oštećenja dovedena u stanje oksidativnog stresa koje je tesno povezano sa etiologijom i progresijom mnogih bolesti (Rahman, 2007; Ferreira i dr., 2009; Carocho i Ferreira, 2013). Urođeni sistemi neutralizacije uprkos visokoj efikasnosti, nekada ne mogu ukloniti sve nastale slobodne radikale. Tada je važan unos namirnica koje su bogate jedinjenjima sa antioksidativnim potencijalom kao profilaktičkih agenasa, uključujući i makromicete (Ferreira i dr., 2009; Orhan i Üstün, 2011). Produkcija slobodnih radikala veoma je značajna i u prehrambenoj industriji, naročito kod namirnica sa produženim rokom trajanja jer je oksidacija posle mikrobiološkog kontaminiranja, veoma važan uzrok kvarenja hrane (Huis in't Veld, 1996). Veliki broj proizvoda je dostupan tokom cele godine zahvaljujući korišćenju sintetskih antioksidanasa kojima se održava nutritivna vrednost i organoleptičke karakteristike namirnica, a najčešće su za ovu svrhu korišćeni BHT (butilirani hidroksitoluen – E-321), BHA (butilirani hidroksianisol – E-320), TBHQ (terc-butilhidrokinon – E-319) i propil galat (PG - E-311) (Ahmed i dr., 2013; Carocho i Ferreira, 2013). Međutim, kako sintetski antioksidansi negativno deluju na zdravlje ljudi, tehnologija prerade je usmerena ka korišćenju ovih jedinjenja u što nižim koncentracijama, kao i ka razvoju preparata sigurnijih po ljudsko zdravlje (Brewer, 2011). Zakonske regulative kojima je propisan dozvoljeni dnevni unos ovih jedinjenja su stroge i ukazuju da je mala verovatnoća da će se on prevazići, pa ipak sa povećanjem svesti o zdravom načinu života prisutan je trend da se u potpunosti eliminiše njihova upotreba i da se razviju antioksidansi prirodnog porekla koji će biti sigurniji za upotrebu (Brewer, 2011; EFSA, 2011; Carocho i Ferreira, 2013). Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da sirovine prirodnog porekla mogu biti značajna podrška u

borbi protiv oksidativnog stresa i delovati preventivno u pogledu razvoja bolesti koje se dovode u vezu sa njim, iako i oko toga postoje kontroverze (Halliwell, 2013).

1.4. Mikroorganizmi i njihov značaj

Patogeni mikroorganizmi koji prouzrokuju štetne efekte kod domaćina su sa aspekta ljudskog zdravlja najznačajniji. Dele se na obligatne, fakultativne i oportunističke mikroorganizme koji su poslednjih godina u fokusu istraživanja usled porasta broja imunokompromitovanih pacijenata kod kojih oslabljeni imunitet omogućava prenamnožavanje patogena (Madigan i Martinko (2006).

1.4.1. Antimikrobni agensi i rezistentnost

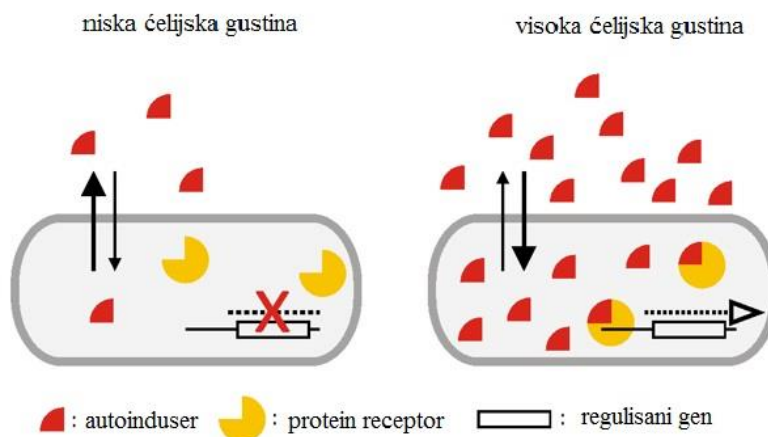
Otkriće antimikrobnih lekova na početku XX-og veka značajno je unapredilo lečenje infekcija uzrokovanih patogenim mikroorganizmima, smanjilo stopu mortaliteta i doprinelo produženju ljudskog veka (Van Hoek i dr., 2011). Ovi agensi specifično deluju na određene biohemijske procese u bakterijskoj ćeliji (DNK replikacija i transkripcija, inhibicija aktivnosti enzima) ili na ćelijske strukture (ribozomi, ćelijski zid i membrane) čime onemogućavaju njihov rast (Madigan i Martinko, 2006). Termin antimikrobni agensi često se izjednačava sa terminom antibiotik što nije slučaj u užem smislu reči. Kako navode Ainsworth i Bisby (1995), antibiotici su jedinjenja koja produkuju mikroorganizmi, a koja inhibiraju rast drugih mikroorganizama, dok u širem smislu antibiotici uključuju i prirodna i sintetisana jedinjenja koja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost (Madigan i Martinko, 2006). Bez obzira na to da li su prirodni ili sintetisani, antibiotici se moraju kontrolisano koristiti jer uzrokuju niz neželjenih efekata i tokom vremena se na njih može razviti rezistentnost. Ova sposobnost mikroorganizama da tolerišu prisustvo antimikrobnih agenasa, na čije dejstvo su ranije bili osetljivi, označena je kao fenomen antimikrobne rezistentnosti i ostvaruje se genskom mutacijom i sticanjem rezistencije od druge bakterije (Madigan i Martinko, 2006; Van Hoek i dr., 2011; Culyba i dr., 2015). Nagli porast broja multirezistentnih sojeva je posledica neosnovane i prekomerne upotrebe antibiotika – u 50% slučajeva vremenski okvir konzumiranja leka je neprilagođen, a doza neadekvatna. Danas se najčešće pominje značaj multirezistentnih sojeva *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* i dr. (Lee i dr., 2013). Za rešavanje ovog problema neophodno je ograničiti upotrebu antibiotika i pronaći nove sirovine sa efikasnim antimikrobnim dejstvom, među kojima makromicete zauzimaju važno mesto (Alves i dr., 2012a). Iako su mnoge

sirovine prirodnog porekla pokazale inhibitornu aktivnost na rast patogenih mikroorganizama, manje od 1% ima kliničku upotrebu. Mali broj medikamenata koji poseduju potencijalnu antimikrobnu aktivnost, od 500 t koji se proizvedu godišnje, dostigne komercijalnu primenu (Madigan i Martinko, 2006).

1.4.2. Quorum sensing mehanizam i mogući inhibitori

Sposobnost patogenih bakterija da uzrokuju simptome bolesti od kliničkog značaja zavisi od više faktora: broja bakterija, puta ulaska infekcije u krvni sistem, efekata mehanizama odbrane domaćina, kao i faktora virulencije (Peterson, 1996). Faktori virulencije su obično proteini ili drugi molekuli koji se otpuštaju korišćenjem signala kaskadnog sistema komunikacije „quorum sensing“ (detekcija kvoruma), zatim kapsule, proteini adhezini koji olakšavaju prijanjanje patogena za površinu domaćina i dr. (Wilson i dr., 2002). Quorum sensing (QS) ili detekcija kvoruma je koordinisana genska ekspresija bakterija usaglašena sa gustinom populacije u datim uslovima sredine u kojima se bakterija nalazi. QS kontroliše gene koji usmeravaju aktivnosti koje su korisne samo kada ih izvodi grupa bakterija koje sinhrono deluju, a ne individua (Rutherford i Bassler, 2012). Ovaj mehanizam osigurava racionalno trošenje dostupnih resursa, kako bi se biološki odgovor javio isključivo u slučaju prisustva kritičnog broja jedinki date vrste. Kod Gram-negativnih bakterija ovaj fenomen široko je rasprostranjen; svaka vrsta koja koristi ovakav tip regulacije sintetise specifičan tip signalnih molekula - laktoni sa acilovanim homoserinom (acyl homoserine lactone - ACH) koji služe za regulaciju QS. Prisustvo peptidnog signalnog puta koji uključuje proizvodnju malih cikličnih ili linearnih peptida potvrđeno je kod Gram-pozitivnih vrsta (Rutherford i Bassler, 2012). Signalni molekuli slobodno difunduju van ćelije i u slučaju optimalnog broja ćelija koje ih produkuju, postiže se dovoljna koncentracija u spoljašnjoj sredini. Ovo je najava događaja koji u kombinaciji sa specifičnim proteinom aktiviraju transkripciju specifičnih gena (Kalia, 2013). Gram-negativna bakterija *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 često je korišćena kao model sistem za proučavanje mehanizama detekcije kvoruma, kao i mogućnosti inhibicije komunikacije putem različitih ekstrakata/jedinjenja prirodnog porekla – tzv. anti-quorum sensing (anti - QS) aktivnost (Karatuna i Yagci, 2010; Rutherford i Bassler, 2012). Ova vrsta je kosmopolitskog rasprostranjenja i glavni uzročnik sepse kod imunokompromitovanih pacijenata, pacijenata sa opekotinama i novorođenčadi, dok kod imunokompetentnih individua retko izaziva simptome oboljenja. Učestali je oportunistički patogen kod obolelih od cistične fibroze jer se lako adaptira

na uslove koji su prisutni u plućima i u visokom stepenu uzrokuje smrtne ishode (Antunes i dr., 2010; Karatuna i Yagci, 2010). Nakon kolonizacije pluća, ova vrsta ispoljava tzv. mukoidni fenotip i produkuje znatne količine mukusa (Van Baarlen i dr., 2007).



Slika 5. Prikaz Quorum sensing regulacije (slika preuzeta <http://schaechter.asmblog.org>)

U mukoidnom stadijumu *Pseudomonas aeruginosa* povećana je i stopa mutacija kroz ceo genom, naročito u regionima koji su odgovorni za patogenost. Virulentni faktori koji su neophodni za akutnu infekciju negativno su selekcionisani u izolatima koji su uzročnici hroničnih infekcija, pa su sojevi izolovani iz pluća obolelih od cistične fibroze nakon 8 godina genetički drugačiji od originalnih sojeva koji su izvršili akutnu infekciju (Van Baarlen i dr., 2007). *P. aeruginosa* poseduje flagele i tip IV pile za olakšano prijanjanje za podlogu, pokretljivost i kolonizaciju. Ova bakterija izlučuje i endotoksine, egzotoksine i mukozni egzopolisaharid alginat kao faktore virulentnosti. Regulacija ekspresije >353 gena (~ 6% genoma) *P. aeruginosa* je pod kontrolom stimulusa iz spoljašnje sredine kako bi bakterija u datom trenutku adekvatno reagovala (Zhao i dr., 2014). Bakterija koja sintetiše toksin kao faktor virulencije, shodno tome, nema nikakvog efekta kao pojedinačna ćelija, pa bi produkcija toksina od strane te ćelije bila gubitak resursa. Nasuprot tome, ako je prisutan dovoljno veliki broj ćelija, koordinisanom ekspresijom gena za sintezu toksina, može se uspešno započeti kolonizacija domaćina izazivajući simptome bolesti (Madigan i Martinko, 2006).

Biofilm je struktura koju čini agregat mikroorganizama uronjenih u matriks ekstracelularnih polimernih supstanci (polisaharida, proteina, nukleinskih kiselina i lipida) i može se formirati na podlogama organskog i neorganskog porekla (Van Baarlen i dr., 2007).

Njegovo formiranje u tesnoj je vezi sa gustom populacije tj. QS regulacija ima važnu ulogu u formiranju biofilma (Chow i dr., 2011). Kada gustina populacije postane optimalna, QS sistem aktivira ekspresiju velikog broja nesrodnih gena, a produkti ovih gena omogućuju tranziciju slobodnoživećih jedinki bakterija u biofilm (Toole i dr., 2000). Prema navodima Kalia (2013) biofilm pruža bakterijama zaštitu od odbrambenog sistema domaćina i antimikrobnih agenasa (navodi se čak 1000 puta veća otpornost na antibiotike i teške metale). Kada nutritivni uslovi postanu ograničavajući, bakterijske ćelije se oslobodaju iz biofilma i ulaze u planktonsku fazu, koja im omogućava da kolonizuju nove supstrate (Abdallah i dr., 2014). Za kolonizaciju je od ključne važnosti sposobnost bakterije da se kreće, pa vrste poseduju različite tipove kretanja u zavisnosti od uslova u kojima se nalaze: (1) „swarming“, (2) „swimming“, (3) „twitching“, (4) „gliding“ i (5) „sliding“ (Kearns, 2011). Kretanje označeno kao „swarming“ je brzo kretanje velikog broja bakterija po podlozi koje se odvija pomoću rotirajuće flagele. Mnoge bakterije koje koriste „swarming“ sintetišu surfaktante (surface active agent - amfipatični molekuli) kojima smanjuju napon između površine i bakterijske ćelije kako bi kretanje preko površine bilo omogućeno. „Swimming“ je tip kretanja koje je omogućeno rotirajućom snagom flagele, ali se za razliku od „swarming“-a odnosi na kretanje individue u tečnoj sredini. „Twitching“ je tip kretanja bakterija koje je omogućeno ekstenzijom i retrakcijom pila tipa IV kojima se ostvaruje sporo kretanje ćelija koje izgleda kao trzanje. „Gliding“ ili klizanje je aktivno kretanje po površini koje se odvija duž uzdužne ose ćelije bez pomoći flagela ili pila. Smatra se da je ovaj tip kretanja evoluirao više puta nezavisno u različitim linijama. „Sliding“ je pasivna forma širenja preko podloge za koju nije potrebno prisustvo aktivnog pokretača, već se ovo kretanje oslanja na surfaktante koji redukuju površinski napon omogućavajući koloniji da se širi (Kearns, 2011; Melville i Craig, 2013). Poznavanje mehanizama kojima *P. aeruginosa* ostvaruje QS aktivnost od velikog je značaja kako bi se formirala nova strategija za ukaljanje ovog patogena. Supstance prirodnog porekla male molekulske mase i hemijski stabilne su idealni potencijalni inhibitori QS (Rasmussen i Givskov, 2006; Kalia, 2013). Makromicete proizvode niz jedinjenja koja odgovaraju ovim kriterijumima, pa predstavljaju i veliki potencijal kao izvori anti-QS agenasa.



Slika 6. Mehanizam formiranja biofilma: (1) prijanjanje za podlogu; (2) rast; (3) disperzija (slika preuzeta sa www.pinterest.com)

1.5. Biološki aktivna jedinjenja makromiceta

Ljudsko društvo je u kontinuiranoj potrazi za sirovinama koje produžavaju životni vek, poboljšavaju životne funkcije i kvalitet života. Značaj biljaka i gljiva sa medicinskim svojstvima je u ovom smislu nemeđljiv. Na ovu činjenicu ukazuje i podatak da blizu 80% ukupne svetske populacije koristi lekove poreklom iz prirode kao primarna lekovita sredstva (Tang i dr., 2008; Ekor, 2014). Zahvaljujući velikom tržištu, proizvodnja komercijalno dostupnih preparata od sirovina prirodnog porekla postala je unosna industrijska grana tokom poslednje dve decenije. Podaci iz 1990. godine ukazuju da je u SAD prodaja suplemenata iznosila 3,3 milijardi dolara, a 2000. godine, čak 14,0 milijardi dolara (Chang i Miles, 2004). Makromicete su važan izvor različitih bioaktivnih jedinjenja (polisaharida, lektina, terpenoida, peptida, proteina i dr.) koja imaju perspektivu u farmaciji i biotehnologiji (Chang i Miles, 2004; Zjawiony, 2004; Stajić, 2015).

Najjednostavnija klasifikacija biološki aktivnih jedinjenja vrši se prema kriterijumu molekulske mase na jedinjenja male i jedinjenja velike molekulske mase. U grupu jedinjenja male molekulske mase ubrajaju se uglavnom sekundarni metaboliti čiji mehanizam delovanja često nije poznat: terpenoidi, steroidi, derivati antrahinona i benzojeve kiseline i dr., ali i neki primarni kao što je oksalna kiselina. Polisaharidi, lektini, peptidi i proteini čine drugu grupu jedinjenja čiji je mehanizam delovanja poznat u izolovanim slučajevima - proteini vrše ribozomalnu inaktivaciju dok polisaharidi imaju sposobnost imunomodulacije i dr. (Ng, 2004; Aida i dr., 2009; Alves i dr., 2012b).

1.5.1. Jedinjenja male molekulske mase

Jedinjenja male molekulske mase uključuju uglavnom sekundarne metabolite, kao što su terpeni i terpenoidi, steroidi, derivati benzoeve kiseline, ali i neke primarne metabolite kao što je oksalna kiselina.

1.5.1.1. Terpeni i terpenoidi

Terpeni su grupa jedinjenja raznovrsne strukture u osnovi izgrađena od izoprenskih jedinica, dok su terpenoidi modifikovani terpeni specifični za makromicete (Stajić, 2015). Ovo je raznovrsna grupa organskih jedinjenja sa nizom bioloških aktivnosti među kojima se ističu antitumorska, antimikrobna, antiinflamatorna i dr. (Duru i Çayan, 2015). Poznato je da su bazidiokarpi testiranih vrsta makromiceta značajan izvor terpenoidnih jedinjenja. U bazidiokarpu *L. sulphureus* identifikovani su seskviterpenoidi drimanskog (sulfureuin B-H) i iludinskog (sulfureuin A) tipa kao i lanostani triterpen 3-oksosulfurenska kiselina (Léon i dr., 2004; Ríos i dr., 2012; He i dr., 2015a; He i dr., 2015b; Zhang i dr., 2015). Pored navedenih, iz plodonosnih tela iste vrste su izolovani i sledeći triterpeni: eburikoična, acetil-eburikoična, sulfurenska, acil-trametenolična i 15 α -hidroksimetenolična kiselina, kao i izoprenoid ubihinon Q936 (Radić i dr., 2009). Faridur i dr. (2010) su naveli da je *P. ostreatus* bogat terpenoidnim jedinjenjima, a Mohamed i Farghaly (2014) su potvrdili ove navode identifikujući 4 terpenoidna jedinjenja kod bukovače.

1.5.1.2. Ostala biološki aktivna jedinjenja

Najznačajnija steroidna jedinjenja makromiceta su i gradivni elementi njihove ćelijske membrane. Ergosterol i derivati ergosterola (ergosterol peroksid i cerevisterol) izolovani su iz bazidiokarpa *A. aegerita* i *L. sulphureus* (Diyabalanage i dr., 2008; Ericsson i Ivonne, 2009; Krzycykowski i dr., 2009; Radić i dr., 2009). Pored ergosterola i njegovih derivata, iz bazidiokarpa makromiceta izolovan je niz drugih jedinjenja male molekulske mase. Tako Yoshikawa i dr. (2001) navode da je bazidiokarp *L. sulphureus* izvor, za nauku do tada nepoznatog, benzofuranskog glikozida (masutakeside I) i C10 acetilenične kiseline (masutakična kiselina), dok Radić i dr. (2009) ukazuju na prisustvo: egonola, demetoksiegonola, egonol glukozida i egonol genciobiozida. Proučavana vrsta koja je prepoznatljiva po karakterističnoj žuto-narandžastoj boji plodonosnih tela proizvodi i nekoliko nekarotenoidnih polienskih

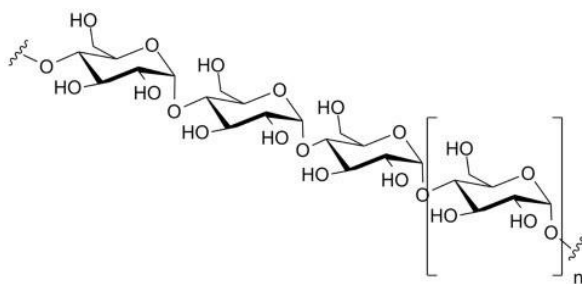
pigmenata: letipornu kiselinu A (glavni pigment), 2-dehidro-3-deoksiletipornu kiselinu, letipornu kiselinu B i C (Radić i dr., 2009). Ovi pigmenti su hemijski stabilna jedinjenja koja mogu imati primenu u prehrambenoj industriji ukoliko zadovolje norme o bezbednosti (Weber i dr., 2004; Davoli i dr., 2005). Mnogobrojni su i rezultati hemijske analize ekonomski važne vrste *P. ostreatus* (Patel i dr., 2012a; Deepalakshmi i Mirunalini, 2014). Alves i dr. (2013a) su iz bazidiokarpa komercijalnog soja *P. ostreatus* izolovali niz jedinjenja male molekulske mase (*p*-hidroksibenzoevu kiselinu, protokatehinsku kiselinu, galnu kiselinu, *p*-kumarnu kiselinu, ferulnu kiselinu, rutin i hrizin) i studirali njihov antimikrobni potencijal. Mohamed i Farghaly (2014) su uporednom analizom ekstrakata svežeg i suvog bazidiokarpa *P. ostreatus* dokazali prisustvo 2 kiseline, 5 alkohola, 27 alkana, 3 amida, 27 estara, 8 masnih kiselina, 29 heterocikličnih jedinjenja i 2 fenola. Poliketid lovastatin (mevinolin) koji je izolovan iz nekoliko vrsta roda *Pleurotus* izvanredan je antihiperholesterolni agens, Mevacor kompanije Merck, komercijalno dostupan još od 1987. Pored lovostatina izolovan je niz srodnih jedinjenja sličnog efekta (Wasser i Weis 1999; Stachowiak i Regula, 2012).

1.5.2. Jedinjenja velike molekulske mase

U jedinjenja velike molekulske mase se ubrajaju najčešće: proteini, lektini, polisaharidi i nukleinske kiseline.

1.5.2.1. Polisaharidi

Makromicete produkuju veliki broj polisaharida koji su prema literaturnim podacima moćni imunomodulatori i antioksidansi (Vanucci i dr., 2013; Stajić, 2015). Izgrađeni su od monosaharida povezanih glikozidnim vezama, pri čemu formiraju linearne ili granate strukture koje određuju stepen njihove biološke aktivnosti (Synytsya i dr., 2013). Smatra se da polisaharidi velike molekulske mase imaju više vezujućih mesta za proteine ili receptore zbog čega pokazuju viši stepen antitumorske aktivnosti. Antitumorsku aktivnost polisaharidi mogu ispoljiti direktno u interakciji sa tumorskim ćelijama ili indirektno, putem modulacije imunog sistema kroz aktivaciju efektorskih ćelija: makrofaga, T-limfocita, B-limfocita i ćelija ubica (Meng i dr., 2016).



Slika 7. Struktura disaharida (slika preuzeta sa <http://www.realmushrooms.com/>)

Iz bazidiokarpa *A. aegerita* izolovan je glukan koji u kombinaciji sa hemioterapijom reguliše imunološke funkcije menjajući aktivnost citokina i predstavlja perspektivan farmakološki agens kao i linearni α -(1-3)-glukan (Ji i dr., 2013; Mizuno i Nishitani, 2013). Letiporan A (56 kDa) izolovan iz bazidiokarpa *L. sulphureus* je β -1,3-glukan koji sadrži ostatke manoze, galaktoze, fukoze, ksiloze i ramnoze ima izraženu antioksidativnu aktivnost (Oleennikov i dr., 2009a). Pored navedenih iz bazidiokarpa su izolovani i galaktomanoglukan i latiglukan kao i 2 heteropolisaharida, dok su iz micelije ove vrste ekstrahovani polisaharidi koji imaju antihiperглиkemijsku aktivnost što se može iskoristiti u farmaceutskoj industriji posebno jer je kultivacija *L. sulphureus* uspešna (Alquini i dr., 2004; Hwang i dr., 2008; Oleennikov i dr., 2009b; Hwang i Yun 2010). Pleuran izolovan iz bazidiokarpa *P. ostreatus* ima imunomodulatorni i antitumorski potencijal, dok polisaharidne frakcije PSPO-1a i PSPO-4a i polisaharid-proteinski kompleks POPPS (33 kDa) pokazuju značajan antioksidativni kapacitet (Xia i dr., 2011; Majtan, 2012; Deepalakshmi i Mirunalini, 2014). Komercijalno gajeni *P. ostreatus* važan je izvor β -glukana sa prebiotičkim delovanjem (Synytsya i dr., 2009). Malobrojni podaci o sadržaju i karakterizaciji polisaharida u bazidiokarpima *Polyporus squamosus* ukazuju na prisustvo fukomanogalaktana (Kardošová i dr., 1969).

1.5.2.2. Peptidi i proteini

Peptidi i proteini koje produkuju makromicete imaju veliki farmaceutski potencijal jer deluju imunomodulatorno i antimikrobno, dok neki efikasno inhibiraju sintezu proteina u ribozomima (Ng, 2004; Valverde i dr., 2015). Iz bazidiokarpa *A. aegerita* izolovani su protein agrocibenin (9 kDa) koji ima antifungalnu aktivnost i cilindin koji je nosilac antitumorske aktivnosti (Karaman i dr., 2014). Iz neutralne lipidne frakcije lipidnog ekstrakta micelije *L. sulphureus* izolovan je peptid beauvericin koji je nosilac insekticidne aktivnosti (Deol, 1978; Radić i dr., 2009). Za peptid pleurostrin (~ 7 kDa) koji je izolovan iz bazidiokarpa *P. ostreatus*

potvrđeno je da inhibira rast fitopatogena *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* i *Physalospora piricola* (Chu i dr., 2005). Wang i Ng (2000) su naveli da glikoprotein nalik ubikvitinu (~ 12.5 kDa) izolovan iz bazidiokarpa *P. ostreatus* ima izraženu anti-HIV aktivnost, dok hemolizin, izolovan iz iste vrste, ima antimikrobnu aktivnost (Mohamed i Farghaly, 2014).

1.5.2.3. Lektini

Lektini su proteini neimunog porekla koji se vezuju specifično i reverzibilno za ugljene hidrate i druge glikozilovane strukture (Guillot i Kanska, 1997; Varrot i dr., 2013). Termin lektin potiče od latinske reči „legere“, što znači izabrati, a odnosi se na sposobnost lektina da „biraju“ jedan ili više ugljenih hidrata za koji su specifični (Dhamodharan i Nadu, 2011). Lektini posreduju u ćelijskoj signalizaciji, diferencijaciji, interakciji domaćin-patogen i metastazi tkiva. Takođe, posreduju u procesu prepoznavanja domaćina prilikom ektomikorizne simbioze dok kod kvasaca učestvuju u flokulaciji (Varrot, 2013). Podaci Singh i dr. (2015a) ukazuju da je opisano 336 lektina iz makromiceta, od čega je čak 144 iz jestivih, 38 iz otrovnih, a 20 su poreklom od vrsta koje se koriste i u nutritivne i u medicinske svrhe. Prinos lektina iz svežih plodonosnih tela gljiva je najčešće nizak ~ 2,6 mg/100 g kod *Pleurocybella porrigens*, dok je znatno viši u suvim bazidiokarpima: 39 mg/100 g kod *Russula lepida*, 70 mg/100 g kod *Pholiota adiposa* i 15 mg/100 g kod *Inocybe umbrinella* (Lam i Ng, 2011). Zahvaljujući svojstvu da se vezuju za ugljene hidrate, lektini specifično interaguju i sa saharidnim receptorima na površini eritrocita vršeći njihovu aglutinaciju (slepljivanje) u reakciji hemaglutinacije što je ujedno i univerzalno prihvaćena metoda detekcije lektina (Rao i dr., 1994). Izolovani lektini su često multimerne građe (subjedinice povezane nekovalentnim vezama i disulfidnim mostovima), a retko su u obliku monomera. Neki mogu tolerisati izlaganje visokoj temperaturi i širokom opsegu pH vrednosti bez narušavanja strukture. Zahvaljujući visokoj specifičnosti prema ugljenim hidratima, lektini mogu identifikovati i diskretne varijacije u strukturi ugljenih hidrata na površini ćelija i tkiva koje karakterišu maligne ćelije, što ih čini nezamenljivim u studijama malignih oboljenja (Feng i dr., 2010).

Savremena istraživanja ukazuju da lektini poseduju: antiviralnu, hipotenzivnu, insekticidnu, vermucidnu, apoptotsku, imunomodulatornu/citotoksičnu/antiproliferativnu, kao i druge aktivnosti (Singh i dr., 2010; Akkouch i dr., 2015; Hassan i dr., 2015; Singh i dr., 2015a; Liu i dr., 2016). Tako su iz bazidiokarpa *A. aegerita* izolovani lektini AAL1 i AAL2, za koje je

potvrđeno da su nosioci antitumorske i antiviralne aktivnosti (Yang i dr., 2005; Yang i dr., 2009; Liang i dr., 2009; Zhu i Xie, 2011; Jiang i dr., 2012), a mogu delovati i hepatotoksično (Jin i dr., 2014). Lektini *L. sulphureus* su više puta opisani u literaturi i potvrđeno je da poseduju hemolitičku i hemaglutinacionu sposobnost (Tateno i Goldstein, 2003; Mancheño i dr., 2004; Mancheño i dr., 2005; Angulo i dr., 2011). Iz plodonosnog tela *P. ostreatus* izolovan je POL lektin citotoksičan za maligne ćelije pankreasa (MiaPaCa-2) humanog porekla (Conrad i Rudiger, 1994; Destefanis, 2015). Manna i dr. (2017) su iz *P. squamosus* izolovali PSL1 lektin citotoksičnog dejstva na kancerogene ćelije sisara, dok su Mo i dr.(2000) i Kadirvelraj i dr. (2011) iz plodonosnih tela iste vrste izolovali lektin koji, zahvaljujući visokoj specifičnosti prema neredukujućem šećeru, ima nezamenljivu ulogu u istraživanju i dijagnozi kancera.

1.6. Biološke aktivnosti makromiceta

Uprkos napretku savremene medicine i farmacije, komercijalni lekovi mogu prouzrokovati različite neželjene sporedne efekte i tokom vremena se na njih može razviti tolerancija (Moradali i dr., 2007; De Silva i dr., 2013) Suprotno tome, supstance prirodnog porekla obično deluju sinergistički putem više mehanizama, pa je manja i mogućnost razvoja rezistentnosti (Stojković i dr., 2013). Za makromicete je opisano čak 130 bioloških aktivnosti a najčešće se ističe njihov antitumorski, imunomodulatorni, antioksidativni, antihiperholesterolni, antihiperглиkemijski i antimikrobni potencijal (Wasser, 2014). Najveću efikasnost makromicete su pokazale u prevenciji i lečenju imunih poremećaja. Primenjuju se kao pomoćna terapija kod hemioterapije i terapije zračenjem, za stimulaciju imunog sistema kod obolelih od HIV i HSV virusa, kao i kod pacijenata koji boluju od neurodegenerativnih poremećaja (Roupas i dr., 2012; Wasser, 2014).

1.6.1. Imunomodulatorna aktivnost

Dosadašnji objavljeni podaci ukazuju da su ekstrakti i/ili jedinjenja (polisaharidi, peptidi, proteini, lipopolisaharidi, glikoproteini) izolovana iz gljiva moćni imunomodulatori koji menjaju biološki odgovor ćelija. Ukoliko stimulišu imuni odgovor (imunostimulatori), ova jedinjenja imaju potencijal u tretmanu malignih oboljenja, imunodeficientnih bolesti ili imunosupresije koja obično prati tretmane bilo kakvim lekovima. Ukoliko suprimiraju imuni odgovor (imunosupresivi), imaju potencijalnu primenu kod autoimunih oboljenja. Kakav će biološki odgovor jedinjenja imunomodulatora biti zavisi od doze, načina i učestalosti primene (oralno ili

parenteralno), kao i mehanizma ili mesta delovanja (Sullivan i dr., 2006; Stajić, 2015). Jesenak i dr. (2013; 2014) su saopštili da je nosilac imunomodulatorne aktivnosti *P. ostreatus* glukan pleuran koji je efikasno delovao u grupi od 175 dece sa rekurentnim respiratornim infekcijama smanjujući učestalost simptoma gripa, a delovao je i antialergijski. Da su glukani izolovani iz *P. ostreatus* moćni *in vivo* imunostimulatori, saopštili su i Selegean i dr. (2009) koji su pokazali da primena polisaharidnih frakcija značajno pospešuje lečenje burzalne bolesti pernatih životinja uzrokovane virusom. Sirovi ekstrakti plodonosnih tela takođe mogu delovati imunomodulatorno, pa je tako etanolni ekstrakt bazidiokarpa *P. squamosus* povećao aktivnost fagocita za čak 141% i može se smatrati perspektivnim imunostimulatornim agensom (Doskočil i dr., 2016). Nasuprot tome, Babakhin (1999) je naveo snažnu imunosupresivnu aktivnost ekstrakta micelije *P. squamosus* koja se ogledala u *in vitro* inhibiciji proliferacije humanih mononuklearnih ćelija.

1.6.2. Antitumorska aktivnost

Različiti tipovi malignih oboljenja predstavljaju drugi uzročnik smrtnih ishoda humane populacije (Wasser, 2011). Citostatici koji se koriste za lečenje ovih oboljenja nisu dovoljno efikasni, a uzrokuju i niz nus-pojava kod pacijenata (Moradali i dr., 2007). U medicini zemalja Dalekog istoka, lekovite gljive u upotrebi su hiljadama godina za lečenje različitih oboljenja, a poslednjih decenija se jednako uspešno koriste i u zemljama zapadne hemisfere (Wright, 2004; Tang i dr., 2008; Devi i Krishnakumari, 2015). Prema navodima Wasser (2002; 2003), polisaharidi različite strukture i tipova grananja izolovani iz makromiceta su najefikasniji antitumorski agensi (β -glukani su biološki najaktivniji). Struktura, molekulska masa, stepen grananja, različita fizička svojstva su samo neki od faktora koji utiču na njihovu biološku aktivnost (Stajić, 2015). Pored polisaharida, nosioci antitumorske aktivnosti mogu biti terpenoidi, lektini i dr. Ova jedinjenja interaguju sa specifičnim unutarćelijskim signalnim putevima koji su vezani za inflamaciju, ćelijsku diferencijaciju, apoptozu, angiogenezu, progresiju i metastaziranje tumora (Petrova, 2012). Polisaharidi izolovani iz micelije *P. ostreatus* pozitivno deluju na ćelije kancera želuca u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Cao i dr., 2015), dok lektini AAL i PSL (iz *A. aegerita* i *P. squamosus*) imaju citotoksični efekat na maligne ćelije sisara (Zhao i dr., 2003; Manna i dr., 2017). Među terpenoidima, ističe se apoptotska aktivnost seskviterpenoida sulfureuina B izolovanog iz bazidiokarpa *L. sulphureus* na ćelije glioma (Zhang i dr., 2015). Različiti ekstrakti bazidiokarpa makromiceta mogu biti jednako efikasni

antitumorski agensi kao i čista jedinjenja - vodeni ekstrakt bazidiokarpa *P. ostreatus* efikasno indukuje *in vitro* apoptozu malignih ćelija debelog creva (Arora i dr., 2015).

1.6.3. Antioksidativna aktivnost

Niz studija ukazuje na visok *in vitro* antioksidativni potencijal metanolnog, etanolnog, vodenog, cikloheksanskog, dihlorometanskog, polisaharidnog ekstrakta makromiceta (Turkoglu i dr., 2006; Jayakumar i dr., 2009; Novaković i dr., 2012; Klaus i dr., 2013; Karaman i dr., 2014). Nosiocima antioksidativne aktivnosti makromiceta smatraju se pre svega: fenolna jedinjenja (fenolne kiseline: *p*-kumarna, *p*-hidroksibenzoeva, cinamična), tokoferoli (α , β , γ i δ), proste organske kiseline (oksalna, jabučna i fumarna), polisaharidi (pleuran kod *P. ostreatus*) (Bobek i Galbavý, 2001; Barros i dr., 2007b; Heleno i dr., 2010; Deepalakshmi i dr., 2014). Prema navodima Stajić i dr. (2013) peptidi, proteini, karotenoidi, alkaloidi i nukleotidi izolovani iz makromiceta su takođe pokazali značajan antioksidativni kapacitet.

1.6.4. Antihiperholesterolna aktivnost

Hiperholesterolemija (hiperlipidemija) predstavlja povišen nivo holesterola u krvi i tesno je povezana sa kardiovaskularnim oboljenjima. Ishrana i način života smatraju se presudnim za ublažavanje simptoma oboljenja (De Silva i dr., 2013). Jedinjenja i ekstrakti makromiceta mogu efikasno regulisati nivo holesterola u krvi. Poliketid lovastatin izolovan iz nekoliko vrsta roda *Pleurotus* komercijalno je dostupan i veoma efikasan antihiperholesterolni lek, a dosadašnji objavljeni podaci su pokazali da i konzumiranje praha/ekstrakta bazidiokarpa *P. ostreatus* može efikasno regulisati nivo LDL holesterola za 55% i triglicerida za 34% kod eksperimentalnih životinja (Wasser, 2004; Alam i dr., 2011; Anandhi i dr., 2013; Hossain i dr., 2003). Konzumiranje ekstrakata micelije takođe može imati antihiperholesterolni efekat. Tako je vodeni ekstrakt micelije *L. sulphureus* značajno smanjio nivo holesterola kod eksperimentalnih životinja kod kojih je poremećeni status holesterola povezan sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom (Hwang i dr., 2010).

1.6.5. Antihiperglikemijska aktivnost

Dijabetes je hronični, metabolički poremećaj koji nastaje zbog nedostatka lučenja insulina ili insulinske rezistentnosti što ima za posledicu povišen nivo glukoze u krvi i tokom vremena vodi ozbiljnim oštećenjima srca i krvnih sudova, bubrega i drugih organa (ADA, 2008).

U lečenju ovog poremećaja, veliki značaj mogu imati makromicete kao značajan izvor jedinjenja sa antihiperглиkemijskim svojstvima: polisaharida, proteina, dijetetskih vlakana i dr. (De Silva i dr., 2012). Polisaharidi izolovani iz micelije *L. sulphureus* efikasno regulišu nivo glukoze kod eksperimentalnih životinja nakon oralnog konzumiranja, dok etanolni ekstrakt bazidiokarpa *P. ostreatus* značajno redukuje nivo glukoze u serumu nakon 15 dana tretmana (Hwang i Yun, 2010; Ravi i dr., 2013). Dokazano je da čak i konzumiranje usitnjenog praha liofilizovanog bazidiokarpa *P. ostreatus* značajno redukuje postprandijalni nivo glukoze kod zdravih i obolelih od dijabetesa tipa 2 (Choudhury i Rahman, 2013; Banukie i dr., 2015). Jayasuria i dr. (2012) potvrdili su *in vivo* hipoglikemijsko dejstvo praha bazidiokarpa *P. ostreatus* nakon oralne aplikacije sa maksimalnom efikasnom dozom 500 mg/kg. Mehanizmi kojima se ostvaruje antihiperглиkemijska aktivnost su brojni, pa tako polisaharidi učestvuju u regeneraciji i proliferaciji β ćelija pankreasa koje su odgovorne za lučenje insulina (Hwang i Yun, 2010), dok dijetetska vlakna prolaze nesvarena kroz digestivni trakt i ne utiču na povećanje nivoa glukoze u krvi.

1.6.6. Antimikrobna aktivnost

Makromicete mogu biti izvor jedinjenja koja imaju antimikrobna svojstva, a eksperimentalno je dokazano da su i sirovi ekstrakti jednako efikasni u eradikaciji patogena (Barros, 2007c; Alves i dr., 2012a; 2012b; Alves i dr., 2013a; 2013b). Do sada objavljeni rezultati pokazali su da je bazidiokarp *P. ostreatus* bogat nizom jedinjenja sa antimikrobnim svojstvima. Alves i dr. (2013a) i Baraza i dr. (2016) navode da su *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarna, protokatehinska, galna i ferulna kiselina, rutin, hrizin i kumarini nosioci antimikrobne aktivnosti, dok Meza-Menchaca i dr. (2015) navode da je ergosterol-peroksid nosilac amebicidne aktivnosti. Izlaganjem bakterija subinhibitornim koncentracijama aktivnog ekstrakta i/ili jedinjenja moguće je ometati komunikaciju bakterijskih ćelija, sprečiti kolonizaciju domaćina i formiranje biofilma, pa je važno istaći anti-QS aktivnost kao novu strategiju uklanjanja patogenih mikroorganizama (Kalia, 2013; Alves i dr., 2014). Testirane makromicete su pokazale antiviralnu aktivnost i u ovom pogledu se ističe aktivnost metanolnog i dihlrometanskog ekstrakta plodonosnih tela *L. sulphureus* koji su efikasno inhibirali enzim reverznu transkriptazu HIV virusa za čak 90,1% (Mlinarić i dr., 2005), kao i dejstvo vodenog ekstrakta bazidiokarpa *P. ostreatus* koji je inhibirao *in vitro* replikaciju *Herpes simplex* virusa tip 1

(Santoyo i dr., 2012). Antiparazitski efekat ostvarili su metanolni i vodeni ekstrakt *P. ostreatus* na kokcidiju pernatih životinja (Ullah i dr., 2015).

1.6.7. Druge aktivnosti: antiinflamatorna, analgetska, antihistaminska i prebiotička

Triterpensko jedinjenje acetil-eburikoična kiselina izolovano iz bazidiokarpa *L. sulphureus* suprimira produkciju proinflamatornih citokina i smatra se nosiocem antiinflamatorne aktivnosti (Saba i dr., 2015). Ova kiselina je pokazala i znatnu *in vivo* gastroprotektivnu aktivnost na čir želuca kod eksperimentalnih životinja umanjivanjem dejstva H^+ - K^+ ATP-aze kao i zaštitom mukoze želuca od oštećenja (Wang i dr., 2015). Jedinak i dr. (2011) su saopštili da i koncentrat *P. ostreatus* deluje antiinflamatorno kod eksperimentalnih životinja. Konzumiranje usitnjenog praha liofilizovanog bazidiokarpa *P. ostreatus* je pokazalo analgetsku aktivnost pri dozama od 125, 500 i 1000 mg/kg, i znatno povećalo vreme reagovanja eksperimentalnih životinja na toplotni stres (kod mužjak do 1 h, a ženki do 2 h), a efekat je zavisio od primenjene doze. Ekstrakt iste vrste je pri testiranim dozama pokazao i antihistaminsku i umerenu antioksidativnu aktivnost bez toksičnih efekata (Vasudewa i dr., 2007). Glamočlija i Soković (2017) navode da je analgetsko dejstvo makromiceta poznato i za druge vrste makromiceta, uključujući *Agaricus brasiliensis*, *A. macrosporus*, *Lactarius rufus*. Aida i dr. (2009) su saopštili da su makromicete veoma važan izvor dijetetskih vlakana koja su značajni kandidati za prebiotike jer menjaju sastav gastrointestinalne mikrobiote.

2. Ciljevi istraživanja

Na osnovu svega do sada predstavljenog o nutritivnoj vrednosti, hemijskom sastavu i biološkim aktivnostima makromiceta, za proučavanje je izabrano četiri vrste: *Agrocybe aegerita*, *Laetiporus sulphureus*, *Polyporus squamosus* i *Pleurotus ostreatus* poreklom sa teritorije Srbije i postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- određivanje nutritivne vrednosti plodonosnih tela;
- analiza hemijskog sastava odabranih metabolita: karakterizacija odabranih šećera, tokoferola, prostih organskih, fenolnih i masnih kiselina iz testiranih makromiceta i izolacija i karakterizacija lektina iz bazidiokarpa *L. sulphureus*;
- utvrđivanje bioloških aktivnosti ekstrakata plodonosnih tela:
 - antioksidativna aktivnost
 - antimikrobna i anti-QS aktivnost
 - citotoksična aktivnost na odabrane tumorske ćelijske linije humanog porekla (MCF-7, NCI-H460, HeLa, HepG2) i netumorske ćelije svinjske jetre (PLP2).

3. Materijal i metode

3.1. Testirane makromicete

Plodonosna tela makromiceta su sakupljana sa različitih lokaliteta u Republici Srbiji. Identifikacije su urađene na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika plodonosnog tela poređenjem sa ključevima za identifikaciju gljiva (Phillips, 2006). Eksikati su deponovani u kolekciji gljiva Mikološke laboratorije, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Sveža plodonosna tela su nakon identifikacije zamrznuta na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, liofilizovana (LH Leybold, Lyovac GT2, Frankendorf, Switzerland), usitnjena i homogenizovana u laboratorijskom blenderu i skladištena na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2. Priprema ekstrakata

Za ispitivanje potencijalne antimikrobne i anti-QS aktivnosti korišćeni su metanolni (ME), etanolni (EE) i vodeni (VE) ekstrakti plodonosnih tela. Ekstrakti su pripremljeni prema opisanim procedurama za navedene rastvarače (Cheng i dr., 2008; Vaz i dr., 2010; Vamanu i Nita, 2013).

3.2.1. Priprema metanolnog ekstrakta

Prema metodi Vaz i dr. (2010) ~ 10 g homogenizovanog plodonosnog tela je korišćeno za ekstrakciju sa 240 mL metanola preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon toga je ekstrakt sonifikovan 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin sonorex, Berlin, Germany) i centrifugiran 10 minuta na 4000 g (Heraeus biofuge stratos centrifuge, Thermo electron corporation, MA, USA) na temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ekstrakt je filtriran kroz Whatman No. 4 filter papir, a talog je reekstrahovan u ultrazvučnom kupatilu tri puta sa po 100 mL metanola. Kombinovani supernatant je uparen do suvog ostatka na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ korišćenjem rotacionog vakuum uparivača (Büchi R-210). Uzorak je skladišten na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

3.2.2. Priprema etanolnog ekstrakta

Prema metodi Cheng i dr. (2008) ~ 10 g homogenizovanog plodonosnog tela je korišćeno za ekstrakciju sa 340 mL destilovane vode tokom 2 h na magnetnoj mešalici (Velp Scientifica, SRL, Italy). Ekstrakt je filtriran kroz papir Whatman No. 4, a talog reekstrahovan još dva puta sa ukupno 340 mL proključale destilovane vode tokom 2 h. Kombinovani supernatanti su zamrznuti

na -20 °C, liofilizovani (LH Leybold, Lyovac GT2, Frankendorf, Switzerland), nakon čega je liofilizatu dodato 70 mL 95% etanola radi prekončne precipitacije polisaharida na 4 °C. Precipitirani polisaharidi su sakupljeni centrifugiranjem na 3100 g tokom 40 minuta pri temperaturi 4 °C, nakon čega je uzorak ponovo filtriran kroz Whatman No. 4 filter papir. Dobijeni supernatant koji predstavlja etanolni ekstrakt je uparen na 40 °C do suvog ostatka korišćenjem rotacionog vakuuma uparivača (Büchi R-210). Uzorak je skladišten na 4 °C do dalje upotrebe.

3.2.3. Priprema vodenog ekstrakta

Prema metodi Vamanu i Nita (2013) ~ 10 g homogenizovanog plodonosnog tela je korišćeno za ekstrakciju sa 200 mL destilovane vode tokom 1,5 h u ultrazvučnom kupatilu (Bandelin sonorex, Berlin, Germany), na sobnoj temperaturi (22 °C). Ekstrakt je filtriran kroz filter papir Whatman No. 4, nakon čega je talog reekstrahovan još dva puta sa ukupno 400 mL destilovane vode tokom 1,5 h. Kombinovani vodeni ekstrakt je zamrznut na -20 °C, a zatim liofilizovan (LH Leybold, Lyovac GT2, Frankendorf, Switzerland). Uzorak je skladišten na 4°C do dalje upotrebe.

3.3. Hemijska analiza bazidiokarpa testiranih makromiceta

U okviru ovog odeljka su predstavljene metode za određivanje nutritivne vrednosti, kao i identifikaciju šećera, tokoferola, prostih organskih, fenolnih i masnih kiselina iz testiranih makromiceta.

3.3.1. Određivanje nutritivne vrednosti

Hemijska analiza je izvedena prema procedurama koje preporučuje Asocijacija Analitičkih Hemičara (Association of Official Analitical Chemists - AOAC). Određen je ukupni sadržaj: proteina, masti, ugljenih hidrata, pepela, kao i energetska vrednost u bazidiokarpima testiranih makromiceta (AOAC, 1995).

3.3.1.1. Ukupni sadržaj proteina

Ukupni sadržaj proteina u bazidiokarpu određen je metodom po Kjeldalu kojom se određuje ukupni sadržaj organskog azota. Metoda uključuje digestiju organske materije, destilaciju amonijaka i titraciju sumpornom kiselinom. Digestija organske materije je započeta

mešanjem praha gljive (0,50 g) sa katalizirajućim agensom $K_2SO_4/CuSO_4$ (14,15 g) i 99% H_2SO_4 (25 mL) u balonu po Kjeldalu. Smeša je inkubirana u digestoru na 150 °C tokom 3 h do potpunog razlaganja organskih materija. Azot poreklom od proteina iz uzorka je u obliku soli amonijum sulfata, a dodavanjem male količine NaOH soli su prevedene u amonijak. Amonijak je zatim zagrevan i destilovan u destilatoru (Büchi Distillation Unit k-350, Flawil, Switzerland) čime je započeta druga faza. Nakon hlađenja, bazna para (poreklom od amonijaka) je sakupljena u sud koji je sadržao sumpornu kiselinu (N/10, 500 mL) i nekoliko kapi metil-crvene indikatorske boje. U ovom stadijumu, amonijak je ponovo prešao u soli amonijum sulfata uz prisustvo sumporne kiseline u višku. Potom je usledila titracija rastvorom NaOH (N/10) do kolorimetrijske tačke prekida (promene boje indikatora). Vrednost ukupnog sadržaja proteina izražena je u g/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete.

3.3.1.2. Ukupni sadržaj masti

Radi određivanja ukupnog sadržaja masti od bazidiokarpa je pripremljen petroleumski ekstrakt u Soksletovom aparatu, nakon čega je rastvarač uklonjen vakuum uparivačem R210 (Büchi, Flawil, Switzerland). Nakon dostizanja sobne temperature, sadržaj masti je izmeren u suvom ostatku i izražen u g/100 g suve mase bazidiokarpa makromicete.

3.3.1.3. Ukupni sadržaj pepela

Sadržaj pepela bazidiokarpa određen je na sledeći način: odmereni uzorak bazidiokarpa (0,30 g) je u porcelanskoj posudi izložen temperaturi od 550 °C do potpunog sagorevanja u pećnici (Lenton ECF 12/22, Hope Valley, UK). Nakon uklanjanja vlage u desikatoru i postizanja sobne temperature (~ 22 °C), izmeren je ponovo sadržaj posude. Sadržaj pepela je izračunat oduzimanjem ove vrednosti od početne izmerene vrednosti praha i izražen u g/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete.

3.3.1.4. Ukupni sadržaj ugljenih hidrata i energetska vrednost

Vrednost ukupnih ugljenih hidrata izražena je u g/100 g suve mase i dobijena je korišćenjem obrasca prema Manzi i dr. (2004):

$$\text{Ukupni sadržaj ugljenih hidrata} = 100 - (\text{sadržaj proteina} + \text{sadržaj masti} + \text{sadržaj pepela})$$

Energetska vrednost (E) makromiceta izračunata je prema obrascu koji je odobren regulativom br. 1169 od strane Evropskog parlamenta i Saveta. Dobijene vrednosti su izražene u kcal/100 g suve mase bazidiokarpa:

$$E \text{ (kcal)} = 4 \times (g_{\text{proteina}} + g_{\text{ugljenih hidrata}}) + 9 \times (g_{\text{masti}})$$

3.3.2. Hemijska karakterizacija šećera

Sadržaj šećera je određen metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom uz detektor refrakcionog indeksa (High Pressure Liquid Chromatography - Refraction Index, HPLC-RI, Knauer, Smartlyne system 1000; Berlin, Germany) prema metodi Heleno i dr. (2009).

3.3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu šećera

Prah bazidiokarpa makromicete (~ 1 g) je ekstrahovan sa 40 mL 80% etanola na 80 °C tokom 30 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta na 15 000 g. Supernatant je koncentrovan na 60 °C pod smanjenim pritiskom i odmašćen ispiranjem tri puta sa po 10 mL etil-etra sa ciljem razdvajanja faza. Gornja faza je koncentrovana na 40 °C do suvog ostatka koji je rastvoren u vodi (5 mL), filtriran kroz jednokratne filtere 0,22 µm LC (Liquid Chromatography) i analiziran putem HPLC. Kao interni standard je korišćena rafinoza (IS, 5 mg/mL).

3.3.2.2. HPLC analiza šećera

Rastvori standarda šećera (10 mg/mL): L(+)-arabinoze, D(-)-fruktoze, L-fukoze, D(+)-galaktoze, anhidrovane D(+)-glukoze, laktoze-1-hidrat, maltoze-1-hidrat, maltuloze monohidrata, D(+)-manitola, D(+)-manoze, D(+)-melezitoze, D(+)-melibioze monohidrata, D(+)-rafinoze pentahidrata, L(+)-ramnoze monohidrata, D(+)-saharoze, D(+)-trehaloze, D(+)-turanoze i D(+)-ksiloze pripremljeni su u vodi i skladišteni na -20 °C. HPLC oprema za analizu je sadržala integrisani sistem sa Smartline pumpom 1000, sistem za degasiranje (Smartline manager 5000), detektor refrakcionog indeksa (2300 RI detektor; Knauer, Germany) i sistem za automatsko uzorkovanje (autosampler AS-2057; Jasco, Japan). Dobijeni podaci su analizirani programom Clarity 2.4 Software (DataApex). Efikasno hromatografsko razdvajanje postignuto je uz izokratsku eluciju kolonom Eurospher 100-5 NH₂ (4,6 mm × 250 mm × 5 mm, Knauer) na 35 °C (7971R Grace oven). Mobilna faza je sadržala smešu acetonitrila i dejonizovane vode u odnosu 7:3 (v/v), zapremina ubrizganog uzorka je iznosila 20 µL, a protok 1 mL/min. Šećeri su identifikovani poređenjem retencionih vremena pikova (RT – *retention time*) uzoraka sa

standardima, kvantifikovani metodom unutrašnjeg standarda, a dobijene vrednosti su izražene u g/100 g suve mase bazidiokarpa.

3.3.3. Hemijska karakterizacija tokoferola

Identifikacija i određivanje sadržaja 4 izoforme tokoferola (α -, β -, γ - i δ -tokoferol) je izvedeno po metodi koji su opisali Barros i dr. (2008b).

3.3.3.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu tokoferola

Za ekstrakciju tokoferola, prahu homogenizovanih plodonosnih tela dodato je 100 μ L rastvora butil-hidroksitoluena (10 mg/mL BHT) i internog standarda δ -tokoferola (rastvoren u heksanu, 50 μ g/mL) pre same analize. Rastvor BHT je dodat radi sprečavanja oksidacije tokoferola, a interni standard radi unapređenja preciznosti metode. Zatim su uzorci (~ 500 mg) homogenizovani sa metanolom (4 mL) tokom 60 sekundi na vorteksu. Nakon dodavanja 4 mL *n*-heksana, suspenzija je ponovo homogenizovana na vorteksu (1 minut), a zatim je dodat zasićeni vodeni rastvor NaCl (2 mL). Ova smeša je ponovo homogenizovana (1 minut), centrifugirana (5 min, 4000 g), a supernatant je odliven u odgovarajući sud (procedura je ponovljena još dva puta). Kombinovani supernatant je uparen u struji azota, a zatim rastvoren u 1 mL *n*-heksana. Uzorak je dehidriran anhidrovanim natrijum-sulfatom, filtriran kroz 0,22 μ m LC filtere (Liquid Chromatography), prebačen u tamni injekcioni špric, ubrizgan i analiziran na HPLC uređaju.

3.3.3.2. HPLC analiza tokoferola

Za analizu tokoferola u bazidiokarpima testiranih makromiceta su korišćeni pojedinačni štokovi rastvora α -, β - i γ -tokoferola pripremljeni u *n*-heksanu (5 mg/mL). Rastvori su skladišteni na -20 °C, zaštićeni od svetlosti, dok su radne koncentracije izoformi iznosile 10 μ g/mL. δ -Tokoferol je korišćen kao IS, a njegova radna koncentracija je iznosila 1,60 μ g/mL; rastvor je skladišten na -20 °C, zaštićen od svetlosti. HPLC oprema za analizu tokoferola sastojala se od integrisanog sistema sa Smartline pumpom 1000 (Knauer, Nemačka), sistema za degasiranje (Smartline manager 5000), sistema za automatsko uzorkovanje (autosampler) i UV detektora na 295 nm (Knauer, Nemačka), povezanih u nizu sa FP-2020 fluorescentnim detektorom (Jasco, Japan). Detektor je programiran za ekscitaciju na 290 nm i emisiju na 330 nm. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem programa Clarity 2.4 Software (DataApex). Hromatografsko razdvajanje je postignuto sa Poliamid II (250 \times 4,6 mm) kolonom normalne faze (YMC Waters,

Japan) na 30 °C (7971 R Grace oven). Mobilnu fazu je činila smeša *n*-heksana i etil-acetata (70:30, v/v) pri protoku 1 mL/min uz izokratsku eluciju, dok je ubrizgana zapremina iznosila 20 µL. Jedinjenja su identifikovana poređenjem RT sa standardima, a kvantifikacija uzorka je zasnovana na odgovoru signala fluorescencije. Kvantitativni sadržaj tokoferola u uzorcima je izražen u µg/100 g suve mase bazidiokarpa (Barros i dr., 2008b).

3.3.4. Hemijska karakterizacija organskih kiselina

U ovom odeljku su opisane metode za identifikaciju i kvantifikaciju prostih organskih kiselina, organskih kiselina sa fenolnom grupom (fenolnih kiselina) i masnih kiselina.

3.3.4.1. Hemijska analiza prostih organskih kiselina

Karakterizacija prostih organskih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta je izvedena prema metodi koju su opisali Barros i dr. (2013).

3.3.4.1.1. Priprema uzoraka za HPLC analizu prostih organskih kiselina

Organske kiseline su ekstrahovane iz uzorka makromicete (~ 2 g) sa 25 mL fosforne kiseline na magnetnoj mešalici tokom 45 minuta (na temperaturi ~ 25 °C), a potom filtriran kroz filter papir Whatman No. 4. Neposredno pre analize, uzorak je filtriran kroz 0,2 µm najlonski filter.

3.3.4.1.2. HPLC analiza prostih organskih kiselina

Organske kiseline su identifikovane ultra-brzom tečnom hromatografijom pomoću detektora niza fotodioda (Ultrafast Liquid Chromatography – Photodiode Array UFLC-PDA, Shimadzu 20 A serije; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Protok mobilne faze je iznosio 0,8 mL/min. Razdvajanje je postignuto na 35 °C na C₁₈ reverzno faznoj koloni (5 µm x 250 mm × 4,6 mm i.d.), dok je rastvaranje omogućeno prisustvom sumporne kiseline (H₂SO₄; 3,6 mM). Za detekciju je korišćen fotodiodni detektor, na 215 nm i 245 nm (za askorbinsku kiselinu). Sadržaj organskih kiselina je određen na osnovu površine pikova zabeleženih na 215 i 245 nm, korišćenjem kalibracionih krivih koje su dobijene za komercijalne standarde, pri čemu je vrednost koeficijenta korelacije R² za sve kalibracije bila iznad 0,99. Kvantitativni sadržaj organskih kiselina izražen je u g/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete.

3.3.4.2. Hemijska karakterizacija organskih kiselina sa fenolnom grupom (fenolnih kiselina)

Identifikacija i sadržaj fenolnih kiselina u bazidiokarpima testiranih vrsta makromiceta su određeni prema metodi koju su opisali Barros i dr. (2009).

3.3.4.2.1. Ekstrakcija fenolnih kiselina

Fenolne kiseline su ekstrahovane iz bazidiokarpa makromicete (~ 3 g) smešom 50 mL acetona i vode (80:20), na -20 °C tokom 6 h. Ekstrakt je zatim sonifikovan 15 minuta, centrifugiran 10 minuta na 4000 g i filtriran kroz filter papir Whatman No. 4. Precipitat je reekstrahovan tri puta smešom acetona i vode (3 x 50 mL), a zatim je kombinovani supernatant uparen (Büchi R-210) na 30 °C kako bi se uklonio aceton. Vodena faza je pomešana sa *n*-heksanom, a zatim izložena tečno-tečnoj ekstrakciji sa dietil-etrom (3 x 50 mL) i etil acetatom (3 x 50 mL). Organske faze su uparene na 30 °C do suvog ostatka (Büchi R-210), a zatim rastvorene u smeši vode i metanola (80:20), filtrirane kroz 0,22 µm LC filter disk za jednokratnu upotrebu i analizirane na HPLC uređaju.

3.3.4.2.2. HPLC-DAD-ESI/MS analiza fenolnih kiselina

Hemijska analiza fenolnih kiselina je izvedena korišćenjem Hewlett-Packard 1100 aparata za tečnu hromatografiju (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Razdvajanje je postignuto na reverzno faznoj C₁₈ koloni Spherisorb (Phenomenex, Torrance, CA), dimenzija (3 µm, 150 mm x 4,6 mm), temperiranoj na 25 °C. Korišćeni su sledeći rastvarači: (A) 2,5% sirćetna kiselina u vodi, (B) 2,5% sirćetna kiselina: acetonitril (90:10) i (C) 100% acetonitril. Gradijent je promenjen tokom vremena sledećim redosledom: izokratski 100% A tokom 10 minuta, 50% A i 50% B tokom 10 minuta, izokratski 100% B tokom 15 minuta, 90% B i 10% C tokom 10 minuta, 70% B i 30% C tokom 10 minuta, 50% B i 50% C tokom 5 minuta, 20% B i 80% C tokom 5 minuta. Na kraju je usledila reekvilibracija sa 100% A tokom 5 minuta uz protok 0,5 mL/min. Za detekciju su korišćeni detektor niza dioda (DAD) na talasnoj dužini 280 nm i maseni spektrometar Finnigan TM LCQ MS (Thermo-quest, San Jose, CA, USA) opremljen ESI jonskom probom. Parametri probe su iznosili: napon 3,5 kV, kompenzacija kapilare 10 V, temperatura kapilare 175 °C, pritisak nosećeg gasa (N₂) 1,2 L/min, pritisak auksilarnog (pomoćnog-sekundarnog) gasa 6,0 L/min. Spektri su snimani u negativnom modu u opsegu od 80 do 620 m/z. Instrument je izvršio seriju od tri uzastopna skeniranja: FS (*full scan*) u opsegu

od 150 do 1500 m/z, zatim zavisni osetljiviji sken oko najzastupljenijih jona u opsegu od ± 5 m/z i najzad MS/MS sken najzastupljenijih jona u celom opsegu koristeći normalizovanu kolizionu energiju od 45%. Fenolna jedinjenja prisutna u uzorku okarakterisana su prema masenom spektru i retencionim vremenima poređenjem sa komercijalnim standardima. Kalibraciona kriva je dobijena korišćenjem različitih koncentracija standarda protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzoeve kiseline, *p*-kumarne kiseline, galne kiseline i cinaminske kiseline. Vrednosti su izražene u mg/100 g suve mase plodonosnog tela makromicete.

3.3.4.3. Hemijska karakterizacija masnih kiselina

Identifikacija i udeo pojedinačnih masnih kiselina su određeni nakon reakcije transesterifikacije, metodom gasno-tečne hromatografije sa plameno jonizujućim detektorom (Gas Chromatography/Flame Ionization Detector, GC/FID) prema metodi (Barros i dr., 2007a). Uzorci homogenizovanih plodonosnih tela suspendovani u 5 mL smeše metanol:sumporna kiselina:toluen = 2:1:1 (v:v) su inkubirani na 50 °C u vodenom kupatilu tokom 12 h. Nakon toga je dodato 3 mL dejonizovane vode u cilju razdvajanja faza. Metil-estri masnih kiselina (Fatty Acid Methyl Esters - FAME) su prečišćeni dodavanjem 3 mL dietil-etra i mešanjem na vorteksu, a potom je gornja faza provedena kroz mikro-kolonu anhidrovanog natrijum sulfata kako bi se eliminisala voda. Uzorak je filtriran kroz 0,2 µm Milipore najlonski filter, a potom ubrizgan u kolonu. Profil masnih kiselina je analiziran putem gasnog hromatografa (DANI GC 1000), opremljenog sa split/splitless injektorom, plameno jonizujućim detektorom (FID) i kolonom Macherey-Nagel (30 mm × 0,32 mm ID × 0,25 µm df). Inicijalna temperatura kolone je iznosila 50 °C tokom 2 minuta, nakon čega je temperatura povećana na 240 °C, tempom od 10 °C/min i na toj vrednosti zadržana 11 minuta. Protok gasa nosača (vodonika) je iznosio 4,0 mL/min na 50 °C (0,61 bar). Split ubrizgavanje (1:40) je izvedeno na 250 °C, a zapremina ubrizganog uzorka u GC je iznosila 1 µL. Masne kiseline su identifikovane poređenjem relativnih retencionih vremena uzoraka sa pikovima standarda FAME, a rezultati su analizirani korišćenjem softvera CSW 1,7 (Data Apex 1,7) i izraženi kao relativni udeo (procenat) svake masne kiseline.

3.3.5. Izolacija i karakterizacija lektina iz bazidiokarpa *L. sulphureus*

Zahvaljujući podacima o visokom biološkom potencijalu lektina iz *L. sulphureus* kao i nedostatku informacija o lektinima autohtonog soja, ova vrsta je izabrana za izolaciju i karakterizaciju lektina kao jedinjenja od interesa.

3.3.5.1. Ekstrakcija neprečišćenih lektina

Zamrznuto plodonošno telo *L. sulphureus* 1 (10 g) usitnjeno je u avanu tečnim azotom, a potom homogenizovano PBS-om pH 7,4 u odnosu 1:3. U homogenat su dodati 1M DTT (ditiotreitol, 10 µL/mL ekstrakcionog pufera) i 0,1M PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid, 3,33 µL/mL ekstrakcionog pufera). Ekstrakcije su izvedene tokom 45 minuta i preko noći, kako bi se utvrdio efekat dužine trajanja ekstrakcije na prinos lektina. Po završetku ekstrakcije, oba uzorka su tretirana na isti način: homogenat je filtriran kroz filter papir (kako bi se uklonili krupniji, nehomogenizovani delovi), centrifugiran tokom 15 minuta na 3000 g (na 4°C), a zatim tokom 20 minuta na 20 000 g (na 4°C) i za dalju analizu korišćeni su supernatanti. U cilju selektivnog frakcionisanja kompleksne smeše proteina na frakcije bogate i frakcije siromašne lektinima, uzorci su precipitirani amonijum sulfatom (AS) na 40% i 80% zasićenja (Silva i dr., 2012). Količina AS za odgovarajući procenat zasićenja izračunata je prema sledećoj formuli (Vujičić, 2002):

$$AS (g) = 505 \times (S_2 - S_1) / (1 - 0,285 \times S_2)$$

AS (g) – grammi čvrstog amonijum sulfata koje treba dodati u 1 L rastvora

S_1 – početno zasićenje

S_2 – krajnje zasićenje

Frakcionisanje je izvedeno postepenim dodavanjem usitnjenog AS u oba ekstrakta uz kontinuirano, lagano mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon završene precipitacije na 40%, uzorak je centrifugiran na 20 000 g tokom 20 minuta na 4 °C. Talog zaostao posle precipitacije na 40% (T_1) je rastvoren u fiziološkom rastvoru, dok je supernatant dalje zasićen na 80%. Po zasićenju uzorka na 80%, smeša je ponovo centrifugirana na 20 000 g, tokom 20 minuta na 4 °C. Supernatant je odbačen, a talog (T_2) je rastvoren u fiziološkom rastvoru. Ista procedura je ispraćena i za uzorak koji je ekstrahovan preko noći. Uzorci T_1 i T_2 (dobijeni ekstrakcijom u trajanju 45 min) i T_1' i T_2' (dobijeni ekstrakcijom preko noći) su potom dijalizovan kroz celuloznu membranu za dijalizu, Sigma-Aldrich D9652, MWCO<10 kDa (Molecular Weight Cut Off) radi eliminacije AS. Celulozna membrana je pripremljena prema specifikaciji proizvođača, a dijaliza je izvedena preko noći uz konstantno mešanje na magnetnoj mešalici u puferu (50 mM PBS, pH

7,4) koji je tokom trajanja procesa izmenjen 3 puta. Nakon završene dijalize, uzorci su skladišteni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalje upotrebe.

3.3.5.2. Određivanje hemaglutinacione aktivnosti

Aglutinacija predstavlja univerzalni proces slepljivanja čestica, a hemaglutinacija eritrocita lektinima je proces tokom kojeg lektini aglutiniraju eritrocite kao rezultat interakcije između ugljenih hidrata koji se nalaze na površini eritrocita i lektina koji ih prepoznaju i vezuju se za njih. Na ovaj način se vizuelno formira trodimenzionalna mreža koja ukazuje da su lektini prisutni/aktivni. Za potrebe eksperimenta krv humanog porekla stabilizovana antikoagulansom je isprana fiziološkim rastvorom, dok su eritrociti pripremljeni prema proceduri koju je opisao Vujučić (2002):

1. 1 mL staloženih eritrocita je suspendovano u 9 mL PBS-a;
2. rastvor je centrifugiran tokom 5 minuta na 300 g;
3. plazma iznad eritrocita je aspirirana, a postupak ispiranja je ponovljen još tri puta;
4. eritrociti su razblaženi do 3% u PBS-u.

Mikroaglutinacija je izvedena u „V“ aglutinacionim pločama koje imaju koso ili tzv. „V“ dno. Lektinska aktivnost je procenjena nakon serijskog razblaženja rastvora lektina u ploči i dodavanja konstantne zapremine rastvora eritrocita. Rezultati su očitani vizuelno, praćenjem formiranja mreže koja se sleže po zidu bunarčića mikrotitar ploče ukoliko dođe do aglutinacije. Ukoliko aglutinacija izostane, eritrociti se talože na dnu bunarčića. Period inkubacije je završen kada se uoči jasna tačka u kontroli. Mikroaglutinacija je izvedena prema proceduri koju je opisao Vujučić (2002):

1. u sve bunarčiće mikrotitar ploče je odmereno po 50 μL pufera;
2. u prvi bunarčić je dodato 50 μL uzoraka nakon 40% i 80% zasićenja AS (T_1 , T_1' , T_2 i T_2' nakon dijalize);
3. sadržaj je promešan i serijski je razblažen;
4. u serijski razblažen uzorak i kontrolu (pufer bez uzorka) dodato je po 50 μL 3% suspenzije eritrocita, pažljivo niz zid bunara, tako da se ceo rastvor izmeša, a ne peni;
5. ploča je postavljena na belu podlogu, pokrivena i inkubirana (1-2 h).

3.3.5.3. Karakterizacija izolovanih lektina

3.3.5.3.1. Nativna i SDS poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE)

Za karakterizaciju lektina (SDS i nativna PAGE) je korišćen Biorad Mini-PROTEAN Tetra cell sistem za 1-D vertikalnu elektroforezu. Korišćeni su gelovi debljine 1 mm, a uslovi izvođenja elektroforeze su iznosili: 10 min na 120 V (kroz koncentrujući gel) i 1 h na 160 V (kroz gel za razdvajanje). Procedura za pripremanje gelova za SDS i nativnu PAGE, kao i detaljne informacije o potrebnim reagensima su dati u prilogu (118.-122. strana). Za procenu molekulske mase korišćeni su markeri poznatih molekulskih masa (Santa Cruz, Broad Range Markers SC 2361).

3.3.5.3.2. Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Odredjivanje profila lektina je urađeno metodom izoelektričnog fokusiranja prema razlici u izoelektričnim (pI) vrednostima. Gelovi za IEF pripremljeni su prema proceduri detaljno opisanoj u prilogu (122. strana). IEF je izvedeno pri 450 V i 14 mA, tokom 1 h, a uzorci su pripremljeni bez dodatka pufera za uzorke. Korišćeni su 10 mM NaOH kao katolit i 10 mM H₃PO₄ kao anolit, dok su markeri bili širokog opsega pI vrednosti 4,45 – 9,6 (BioRad 161-0310).

3.3.5.3.3. Western blotting

„Western blotting” je metoda elektrotransfera - prenošenja proteina sa poliakrilamidnog gela na inertnu matricu, tj. nitroceluloznu (NC) ili polivinildenfluorid (PVDF) membranu. Ekstrakti *L. sulphureus* 1 bogati lektinima su nakon nativne PAGE transferovani na NC membranu korišćenjem BioRad Trans blot SD Cell Semi - Dry Transfer aparata. Za transfer je korišćen: 25 mM Tris, 192 mM glicin, pH 8,2 pufer, a uslovi elektrotransfera su iznosili 23 V, tokom 1 h. Nakon transfera proteina sa gela na NC membranu, deo gela je inkubiran sa rastvorom tripsinizovanih eritrocita, a deo obojen CBB-om po utvrđenoj proceduri u prilogu (122. strana). Efikasnost transfera je potvrđena bojenjem gela CBB-om.

3.3.5.4. Detekcija lektinske aktivnosti na NC membrani

Lektinska aktivnost je procenjena izlaganjem lektinskih traka sa NC membrane 3% tripsinizovanim eritrocitima tokom 30 minuta na 37 °C prema metodi koju su opisali Rao i dr. (1994). Lektini su vizuelizovani kao crvene aglutinirane trake na membrani. Tripsinizacija eritrocita je izvedena po sledećoj proceduri:

1. 3% rastvor eritrocita tretiran 0,1% rastvorom tripsina inkubiran je 1 h na 37 °C u sledećem odnosu: 1 deo tripsina:10 delova rastvora eritrocita; tripsinizovani eritrociti su skladišteni na 4 °C do dalje upotrebe (maksimalno 7 dana od dana pripreme);
2. inkubirani eritrociti isprani su četiri puta fiziološkim rastvorom na način koji je opisan u delu 3.3.5.2.

3.3.5.5. Izolacija lektina putem jonoizmenjivačke hromatografije

U cilju procene broja lektinskih izoformi bazidiokarpa *L. sulphureus* 1, kao i njihove eventualne izolacije, urađena je jonoizmenjivačka hromatografija korišćenjem uzorka T₂' na: (1) slabom katjonskom jonoizmenjivaču – karboksimetil sefarozi (CM sefaroza) i (2) slabom anjonskom jonoizmenjivaču – dietilaminoetanol sefarozi (DEAE sefaroza). Iako je za izolovanje lektina bio dovoljan samo jedan matriks, u radu su korišćena dva da bi se postigla bolja kontrola eksperimentalnih uslova. U oba slučaja smola (13 mL) je ekvilibrisana u 5 mM fosfatnom puferu (85 mL, pH 7,3), a zatim je uzorak T₂ (1 mL) nanet na kolonu. Ispiranje nevezanih proteina sa DEAE sefaroze je izvedeno fosfatnim puferom, dok je elucija postignuta rastvorom 0,5 M NaCl u fosfatnom puferu. Nakon ispiranja nevezanih proteina (V=68 ml), eluirani su vezani proteini, među kojima se nalazio i protein (lektin) od interesa (V=40 mL). Sakupljane su frakcije od po 1 mL, a prisustvo proteina u frakcijama praćeno je očitavanjem apsorbance na 560 nm reakcione smeše koja se sastojala od frakcije i bicinoninske kiseline (BCA komplet Pierce TM, Kat. br. 23225). U slučaju CM sefaroze, proteini (i lektini) od interesa su bili u nevezanoj formi i izašli su prvi sa kolone. Po završetku ekvibracije smole, nevezani proteini među kojima je i lektin od interesa su isprani fosfatnim puferom (26 mL, pH 7,3), dok je vezana forma eluirana korišćenjem (0,5 M NaCl) u 5 mM fosfatnom puferu (34 ml, pH 7,3). Sakupljene su frakcije od po 1 mL, a prisustvo proteina u njima praćeno očitavanjem apsorbance na 560 nm reakcione smeše frakcije i bicinoninske kiseline (BCA komplet - Pierce TM, Kataloški broj 23225). Frakcije u kojima je potvrđeno prisustvo proteina su koncentrovane, a zatim su proteini razdvojeni metodom native elektroforeze kako bi se izvršila kvalitativna analiza, tj. odredio stepen čistoće (poređenje dobijenih traka sa početnim uzorkom T₂) i utvrdilo prisustvo lektina.

3.3.5.6. Izolacija i prečišćavanje lektina putem afinitetne hromatografije

Po završenoj ekstrakciji i izolaciji prema modifikovanoj proceduri koju su opisali Tateno i Goldstein (2003), lektin iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 je prečišćen iz početne smeše putem

afinitetne hromatografije. Modifikacija procedure se ogledala u korišćenju sefaroza CL-6B kao afinitetnog matriksa za prečišćavanje lektina, u odnosu na pomenuti rad gde je korišćena sefaroza 4B kao afinitetni matriks.

3.3.5.6.1. Ekstrakcija lektina za afinitetnu hromatografiju

Zamrznuti bazidiokarp *L. sulphureus* 1 (~ 200 g) usitnjen je i homogenizovan u blenderu korišćenjem PBSE pufera (1000 mL, 10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O pH 7,2; 0,15 M NaCl, 0,04% NaN₃, 1 mM EDTA, 0,1 M PMSF 2 mL/L). Homogenat je ekstrahovan preko noći na 4 °C, proceden kroz gazu i centrifugiran na 3000 g tokom 20 minuta na 4 °C, a supernatant je korišćen za precipitaciju AS. Nakon precipitacije, ekstrakt je centrifugiran na 4 °C, tokom 10 minuta na 3500 g. Talog je potom resuspendovan u puferu koji je korišćen za ekstrakciju. U cilju uklanjanja AS, koncentrovanja uzorka i smanjenja početne zapremine koja će biti naneta na kolonu, uzorak je podvrgnut ultrafiltraciji na Amicon filteru MW CO vrednost <10 kDa korišćenjem PBS-a.

3.3.5.6.2. Prečišćavanje lektina afinitetnom hromatografijom

Procedura izdvajanja čistog lektina iz ekstrakta korišćenjem principa afinitetne hromatografije izvedena je metodom koju su opisali Tateno i Goldstein (2003). Sefaroza CL-6B (V smole 60 mL) je ekvilibrisana PBSE puferom (25 mL), a potom je postepeno nanet koncentrovan uzorak. Nakon ispiranja nevezanih proteina PBSE puferom (3 V kolone) usledilo je eluiranje vezane frakcije 0,1 M laktozom u 65 mL PBSE. Prisustvo proteina u frakcijama tokom ispiranja i elucije je praćeno u reakciji sa bicinoninskom kiselinom (BCA komplet, Pierce TM, Kataloški broj 23225), dok je lektinska aktivnost u vezanim i nevezanim frakcijama ispitana testom hemaglutinacije u „V“ pločama. Prisustvo čistog lektina u frakcijama potvrđeno je nativnom elektroforezom poređenjem traka aglutiniranih eritrocita prečišćenog lektina nakon Western blotting-a (na NC membrani) sa trakama uzorka T₂. Frakcije sa lektinom su dijalizovane da bi se uklonila laktoza, koncentrovane, prebačene u PBS a potom liofilizovane i čuvane na -20 °C.

3.4. Ukupni sadržaj fenola i antioksidativna aktivnost

U uzorcima plodonosnih tela testiranih makromiceta je određen ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja, dok je antioksidativna aktivnost plodonosnih tela procenjena sledećim *in vitro*

protokolima: fericijanid metoda/metoda Pruskog plavog, DPPH· test, β-karoten/linolna kiselina test i TBARS test. Kao pozitivna kontrola je korišćen troloks.

3.4.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakt je pripremljen prema proceduri koju su opisali Reis i dr. (2011a) u metanolu tokom 1 h na 25 °C na magnetnoj mešalici (1,50 mg praha bazidiokarpa u 30 mL rastvarača), a potom je filtriran kroz Whatman No. 4 filter papir. Ostatak je reekstrahovan metanolom tokom 1 h prema gore navedenoj proceduri. Kombinovani ekstrakt je uparen do suvog ostatka na 40 °C korišćenjem rotacionog vakuum uparivača (Büchi R-210) i potom rastvoren u metanolu.

3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja je u uzorcima makromiceta određen prema metodi Ferreira i dr. (2007). Testirani uzorak (1 mL) je pomešan sa FC reagensom (1 mL). Nakon 3 minuta, 1 mL zasićenog rastvora natrijum karbonata (Na_2CO_3) dodat je smeši i rastvor je dopunjen do 10 mL destilovanom vodom. Reakcija se odvijala u mraku tokom 1,5 h, nakon čega je apsorbancija očitana na 725 nm (Analytik Jena 200-2004 spektrofotometar). Za dobijanje standardne krive korišćena je 0,01–0,4 mM galna kiselina (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Vrednost ukupnog sadržaja fenola u ekstraktu je izražena kao miligram ekvivalenta galne kiseline po gramu ekstrakta (mg GAE/g ekstrakta).

3.4.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti testiranih makromiceta

Kako navodi Sánchez (2017), danas se najčešće za procenu antioksidativne aktivnosti koristi 11 *in vitro* metoda, a korelacijom dobijenih podataka se preciznije može proceniti potencijal nekog biološkog materijala.

3.4.3.1. Fericijanid metoda/metoda Pruskog plavog

Ova metoda je izvedena prema Barros i dr. (2012a) i zasnovana je na redukciji jedinjenja $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ potencijalnim antioksidansom. Mehanizam delovanja se zasniva na sposobnosti antioksidansa da donira elektron centralnom jonu metala, vršeći njegovu redukciju. Nastali produkt (redukovana forma) stabilizovan je dodatkom Fe^{3+} jona, pri čemu nastaje kompleks koji apsorbuje u vidljivom delu spektra na 700 nm. Praćenje promene apsorpcije na 700 nm ukazuje na sposobnost antioksidansa da redukuje $\text{Fe}(\text{III})$ jon do dvovalentnog jona koji potom obrazuje kompleks stabilizacijom sa $\text{Fe}(\text{III})$ jonima. Ekstrakti gljiva (0,5 mL) pomešani su sa rastvorom

PBS-a (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) i kalijum ferocijanida ($K_4Fe(CN)_6$) (1% w/v, 0,5 mL). Smeša je potom inkubirana 20 minuta na 50 °C u vodenom kupatilu, ohlađena na sobnoj temperaturi, a zatim je dodata trihlorsirćetna kiselina (10 % w/v, 0,5 mL). Suspenzija (0,8 mL) je odmerena u ploče sa 48 bunarčića, a zatim je dodata dejonizovana voda (0,8 mL) i $FeCl_3$ (0,16 mL, 0,1% w/v). Apsorbanca rezultujućeg rastvora plave boje očitana je na 690 nm talasne dužine na čitaču mikroploča tipa ELX800 (Bio-tek Instruments, Inc; Winooski, SAD). Redukciona sposobnost je određena na osnovu očitanih apsorbanci.

3.4.3.2. DPPH· test

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata testiranih makromiceta je određena DPPH· testom u mikrotitracionim pločama prema metodi Reis i dr. (2011b, 2012a). Reakciona smeša se sastojala od 30 μ L ekstrakta i 270 μ L rastvora DPPH u metanolu (6×10^{-5} mol/L). Smeša je inkubirana 30 minuta u mraku i merena je apsorbanca na 515 nm na čitaču mikroploča tipa ELX800 (Bio-tek Instruments, Inc; Winooski, SAD).

Sposobnost hvatanja radikala (engl. *radical scavenging activity* - RSA) izračunata je kao procenat obezbojavanja rastvora DPPH· korišćenjem sledećeg obrasca:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}\cdot} - A_S)/A_{\text{DPPH}\cdot}] \times 100$$

A_S - apsorbanca uzorka

$A_{\text{DPPH}\cdot}$ - apsorbanca DPPH· rastvora

Vrednost EC_{50} (mg/mL), definisana kao efektivna koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% DPPH· radikala je dobijena linearnom regresionom analizom.

3.4.3.3. β -Karoten/linolna kiselina test

β -Karoten/linolna kiselina test za procenu antioksidativnog potencijala testiranih makromiceta izveden je prema metodi Reis i dr. (2012a). Emulzija za određivanje antioksidativne aktivnosti pripremljena je rastvaranjem 2 mg β -karotena u 10 mL hloroforma, nakon čega je 2 mL ovog rastvora upareno na 40 °C pomoću rotacionog vakuum uparivača (Büchi R-210). Čvrstom ostatku su dodati linolna kiselina (40 mg), emulgator Tween 80 (400 mg) i destilovana voda (100 mL). Alikvoti emulzije (4,8 mL) su inkubirani sa ekstraktima gljiva (0,2 mL) u vodenom kupatilu na 50 °C. Apsorbance su merene neposredno nakon dodavanja emulzije ekstraktima gljiva ($t=0$ min), a zatim nakon dva sata inkubacije sa ekstraktima ($t=120$

min) na 470 nm. Antioksidativna aktivnost uzoraka određena je praćenjem inhibicije dekolorizacije rastvora β -karotena, a procenat inhibicije je izračunat korišćenjem sledeće jednačine:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{120}/A_0) \times 100$$

A_0 = apsorbanca uzorka neposredno nakon dodavanja emulzije

A_{120} = apsorbanca uzorka nakon 120 minuta

Koncentracija ekstrakta koja je obezbedila 50% antioksidativne aktivnosti (EC_{50}) je određena sa grafika antioksidativne aktivnosti.

3.4.3.4. TBARS test (Thiobarbituric acid reactive substances): reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline

TBARS metoda koja se najčešće koristi za detekciju lipidne oksidacije izvedena je prema metodologiji Reis i dr. (2012a). Za potrebe eksperimenta korišćen je svinjski mozak (*Sus scrofa*) dobijen od sveže žrtvovanih životinja koji je homogenizovan u hladnom puferu Tris-HCl (20 mM, pH 7,4), radi dobijanja homogenata moždanog tkiva u odnosu 1:2 w/v. Homogenat je centrifugiran na 3000 g tokom 10 minuta, a zatim su alikvoti supernatanta (100 μ L) inkubirani 60 minuta sa 200 μ L uzorka ekstrakta različite koncentracije u prisustvu $FeSO_4$ (10 mM; 100 μ L) i askorbinske kiseline (0,1 mM; 100 μ L) na 37 °C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem trihlorsirćetne kiseline (28% w/v, 380 μ L), a potom i tiobarbiturne kiseline (2% TBA, 0,38 mL) Nakon toga, smeša je zagrevana 20 minuta na 80 °C, a zatim centrifugirana 10 minuta na 3000 g kako bi se odstranili precipitirani proteini. Supernatant je sadržao kompleks MDA-TBA roze boje sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Rezultati su izračunati prema sledećoj formuli i izraženi u procentima:

$$OI (\%) = [(A-B)/A] \times 100\%$$

A = Apsorbanca kontrole

B = Apsorbanca rastvora uzorka

Koncentracija ekstrakta (mg/mL) koja je obezbedila 50% antioksidativne aktivnosti (EC_{50}) je određena sa grafika antioksidativne aktivnosti.

3.5. Test mikroorganizmi i ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Antimikrobna aktivnost testiranih makromiceta je procenjena putem mikrodilucione i bioautografske metode na 8 bakterija i 8 mikromiceta koje su korišćene kao test mikroorganizmi. U cilju određivanja dijapazona antimikrobnog potencijala ekstrakata testiranih makromiceta, korišćeni su različiti ATCC sojevi, kao i klinički i izolati iz hrane.

3.5.1. Test bakterije

Za procenu antibakterijske aktivnosti ekstrakata makromiceta korišćene su četiri vrste Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus cereus* (klinički izolat), *Listeria monocytogenes* (NCTC 7973), *Micrococcus flavus* (ATCC 10240) kao i četiri vrste Gram-negativnih bakterija: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030) i *Escherichia coli* (ATCC 35210). Kulture bakterijskih sojeva su deponovane u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Sojevi su presejavani jednom mesečno na TSA podlogu i skladišteni na 4 °C (Booth, 1971).

3.5.2. Test mikromicete

Za procenu antifungalne aktivnosti ekstrakata makromiceta korišćeno je osam vrsta mikromiceta: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 1022), *Aspergillus versicolor* (ATCC 11730), *Aspergillus ochraceus* (ATCC 12066), *Aspergillus niger* (ATCC 6275), *Trichoderma viride* (IAM 5061), *Penicillium funiculosum* (ATCC 36839), *Penicillium ochrochloron* (ATCC 9112) i *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* (izolat iz hrane). Mikromicete su deponovane u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu. Sojevi su presejavani jednom mesečno na čvrstoj malt agar hranljivoj podlozi (MA, Torlak, Srbija) i skladišteni na 4°C (Booth, 1971).

3.5.3. Hranljive podloge

Podloge označene u Tabeli 1. kao TSA/TSB su pripremljene rastvaranjem praha podloge u destilovanoj vodi, a nakon 15 minuta stajanja, rastvor je sterilisan u autoklavu. Podloge

označene kao LB i LA pripremljene su prema Sambrook i Russel (2001), a malt agar prema Booth (1971).

Tabela 1. Sastojci za pripremu hranljivih podloga

Triptic Soya Agar/Broth (TSA; TSB) za 1L:	Lysogeny Broth/Agar (LB/LA)	Malt agar (MA)
Kazein15,0 g	Tripton.....10,0 g	Sladni ekstrakt.....50,0 g
Pepton.....5,0 g	Ekstrakt kvasca.....5,0 g	Agar.....15,0 g
Natrijum hlorid.....5,0 g	Natrijum hlorid.....10,0 g	Destilovana voda.....1,0 L
Agar.....15,0 g	Destilovana voda.....1,0 L	
K ₂ HPO ₄1,0 L		
Destilovana voda.....1,0 L		

3.5.4. *In vitro* testovi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata makromiceta

Antimikrobna aktivnost ekstrakata gljiva je procenjena korišćenjem mikrodilucione metode - 96 sistem (Soković, 2001) i bioautografske metode tankoslojne hromatografije (Thin Layer Chromatography - TLC ploče; Horvath i dr., 2010; Choma i Grzelak, 2011).

3.5.4.1. Mikrodiluciona metoda – antibakterijska aktivnost

U cilju utvrđivanja minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) korišćena je mikrodiluciona metoda prema Soković (2001) u mikrodilucionim pločama sa ravnim dnom, 96 sistem (Spektar, Čačak). Prekonoćne kulture ($1,0 \times 10^9$ ćelija/mL) dobijene su gajenjem testiranog bakterijskog soja tokom 24 h na 37 °C u 2 mL tečne hranljive podloge (Tryptic Soy Broth – TSB, Torlak). Nakon isteka vremena, suspenzije bakterija (inokulumi) podešene su sterilnim fiziološkim rastvorom do koncentracije $1,0 \times 10^6$ ćelija/mL (0,5 McFarland standard) i skladištene na 4 °C do dalje upotrebe. Ekstrakti makromiceta rastvoreni su u 30% etanolu i dodati hranljivoj podlozi za rast bakterija u

odgovarajućoj koncentraciji. Potom su dodati bakterijski inokulumi, a ploče su inkubirane 24 h na 37 °C. Najniža koncentracija na kojoj je vidno smanjen rast bakterije (pod binokularnom lupom) definisana je kao MIK. Utvrđivanje odsustva rasta mikroorganizama, tj. određivanje MBK vrednosti, izvedeno je serijskom reinokulacijom 10 µL inokulisane podloge iz bunarčića gde nije zabeležen rast bakterija u 100 µL sterilne hranjive podloge i reinkubacijom tokom 24 h na 37 °C. Rezultati su potvrđeni nakon dodavanja 40 µL rastvora indikatorske boje ljubičasta *p*-jodonitrotetrazolijum-hlorid I8377-Sigma (0,2 mg/mL destilovane vode) svakom bunarčiću i inkubacije u trajanju 30 minuta na 37 °C. Rast bakterija potvrđen je u bunarčićima čiji je sadržaj postao obojen intenzivnom crveno-ljubičastom bojom, dok na mestima u kojima nije utvrđen rast bakterija, nije došlo do promene boje sadržaja bunarčića (Tsukatani, 2012). Poređenje intenziteta boje izvedeno je sa kontrolnim bunarčićima u kojima je omogućen neometani rast bakterija, a kao pozitivne kontrole korišćeni su komercijalni antimikrobni agensi (koncentracije 1 mg/mL) streptomycin (Sigma P 7794) i ampicilin (Panfarma, Beograd, Srbija).

3.5.4.2. Mikrodiluciona metoda – antifungalna aktivnost

Za pripremanje inokuluma (suspenzije spora mikromiceta) korišćene su kulture mikromiceta stare 21 dan, a spiranje spora je izvedeno sterilnim 0,85% fiziološkim rastvorom sa 0,1% Tween 80 (v/v). Spore su izbrojane Neubauer hemocitometrom, a koncentracija je podešena sterilnim fiziološkim rastvorom na $1,0 \times 10^5$ ćelija/mL. Ekstrakti makromiceta rastvoreni u 30% etanolu su dodati bunarčićima koji su već sadržali hranjivu podlogu. Nakon dodavanja inokuluma mikromiceta, ploče su inkubirane 5 dana na 25 °C. Najniže koncentracije sa vidno smanjenim rastom micelije pod binokularnom lupom definisane su kao MIK, dok su MFK određene serijskom reinokulacijom 10 µL inokulisane podloge iz bunarčića gde nije zabeležen rast mikromiceta u 100 µL sterilne hranjive malt agar podloge i ponovnom inkubacijom u trajanju od 72 h na 25 °C. Inokulisani medijum bez dodatog ekstrakta je korišćen kao negativna kontrola. Komercijalni fungicidi bifonazol (Srbolek, Beograd, Srbija) i ketokonazol (Zorka farma, Šabac, Srbija) korišćeni su kao pozitivne kontrole (rastvoreni do 1 mg/mL).

3.5.4.3. Bioautografska metoda - antibakterijska aktivnost

Metodom bioautografije na TLC pločama testiran je antibakterijski potencijal metanolnih ekstrakata ispitivanih makromiceta. Korišćene su komercijalne ploče sa silika gelom na

aluminijumskim pločama debljine 1 mm (Merck, Nemačka, Art. 5554). Ekstrakti makromiceta rastvoreni u 30% etanolu naneti su na ploču i osušeni, ploče su prskane suspenzijom bakterija odgovarajuće koncentracije ($1,0 \times 10^8$ ćelija/mL), a zatim inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Nakon inkubacije ploče su prskane rastvorom *p*-jodonitrotetrazolijum-hlorid (0,2 mg/mL), a zatim ponovo inkubirane tokom 3 h. Nakon druge inkubacije, ploče su prskane 70% rastvorom etanola radi zaustavljanja rasta mikroorganizama. Uočavanjem i merenjem dijametra inhibitornih zona rasta [mm] na crveno obojenoj podlozi poreklom od formazana (označava oblasti rasta mikroorganizama) izmerene su zone inhibicije rasta testiranih bakterija.

3.5.5. Ispitivanje anti-QS aktivnosti ekstrakata testiranih makromiceta

Pseudomonas aeruginosa PAO1 soj je korišćen kao model organizam za testiranje potencijalne anti-QS aktivnosti ekstrakata makromiceta. Kultura je deponovana u laboratorijskoj kolekciji Mikološke laboratorije, Odeljenja za biljnu fiziologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu i presejavana jednom mesečno na LA podlogu (Tabela 1.). Anti-QS aktivnost na PAO1 je procenjena putem testova koji na indirektan način ukazuju na promenu struktura kojima se QS regulacija ostvaruje, kao što su: testovi pokretljivosti (određuju se promene na TIVP), piocijanin test (određuje se potencijalna inhibicija produkcije pigmenta piocijanina faktora virulentnosti) i efekat na formiranje biofilma.

3.5.5.1. Metoda za određivanje pokretljivosti

Testiranje inhibitornog efekta metanolnih ekstrakata makromiceta na strukture TIVP izvedeno je prema metodi koju su opisali Sandy i Foong-Yee (2012). Testirani ekstrakt 50 µL (subMIK vrednosti) pomešan je sa 10 mL rastopljene LA hranljive podloge (Tabela 1.) i nanet kao drugi sloj na površinu već ohlađene LA podloge u Petri kutiji. Na podlogu je naneto 1 µL inokuluma prekonocne kulture PAO1 i Petri kutije su inkubirane 24 h na 37 °C, a zatim još dva dana na sobnoj temperaturi. Nakon druge inkubacije, pod binokularnim mikroskopom (Leika, tip 020-518.500 DM LS, Nemačka) merene su ivice kolonija, njihove morfološke karakteristike, kao i zone pokretljivosti.

3.5.5.2. Metoda za određivanje produkcije pigmenta piocijanina kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Potencijalni inhibitorski efekat metanolnih ekstrakata makromiceta na produkciju piocijanina testiran je metodom koju su opisali El Fouly i dr. (2015). Optička gustina prekonoćne kulture PAO1 zabeležena je na 600 nm talasne dužine i podešena na vrednost 0,2. Subinhibitorska koncentracija ekstrakata makromiceta (0,5 MIK, u μL) dodata je inokulumu (4,75 mL) i suspenzija je inkubirana 24 h na 37 °C. Po isteku vremena, suspenzija je ekstrahovana sa 3 mL hloroforma koji je uzrokovao odvajanje faza; gornjoj hloroformskoj fazi dodata je hlorovodonična kiselina (1 mL, 0,2 M HCl), a zatim je merena apsorbanca ekstrahovanog sloja roze boje (u kome se nalazi pigment piocijanin) na 520 nm (Shimadzu UV1601, Japan). Kao pozitivna kontrola korišćen je antibiotik streptomycin. Rezultati su izraženi kao produkcija pigmenta piocijanina pod uticajem ekstrakta u odnosu na kontrolni inokulum i dobijaju se korišćenjem obrasca:

$$\% I = (\text{OD}_{520} / \text{OD}_{600} \times 100)$$

3.5.5.3. Metoda za određivanje antibiofilm aktivnosti kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Efekat metanolnih ekstrakata makromiceta (0,5 i 0,25 MIK) na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 ispitan je u polistirenskim pločama sa ravnim dnom (96 sistem) po metodi Spoering i Lewis (2001). Hranljiva podloga (100 μL) je odmerena u sve bunarčice ploče, a zatim je u prvi bunarčić dodato 100 μL subMIK koncentracije testiranog ekstrakta makromiceta. Sadržaji bunarčića su serijski razblaženi, a zatim je dodato 100 μL kulture PAO1 ($1,0 \times 10^7$ ćelija po mL) u svaki. Nakon inkubacije (24 h na 37 °C), tečni sadržaj ploče je odstranjen čime je biofilm zaostao u bunarčićima. Ploča je isprana dva puta sterilnim PBS-om (pH 7,4) i osušena na vazduhu. Ćelije su potom fiksirane metanolom (10 minuta), osušene i bojene 15 minuta 0,1% rastvorom boje kristal violet (iz seta za bojenje po Gramu, Bio-Merieux, Francuska) u cilju određivanja mase biofilma. Nakon završetka bojenja, kristal violet je odstranjen iz bunarčića i ploče su osušene tokom 10 minuta. Radi potpunog rastvaranja zaostale boje, u svaki bunarčić je dodato 200 μL 95% rastvora (v/v) etanola (Zorka, Šabac). Sadržaj bunarčića je homogenizovan nakon 10 minuta i očitana je apsorbanca na 625 nm na Elisa čitaču (Sunrisetm-Tecan ELISA, Mannedorf, Švajcarska).

Rezultati su prikazani kao procenat inhibicije formiranja biofilma u odnosu na kontrolu:

$$[(OG_{\text{kontrola}} - OG_{\text{uzorak}}) / OG_{\text{kontrola}}] \times 100$$

OG-optička gustina ili apsorbanca

3.6. Određivanje citotoksične aktivnosti testiranih makromiceta

Procena citotoksičnosti je izvedena sulforodamin B testom na odabrane maligne ćelijske linije humanog porekla i primarne nemaligne svinjske hepatocyte prema metodi Calhelha i dr. (2014).

3.6.1. Određivanje citotoksične aktivnosti na maligne ćelijske linije humanog porekla

Za testiranje citotoksične aktivnosti korišćene su četiri maligne ćelijske linije: MCF-7 (adenokarcinom dojke), NCI-H460 (karcinom nemalih ćelija pluća), HeLa (karcinom grlića materice) i HepG2 (primarni karcinom jetre - hepatocelularni karcinom). Ćelije su gajene na 37 °C, u CO₂ inkubatoru (5% CO₂), u hranljivim podlogama RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium (HyClone Logan, USA) uz dodatak 10% toplotom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (FBS - Fetal Bovine Serum) i 2 mM glutamina ili DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HyClone Logan, USA) uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS), 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina i 100 mg/mL streptomicina (za HeLa i HepG2 ćelije). Svaka ćelijska linija zasejana je pri odgovarajućoj gustini ($7,5 \times 10^3$ ćelija po bunarčiću za linije MCF-7, NCI-H460; odnosno $1,0 \times 10^4$ ćelija po bunarčiću za HeLa i HepG₂ ćelijske linije) u pločama sa ravnim dnom (96 bunarčića) koje su inkubirane 24 h na 37 °C. Adherirane ćelije u ploči tretirane su rastvorima ekstrakata tokom 48 h, kako bi se ispitaio njihov citotoksični efekat. Po isteku vremena, adherentne ćelije su fiksirane dodavanjem hladne 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA, 100 μL), a zatim ponovo inkubirane 1h na 37 °C. Ploče su isprane destilovanom vodom i osušene na vazduhu. Rastvor sulforodamina B (0,1% u 1% sirćetnoj kiselini, 100 μL) dodat je svakoj ploči koja je zatim inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nevezani sulforodamin B je uklonjen ispiranjem sa 1% sirćetnom kiselinom. Ploče su osušene na vazduhu dok je vezani sulforodamin rastvoren dodatkom 10 mM Trisa (200 μL, pH 7,4). Apsorbanca sadržaja je izmerena na 540 nm na ELISA čitaču.

3.6.2. Određivanje citotoksične aktivnosti na primarne ćelije svinjske jetre

Ćelijska kultura PLP2 (Porcine Liver Primary cell culture – ćelijska kultura primarnih ćelija jetre) pripremljena je od sveže svinjske jetre. Tkivo jetre je isprano Henkovim uravnoteženim rastvorom soli (Hank's balanced salt solution, HBSS) koji je sadržao 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina, a zatim podeljeno na eksplante $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Eksplanti su stavljeni u flaskove za kulturu ćelija 25 cm^2 koji sadrže DMEM hranljivu podlogu, sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma, 2 mM neesencijalnih aminokiselina, 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina, a zatim su inkubirane na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u CO_2 inkubatoru 24 h (5% CO_2). Hranljiva podloga je menjana na dva dana. Kultivacija je nastavljena, a ćelije su posmatrane svaka 2-3 dana korišćenjem fazno-kontrastnog mikroskopa (Nikon, TMS). Ćelije su zatim pasažirane u ploče 96 sistem pri gustini $1,0 \times 10^4$ ćelija po bunarčiću, pre konfluente (gustina adherentnih ćelija kao mera njihove proliferacije) i kultivisane na DMEM hranljivoj podlozi sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma, 100 U/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina. Ćelije su tretirane tokom 48 h ekstraktima makromiceta. Po isteku 48 h, adherentne ćelije su fiksirane dodavanjem hladne 10% trihlorsirćetne kiseline (TCA, 100 µL), a zatim ponovo inkubirane 1 h na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ploče su isprane destilovanom vodom i osušene na vazduhu. Rastvor sulforodamina B (0,1% u 1% sirćetnoj kiselini, 100 µL) dodat je svim bunarčićima, a potom inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nevezani sulforodamin B je uklonjen ispiranjem sa 1% sirćetnom kiselinom. Ploče su osušene na vazduhu dok je vezani sulforodamin rastvoren dodatkom 10 mM Trisa (200 µL, pH 7,4). Apsorbanca je merena na 540 nm na ELISA čitaču. Vrednosti su izražene kao GI_{50} koncentracije (Growth Inhibition – inhibicija rasta) i odgovaraju koncentraciji koja postiže 50% inhibicije rasta u humanim tumorskim ćelijskim linijama ili netumorskim primarnim ćelijama jetre.

3.7. Statistička analiza

Eksperimenti su postavljeni u tri replike, a rezultati su izraženi kao srednja aritmetička vrednost \pm standardna greška merenja. Rezultati su analizirani korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) i Tukijevog HSD testa sa $\alpha = 0,05$ korišćenjem SPSS v16.0 programa. Grafičko predstavljanje antimikrobne aktivnosti testiranih makromiceta mikrodilucionom metodom urađeno je pomoću mape raspodele (toplotna mapa; *eng.* heat map).

Varijable su predstavljene u matrici u kojoj su individualne vrednosti varijabli predstavljene preko različitih boja. Ove analize su urađene uz pomoć *R* paketa *ggplot2* (Wickham, 2009).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Identifikacija makromiceta

Mladi bazidiokarpi *Agrocybe aegerita*, *Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus* i *Polyporus squamosus* su sakupljeni na različitim lokalitetima Republike Srbije (Tabela 2.). Od ukupno 12 sakupljenih uzoraka, za dalja istraživanja su odabrani sojevi: Aa-001-2012 (*A. aegerita* 1), Ls-610-2011 (*L. sulphureus* 1), Ls-611-2011 (*L. sulphureus* 2), Ls-612-2011 (*L. sulphureus* 3), Po-241-2014 (*P. ostreatus* S), Po-242-2015 (*P. ostreatus* K) i Ps-231-2014 (*P. squamosus* 1).

Tabela 2. Proučavane vrste i sojevi makromiceta

Naučno ime	Kod	Lokalitet	Godina sakupljanja
<i>Agrocybe aegerita</i> (V.Brig.) Singer	Aa-001-2012	okolina Beograda	2012.
	Aa-002-2012	centralni Banat	2012.
<i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	Ls-609-2010	Beograd – Ada Ciganlija	2010.
	Ls-610-2011	okolina Beograda	2011.
	Ls-611-2011	istočna Srbija	2011.
	Ls-612-2011	Severna Mačva	2011.
<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq.) P.Kumm.	Po-241-2014	istočna Srbija	2014.
	Po-242-2015	gajilište Stari Slankamen	2015.
	Po-243-2015	Beograd	2015.
<i>Polyporus squamosus</i> (Huds.) Fr.	Ps-231-2014	okolina Carske bare	2014.
	Ps-232-2015	Beograd – Bežanijska kosa	2015.
	Ps-233-2015	okolina Beograda	2015.

4.2. Nutritivna svojstva testiranih makromiceta

Samonikli i komercijalno gajeni bazidiokarpi makromiceta svrstani u visoko vrednu hranu zahvaljujući specifičnom nutritivnom sastavu i visokom sadržaju biološki aktivnih supstanci. Nutritivna svojstva bazidiokarpa testiranih vrsta makromiceta su prikazana u Tabeli 3. Ugljeni hidrati su glavni nutrijenti prisutni u bazidiokarpima testiranih vrsta, a opseg vrednosti ovog parametra iznosio je 72,64 – 87,59 g/100 g suve mase što je saglasno i sa literaturnim

podacima koji ukazuju da ugljeni hidrati najčešće čine gotovo polovinu (50 - 60%) suve materije bazidiokarpa (Kalač, 2012). Uzorci *L. sulphureus* 2 i 3 su najbogatiji ugljenim hidratima (87,59 i 85,99 g/100 g suve mase), a zatim je sadržaj u opadajućem redosledu: *A. aegerita* 1 (84,50 g/100 g suve mase) > *P. ostreatus* K (80,20 g/100 g suve mase) > *P. squamosus* 1 (78,36 g/100 g suve mase) > *P. ostreatus* S (76,31 g/100 g suve mase) > *L. sulphureus* 1 (72,64 g/100 g suve mase). Kako su naveli Barroetaveña i Toledo (2017), opseg vrednosti ukupnih ugljenih hidrata jestivih makromiceta značajno varira od vrste do vrste: od 43,38 g/100 g suve mase kod *Russula olivacea* do 72,83 g/100 g suve mase kod *Boletus edulis*. Ugljeni hidrati su za makromicete značajni za skladištenje i sintezu strukturno kompleksnijih polisaharida, dok su u pogledu efekata na ljudsko zdravlje, ugljeni hidrati makromiceta važni kao prebiotici, imunomodulatori, antioksidansi i dr. (Barroetaveña i Toledo, 2017).

Rezultati hemijske analize proteina su pokazali da su testirane makromicete značajan izvor proteina. Najviša izmerena vrednost sadržaja proteina je iznosila 15,97 g/100 g suve mase u uzorku *L. sulphureus* 1, dok je najniža vrednost iznosila 5,54 g/100 g suve mase u uzorku *L. sulphureus* 2. Uzorci bazidiokarpa *P. squamosus* 1, kao i gajena i samonikla plodonosna tela bukovača (*P. ostreatus* K i S) su takođe značajan izvor proteina (10,65 g/100 g suve mase, odnosno 10,40 g/100 g suve mase i 13,42 g/100 g suve mase), dok je nizak sadržaj proteina određen kod *A. aegerita* 1 i *L. sulphureus* 3, gde su vrednosti iznosile 6,68 i 7,04 g/100 g suve mase. Dobijene vrednosti sadržaja proteina za testirane makromicete su uglavnom niže od vrednosti opsega koji su naveli Barroetaveña i Toledo (2017) od 12,00 g/100 g suve mase kod vrste *Sarcodon asparatus* do 59,40 g/100 g suve mase kod *Lepista nuda* (izuzev kod uzoraka *L. sulphureus* 1 – 15,97 g/100 g suve mase i *P. ostreatus* S – 13,42 g/100 g suve mase). Kalač (2012) navodi da su faktori koji su odgovorni za promene u distribuciji i sadržaju proteina u plodonosnom telu uglavnom nepouzdana, kao i to da prilikom termičke obrade plodonosnih tela sadržaj proteina opada (na 100 °C) dok temperatura od 40 °C ne utiče znatno na ovaj sadržaj. Različita vrednost sadržaja proteina kod uzoraka *L. sulphureus* 1, *L. sulphureus* 2 i *L. sulphureus* 3 sakupljenih sa različitih lokaliteta nije neuobičajena i može se delimično objasniti razlikama u geografskim i klimatskim uslovima pod kojima su uzorci rasli (uzorak 1 je sakupljen u okolini Beograda 2011. godine, uzorak 2 na Homoljskim planinama 2011. godine, a uzorak 3 u Zasavici 2011. godine).

Tabela 3. Nutritivna vrednost testiranih vrsta makromiceta (g/100 g suve mase ± SD)

Testirane makromicete	Ugljeni hidrati	Proteini	Masti	Pepeo	Energija (kcal/100 g suve mase)
<i>Agrocybe aegerita 1</i>	84,50 ± 0,24	6,68 ± 0,26	2,13 ± 0,02	6,69 ± 0,33	383,90 ± 1,02
<i>Laetiporus sulphureus 1</i>	72,64 ± 0,88	15,97 ± 0,13	2,35 ± 0,50	9,03 ± 0,82	375,62 ± 0,54
<i>Laetiporus sulphureus 2</i>	85,99 ± 0,43	5,54 ± 0,04	1,55 ± 0,17	6,92 ± 0,42	380,09 ± 0,59
<i>Laetiporus sulphureus 3</i>	87,59 ± 0,06	7,04 ± 0,07	1,95 ± 0,07	3,42 ± 0,09	396,07 ± 0,50
<i>Polyporus squamosus 1</i>	78,36 ± 0,66	10,65 ± 0,40	2,86 ± 0,28	8,42 ± 0,07	380,62 ± 1,20
<i>Pleurotus ostreatus S</i>	76,31 ± 0,18	13,42 ± 0,15	2,37 ± 0,01	7,91 ± 0,11	380,20 ± 0,34
<i>Pleurotus ostreatus K</i>	80,20 ± 1,00	10,40 ± 0,50	2,20 ± 0,30	7,20 ± 0,60	382,00 ± 1,00

Proteini makromiceta su specifični po tome što u primarnoj sekvenci pored neesencijalnih aminokiselina (glutamin, glutaminska kiselina), sadrže i 9 esencijalnih aminokiselina (lizin, metionin, triptofan, treonin, valin, leucin, izoleucin, histidin i fenilalanin) (Léon-Guzmán i dr., 1997; Mshandete i Cuff, 2007; Barros, 2008a). Prema navodima FAO (1991), sadržaj proteina makromiceta je ispod nivoa većine vrsta mesa i mesnih proizvoda, ali znatno iznad velikog broja namirnica biljnog porekla, mleka i mlečnih proizvoda.

Različiti literaturni izvori navode korišćenje različitih vrednosti konverzionih faktora prilikom finalnog preračunavanja sadržaja proteina u uzorcima makromiceta: N x 4,16, N x 4,38 i N x 6,25 (Bauer-Petrovska, 2001; Kalač, 2012; Barroetaveña i Toledo, 2017). Razlike u ovim vrednostima se zasnivaju na tome što se Kjeldalovom metodom u uzorcima određuje ukupni sadržaj azota, uključujući i neproteinske komponente. Kada uzorci ne sadrže ove komponente u znatnim količinama za računanje se koristi vrednost N x 6,25, dok u bazidiokarpima makromiceta koji sadrže znatne količine neproteinskog azota u formi hitina, Barroetaveña i Toledo (2017) preporučuju korišćenje konverzionog faktora N x 4,38. Suprotno tome, Bauer-Petrovska (2001) predlaže korišćenje vrednosti konverzionog faktora N x 4,16 za uzorke makromiceta, pa usled ovog neslaganja, može doći do neslaganja u sadržaju proteina istih vrsta kod kojih su za završno preračunavanje korišćeni različiti konverzioni faktori. Prilikom računanja vrednosti ukupnog sadržaja proteina po 100 g suve mase testiranih makromiceta, korišćen je konverzioni faktor N x 4,38, a dobijene vrednosti su prikazane u Tabeli 3.

Sadržaj lipida kod ispitivanih vrsta makromiceta iz Srbije je varirao u opsegu 1,55 g/100 g suve mase (*L. sulphureus* 2) do 2,86 g/100 g suve mase (*P. squamosus* 1). Komercijalni uzorak *P. ostreatus* (2,20 g/100 g suve mase) imao je sličan sadržaj lipida kao uzorak samonikle vrste (2,37 g/100 g suve mase), dok su uzorci *L. sulphureus* 1 (2,35 g/100 g suve mase), *A. aegerita* 1 (2,13 g/100 g suve mase) i *L. sulphureus* 3 (1,95 g/100 g suve mase) sadržali nisku količinu lipida. Ukupan sadržaj lipida makromiceta odnosi se na prisustvo svih klasa lipidnih jedinjenja: slobodnih masnih kiselina, monoglicerida, diglicerida, triglicerida, sterola, estra sterola i fosfolipida. Prema navodima Barroetaveña i Toledo (2017) ovaj sadržaj varira u opsegu 0,11 g/100 g suve mase kod *Agaricus campestris* do 8,02 g/100 g suve mase kod *Lactarius deliciosus*. Unos lipida putem ishrane je neophodan za balans masti i normalno funkcionisanje organizma jer lipidi imaju važnu ulogu u ljudskom organizmu kao hormoni ili njihovi prekursori, izvor

energije, a čine važne strukturne i funkcionalne komponente ćelijskih membrana (Ribeiro i dr., 2009; Barroetaveña i Toledo, 2017).

Analizirani sadržaj pepela je pokazao da ova vrednost kod testiranih makromiceta varira značajno intraspecijski, pa je u uzorcima *L. sulphureus* 1, 2 i 3 sakupljenih sa tri lokaliteta u Srbiji (Tabela 2.) iznosio 9,03, 6,92 i 3,42 g/100 g suve mase (Tabela 3.). Visok sadržaj je određen u uzorku *P. squamosus* 1 8,42 g/100 g suve mase, dok je u uzorku *A. aegerita* 1 iznosio 6,69 g/100 g suve mase. U bazidiokarpima samoniklog i komercijalno gajenog uzorka *P. ostreatus* vrednosti su iznosile 7,91 g/100 g suve mase, odnosno 7,20 g/100 g suve mase. Ovo nije u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju da je sadržaj pepela posebno nizak kod komercijalno gajenih vrsta koje rastu na supstratu definisanog hemijskog sastava pod kontrolisanim uslovima. Samonikle vrste koje rastu na raznovrsnijim supstratima obično imaju viši sadržaj pepela od gajenih (Kalač, 2013). Prema Barroetaveña i Toledo (2017), sadržaj pepela varira od 5,53 g/100 g suve mase kod *Boletus edulis* do 37,78 g/100 g suve mase kod *Russula olivacea*. Kalijum i fosfor su najčešće identifikovani mineralni elementi pepela makromiceta i njihov sadržaj može biti znatno viši nego sadržaj u biljakama, dok su magnezijum, kalcijum i natrijum prisutni u manjoj meri (Kalač, 2009; 2013). Makromicete u znatnim količinama mogu akumulirati i teške metale: gvožđe, kadmijum, olovo i dr. Nivo akumulacije zavisi od vrste, kompozicije supstrata i sredinskih faktora, a konzumiranje bazidiokarpa koji poseduju teške metale deluje toksično na ljude (Barroetaveña i Toledo, 2017).

Kalorijska vrednost testiranih makromiceta je u opsegu 375,62 kcal/100 g suve mase kod *L. sulphureus* 1 do 396,07 kcal/100 g suve mase kod *L. sulphureus* 3, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji su pokazali da je prosečna kalorijska vrednost plodonosnih tela makromiceta oko 350 - 400 kcal/kg sveže težine (Kalač, 2013). Značajni deo ugljenih hidrata većine makromiceta čine nesvarljiva dijetetska vlakna velike molekulske mase koja ne podležu varenju i apsorpciji u digestivnom sistemu, pa je njihova kalorijska vrednost niska (Kalač i dr., 2013).

Niz autora navodi da sadržaj ugljenih hidrata, proteina, masti i pepela makromiceta može značajno varirati kako inter- tako i intraspecijski, što se smatra posledicom geografskog porekla i klimatskih uslova, faze razvoja uzorka i sastava supstrata na kojem je rastao, kao i korišćene procedure za analizu (Alam i dr., 2010; Wang i dr., 2014; Fernandes i dr., 2016). Način čuvanja i

pripreme su takođe važani faktori koji određuje sadržaj nutrijenata, s obzirom da termička obrada može znatno smanjiti sadržaj makronutrijenata za razliku od sušenja ili zamrzavanja kod kojih ovaj sadržaj ostaje manje-više nepromenjen (Barros i dr., 2007d).

Podaci o nutritivnom potencijalu su pokazali da su u svežim bazidiokarpima *A. aegerita* dominantni ugljeni hidrati i proteini, dok su lipidi procentualno najmanje zastupljeni sa 0,80%, (Manzi i dr. 2004). Iako se pomenuti rezultati odnose na zastupljenost u gajenim, svežim plodonosnim telima *A. aegerita* poreklom iz Italije, oni su u saglasnosti sa dobijenim za uzorak samoniklih plodonosnih tela *A. aegerita* sa teritorije Srbije (Tabela 3.). Uzorci *L. sulphureus* različitog geografskog porekla su više puta detaljno analizirani u pogledu sadržaja nutrijenata. Prema analizama Kovács i Vetter (2015), u bazidiokarpima samoniklih uzoraka *L. sulphureus* poreklom iz Mađarske u proseku su najzastupljeniji ugljeni hidrati (74,47 g/100 g suve mase), za njima slede proteini (10,61 g/100 g suve mase), masti (2,96 g/100 g suve mase) i pepeo (6,39 g/100 g suve mase), dok su u uzorku sa Nepala dominantni lipidi (Upadhyaya, 2017). U odnosu na pomenute rezultate, uzorci *L. sulphureus* 2 i 3 sa teritorije Srbije su bili bogatiji ugljenim hidratima (85,99 g/100 g suve mase, odnosno 87,59 g/100 g suve mase), dok je uzorak poreklom iz Mađarske bogatiji u sadržaju proteina od uzoraka *L. sulphureus* 2 i 3 iz Srbije (Tabela 3.). Bazidiokarpi *P. ostreatus*, često konzumirani u ishrani, su više puta detaljno analizirani u pogledu sadržaja nutrijenata, a sveobuhvatni podaci o tome su predstavljeni u radu Deepalakshmi i Mirunalini (2014) gde se navodi da je u samoniklim bazidiokarpima *P. ostreatus* poreklom iz Bangladeša sadržaj proteina iznosio 17,00 – 42,00 g/100 g suve mase, ugljenih hidrata 37,00 – 48,00 g/100 g suve mase, lipida 0,50 – 5,00 g/100 g suve mase, vlakana 24,00 – 31,00 g/100 g suve mase, minerala 4,00 – 10,00 g/100 g suve mase. Za razliku od podataka koje su naveli Adebayo i dr. (2014) da su uzorci komercijalno gajenih bazidiokarpa *P. ostreatus* izvanredan izvor proteina (21,52%), a u znatno manjoj meri sadrže ugljene hidrate (5,89%) i masti (2,77%), uzorak bazidiokarpa komercijalno gajenog uzorka *P. ostreatus* K sa teritorije Srbije je sadržao čak dvostruko manje proteina 10,40 g/100 g suve mase (tj. 10,40%). Vrednosti nutritivnih komponenti plodonosnih tela *P. squamosus* poreklom iz Rumunije i Portugalije su saglasne sa vrednostima za uzorak *P. squamosus* sa teritorije Srbije: dominantni su ugljeni hidrati (74,22 g/100 g suve mase, odnosno 77,02 g/100 g suve mase), a za njima slede proteini (18,70 g/100 g suve mase, odnosno 17,14 g/100 g suve mase), lipidi (1,46 g/100 g suve mase, odnosno 2,69 g/100 g suve mase) i pepeo (5,70 g/100 g suve mase, odnosno 3,15 g/100 g suve

mase) (Fernandes i dr., 2016; Mocan i dr., 2017). Iako su, gotovo po pravilu, ugljeni hidrati dominantna komponenta suve mase makromiceta, mogu postojati i izuzeci, na šta ukazuje podatak Uzun i dr. (2009) da je *P. squamosus* poreklom iz Turske neobično bogat proteinima sa čak 64,70% (tj. 64,70 g/100 g suve mase) u odnosu na sadržaj ostalih makronutrijenata.

Prema podacima FAO/WHO (1989), bazidiokarpi makromiceta sadrže znatnu količinu ugljenih hidrata i proteina i na osnovi tih parametara su svrstani u kategoriju između mahunarki i mesa, dok ih nizak sadržaj masti i energetska vrednost čine izvrsnom hranom u niskokalorijskim režimima ishrane.

4.3. Sadržaj i hemijski sastav odabranih metabolita testiranih makromiceta

4.3.1. Šećeri

Rezultati analize šećera u bazidiokarpu testiranih makromiceta su pokazali prisustvo: ramnoze, fruktoze, trehaloze, manitola i glukoze, dok arabinoza nije identifikovana (Tabela 4.). U bazidiokarpu *A. aegerita* 1, trehaloza je zastupljena u znatnoj količini (12,49 g/100 g suve mase), dok je manitol prisutan u manjoj meri (0,93 g/100 g suve mase). U uzorcima bazidiokarpa *L. sulphureus* sa različitih lokaliteta u Srbiji identifikovani su i različiti šećeri. Tako, *L. sulphureus* 1 sadrži umerene količine trehaloze i manitola (4,00 g/100 g suve mase i 3,54 g/100 g suve mase), kao i fruktozu (0,46 g/100 g suve mase); *L. sulphureus* 2 ne sadrži manitol, ali sadrži glukozu kao dominantni šećer (4,22 g/100 g suve mase), za kojima slede trehaloza i fruktoza (2,89 g/100 g suve mase i 2,01 g/100 g suve mase); uzorak *L. sulphureus* 3 ne sadrži trehalozu i manitol, već glukozu i fruktozu u malim količinama (2,95 g/100 g suve mase i 0,35 g/100 g suve mase); U bazidiokarpu *P. squamosus* 1 dominantni šećer je trehaloza (7,13 g/100 g suve mase) a za njim sledi manitol (2,48 g/100 g suve mase). Najveći sadržaj trehaloze je izmeren u uzorku samonikle vrste *P. ostreatus* (32,60 g/100 g suve mase), dok je dvostruko niži sadržaj izmeren u uzorku komercijalno gajenog bazidiokarpa (16,50 g/100 g suve mase). Dobijeni rezultati su pokazali da: (1) ukupni sadržaj identifikovanih šećera testiranih makromiceta varira u širokom opsegu: 3,30 g/100 g suve mase (kod *L. sulphureus* 3) – 35,08 g/100 g suve mase (*P. ostreatus* S), kao i da postoji izražena razlika u ukupnom sadržaju šećera samoniklog i gajenog bazidiokarpa *P. ostreatus*.

Tabela 4. Sadržaj slobodnih šećera testiranih vrsta makromiceta (g/100 g suve mase; vrednost ± SD)

Testirane makromicete	Fruktoza	Trehaloza	Manitol	Glukoza	Ramnoza	Arabinoza	Ukupni sadržaj
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	n.i.*	12,49 ± 0,09	0,93 ± 0,01	n.i.	n.i.	n.i.	13,42 ± 0,08
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	0,46 ± 0,02	4,00 ± 0,12	3,54 ± 0,06	n.i.	n.i.	n.i.	8,00 ± 0,17
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	2,01 ± 0,06	2,89 ± 0,03	n.i.	4,22 ± 0,05	n.i.	n.i.	9,12 ± 0,15
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	0,35 ± 0,01	n.i.	n.i.	2,95 ± 0,01	n.i.	n.i.	3,30 ± 0,01
<i>Polyporus squamosus</i> 1	0,62 ± 0,02	7,13 ± 0,12	2,48 ± 0,24	n.i.	0,34 ± 0,01	n.i.	10,57 ± 0,33
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	0,33 ± 0,01	32,60 ± 0,63	n.i.	2,15 ± 0,06	n.i.	n.i.	35,08 ± 0,71
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	n.i.	16,50 ± 0,20	0,88 ± 0,02	n.i.	n.i.	n.i.	17,40 ± 0,20

*n.i.- nije identifikovan

Slične rezultate je predstavio Kalač (2009) navodeći da su trehaloza, manitol i glukoza dominantni šećeri u bazidiokarpima većine samoniklih vrsta makromiceta, a da sadržaj manitola varira u opsegu 0,30 – 5,50 g/100 g suve mase, trehaloze 9,30 – 42,80 g/100 g suve mase i glukoze 0,50 – 3,60 g/100 g suve mase, naveli su Vaz i dr. (2011) i Barroetaveña i Toledo (2017). Rezultati dosadašnjih istraživanja koji se odnose na sadržaj šećera proučavanih vrsta makromiceta su oskudni. Za uzorke *P. squamosus* poreklom iz Portugalije i Rumunije određen je manji sadržaj šećera (6,98 i 8,59 g/100 g suve mase) nego za uzorak poreklom iz Srbije (10,57 g/100 g suve mase), dok je trehaloza dominantan šećer u sva tri uzorka *P. squamosus* (5,25 g/100 g suve mase Portugalija, 6,81 g/100 g suve mase Rumunija i 7,13 g/100 g suve mase Srbija) (Fernandes i dr., 2016; Mocan i dr., 2017). Navedeni šećeri imaju značajne funkcije za makromicete, pa tako manitol daje čvrstinu i voluminoznost plodonosnim telima, dok trehaloza ima antioksidativni potencijal (Herdeiro i dr., 2006; Kalač, 2013). Sa aspekta povoljnih efekata na zdravlje, važno je napomenuti da manitol sadrži polovinu kalorijske vrednosti saharoze i ne povećava značajno nivo insulina u krvi zbog čega se makromicete preporučuju u ishrani dijabetičara (Barroetaveña i Toledo, 2017).

4.3.2. Tokoferoli

Bazidiokarpi testiranih vrsta iz rodova *Agrocybe*, *Laetiporus*, *Polyporus*, i *Pleurotus* analizirani su radi utvrđivanja prisustva ukupnog sadržaja različitih izoformi tokoferola (Tabela 5). Rezultati analize tokoferola su pokazali da je ukupni sadržaj tokoferola varirao u širokom opsegu, pri čemu je najviša vrednost izmerena u uzorku *L. sulphureus* 1 189,74 µg/100 g suve mase, a najniža u uzorku *L. sulphureus* 2 13,60 µg/100 g suve mase. U testiranim uzorcima identifikovane su četiri izoforme tokoferola: α-, β-, γ- i δ-tokoferol, a njihov sadržaj se razlikovao od uzorka do uzorka. Dominantna izoforma u uzorku *A. aegerita* 1 je γ-tokoferol sa 86,08 µg/100 g suve mase, za njim slede β-tokoferol sa 8,80 µg/100 g suve mase i δ-tokoferol sa 3,40 µg/100 g suve mase, dok je α-tokoferol bio najmanje zastupljen sa 2,10 µg/100 g suve mase. U uzorku *L. sulphureus* 1 je dominantan α-tokoferol (109,25 µg/100 g suve mase), a zatim γ-tokoferol (62,07 µg/100 g suve mase) i δ-tokoferol (18,42 µg/100 g suve mase), dok β-tokoferol nije identifikovan. Za razliku od uzorka 1, u uzorcima *L. sulphureus* 2 i 3 identifikovan je samo α-tokoferol i to u znatno manjoj meri nego u uzorku 1 (13,60 µg/100 g suve mase u uzorku 2 i 21,52 µg/100 g suve mase u uzorku 3). U uzorku *P. squamosus* 1 određen je sadržaj: γ-tokoferola

89,23 $\mu\text{g}/100$ g suve mase, β -tokoferola 17,17 $\mu\text{g}/100$ g suve mase, α -tokoferola 11,25 $\mu\text{g}/100$ g suve mase, dok δ -tokoferol nije prisutan u uzorku. U bazidiokarpu uzorka samonikle *P. ostreatus* zastupljen je samo α -tokoferol sa 17,47 $\mu\text{g}/100$ g suve mase, dok su u gajenom prisutni γ -tokoferol (64,00 $\mu\text{g}/100$ g suve mase) i δ -tokoferol (1,46 $\mu\text{g}/100$ g suve mase). Analize uzoraka testiranih makromiceta sakupljenih van granica Srbije su pokazali sličnu zastupljenost izoformi, ali ne i njihov sadržaj. Prema podacima Elmastas i dr. (2007), bazidiokarp *P. squamosus* poreklom iz Turske je sadržao malo α -tokoferola, dok je prema Mocan i dr. (2017), uzorak poreklom iz Rumunije sadržao znatnu količinu β -tokoferola (114,70 $\mu\text{g}/100$ g suve mase), zatim γ -tokoferola (5,30 $\mu\text{g}/100$ g suve mase), δ -tokoferola (3,70 $\mu\text{g}/100$ g suve mase) i α -tokoferola (1,54 $\mu\text{g}/100$ g suve mase). Uzorak iste vrste poreklom iz Portugalije bio je neobično bogat β -tokoferolom (1964,59 $\mu\text{g}/100$ g suve mase), dok γ -tokoferol nije zabeležen (Fernandes i dr. 2016) što nije u saglasnosti sa rezultatima analize uzorka *P. squamosus* poreklom iz Srbije gde je γ -tokoferol dominantna izoforma. Prema analizi Reis i dr. (2012b), u komercijalnom uzorku *P. ostreatus* zastupljene su α -, γ - i δ - izoforma tokoferola, što je delimično potvrđeno u uzorku gajenom u Srbiji gde su identifikovani samo γ - i δ -tokoferol. Suprotno tome, Elmastas i dr. (2007) su u uzorku samoniklog bazidiokarpa *P. ostreatus* poreklom iz Turske identifikovali samo α -tokoferol. Profil i ukupni sadržaj tokoferola u bazidiokarpima *A. aegerita* 1 i *L. sulphureus* prvi put su određeni u ovoj doktorskoj disertaciji za uzorke poreklom iz Srbije.

Višegodišnja istraživanja su pokazala da sadržaj tokoferola u makromicetama značajno varira, od 2,00 $\mu\text{g}/100$ g suve mase kod *Lepida sordida*, do čak 800,00 $\mu\text{g}/100$ g suve mase kod *Laccaria laccata* (Barroetaveña i Toledo, 2017), kao i da komercijalno gajene vrste sadrže manje tokoferola od samoniklih vrsta (Kalač, 2013). Takođe, istraživanja izvedena poslednjih godina pokazala su da su sve četiri izoforme tokoferola jednako aktivne, iako se donedavno smatralo da je α -tokoferol biološki najaktivnija izoforma (Campbell i dr., 2003; Mishima i dr., 2003; Heleno i dr., 2010). Biološki potencijal tokoferola se ogleda, pre svega, u njihovom antioksidativnom potencijalu jer ova jedinjenja interaguju sa peroksil radikalima u membranama i formiraju sa njima stabilne lipidne hidroksiperokside (Heleno i dr., 2010). Tokoferoli deluju i preventivno na formiranje radikala u membranama i tkivima bioloških sistema, pa se smatra da smanjuju rizik od degenerativnih oboljenja (malignih i kardiovaskularnih pre svega) koja se dovode u vezu s oksidativnim stresom (Heleno i dr., 2010; Lobo i dr. 2010).

Tabela 5. Sadržaj tokoferola testiranih vrsta makromiceta ($\mu\text{g}/100$ g suve mase; vrednost \pm SD)

Testirane makromicete	α -tokoferol	β -tokoferol	γ -tokoferol	δ -tokoferol	Ukupni sadržaj
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	2,10 \pm 1,10	8,80 \pm 2,20	86,08 \pm 12,90	3,40 \pm 0,20	100,38 \pm 13,81
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	109,25 \pm 3,08	n.i. *	62,07 \pm 2,70	18,42 \pm 1,31	189,74 \pm 0,93
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	13,60 \pm 1,39	n.i.	n.i.	n.i.	13,60 \pm 1,39
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	21,52 \pm 0,09	n.i.	n.i.	n.i.	21,52 \pm 0,09
<i>Polyporus squamosus</i> 1	11,25 \pm 1,11	17,17 \pm 0,27	89,23 \pm 14,76	n.i.	117,66 \pm 16,14
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	17,47 \pm 1,00	n.i.	n.i.	n.i.	17,47 \pm 1,00
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	n.i.	n.i.	64,00 \pm 2,00	1,46 \pm 0,02	66,00 \pm 2,00

* n.i.- nije identifikovan

4.3.3. Organske kiseline

U okviru ovog odeljka su predstavljeni rezultati analiza organskih, fenolnih i masnih kiselina.

4.3.3.1. Proste organske kiseline (organske kiseline)

Rezultati analize sadržaja organskih kiselina 7 testiranih uzoraka plodonosnih tela makromiceta su prikazani u Tabeli 6. U uzorku *A. aegerita* 1 je potvrđeno prisustvo četiri organske kiseline: (1) jabučne (1,82 g/100 g suve mase), (2) limunske (0,88 g/100 g suve mase), (3) fumarne (0,26 g/100 g suve mase) i (4) oksalne kiseline (0,09 g/100 g suve mase), dok kininska kiselina nije identifikovana. U uzorku *L. sulphureus* 1, dominantna je oksalna kiselina sa 2,66 g/100 g suve mase, za kojom slede limunska sa 1,24 g/100 g suve mase, fumarna sa 0,25 g/100 g suve mase i kininska sa 0,16 g/100 g suve mase, dok jabučna kiselina nije identifikovana. U uzorku 2, dominantna je oksalna kiselina (5,69 g/100 g suve mase), za kojom sledi limunska (2,06 g/100 g suve mase) dok je sadržaj fumarne kiseline isti kao u uzorku 1, a kininska i jabučna nisu identifikovane. U uzorku 3 takođe nisu identifikovane kininska i jabučna kiselina, a sadržaj oksalne, limunske i fumarne je nizak (Tabela 6.). Jabučna kiselina je bila dominantna u uzorku *P. squamosus* 1 (3,96 g/100 g suve mase), za njom slede oksalna (0,45 g/100 g suve mase) i fumarna kiselina (0,41 g/100 g suve mase), dok kininska i limunska nisu ni identifikovane. Ukupni sadržaj organskih kiselina se razlikuje u uzorcima samoniklog i komercijalnog soja *P. ostreatus* i iznosi 2,08 g/100 g suve mase kod samoniklog i 3,77 g/100 g suve mase kod komercijalnog. Ova razlika je posledica veće zastupljenosti jabučne i limunske kiseline u uzorku komercijalnog soja u odnosu na uzorak samoniklog. Ni u jednom od ispitivanih uzoraka nije zabeležena kininska kiselina, dok su oksalna i fumarna kiselina prisutne u znatno manjoj meri (Tabela 6.). Organske kiseline utiču na organoleptičke osobine, pa npr. visok sadržaj jabučne kiseline daje blago kiselkast ukus (Valentão i dr., 2005a; Ribeiro i dr., 2006; Begić-Akagić, 2014). Dosadašnja istraživanja su pokazala da organske kiseline sa aspekta aktivnosti imaju višestruki biološki potencijal: oksalna i fumarna kiselina su poznate kao antimikrobni i antitumorski agensi, a fumarna kiselina pored antimikrobnog i antitumorskog dejstva ima i antiinflamatorni i neuroprotektivni potencijal (Nagarajkumar i dr., 2005; Baati i dr., 2011). Zahvaljujući sposobnosti heliranja metala, organske kiseline (jabučna, limunska i dr.) deluju i kao antioksidansi koji imaju zaštitnu ulogu kod mnogih oboljenja povezanih sa oksidativnim stresom (Barros i dr., 2013).

Tabela 6. Sadržaj organskih kiselina testiranih vrsta makromiceta (g/100 g suve mase; vrednost ± SD)

Makromicete	Oksalna kiselina	Kininska kiselina	Jabučna kiselina	Limunska kiselina	Fumarna kiselina	Ukupni sadržaj
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	0,09 ± 0,01	n.i.*	1,82 ± 2,21	0,88 ± 0,01	0,26 ± 0,01	3,06 ± 2,23
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	2,66 ± 0,03	0,16 ± 0,01	n.i.	1,24 ± 0,06	0,25 ± 0,00	4,31 ± 0,01
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	5,69 ± 0,10	n.i.	n.i.	2,06 ± 0,07	0,25 ± 0,01	8,00 ± 0,17
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	1,57 ± 0,07	n.i.	n.i.	0,67 ± 0,10	0,05 ± 0,01	2,28 ± 0,03
<i>Polyporus squamosus</i> 1	0,45 ± 0,06	n.i.	3,96 ± 0,17	n.i.	0,41 ± 0,01	4,82 ± 0,11
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	0,20 ± 0,01	n.i.	0,77 ± 0,09	0,95 ± 0,01	0,16 ± 0,01	2,08 ± 0,08
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	0,24 ± 0,10	n.i.	1,56 ± 0,40	1,73 ± 0,20	0,24 ± 0,01	3,77 ± 0,30

*n.i. – nije identifikovan;

Kod uzoraka kod kojih je ukupni sadržaj organskih kiselina u korelaciji sa antioksidativnim potencijalom, najčešće se uzorak ističe visokim sadržajem neke organske kiseline, kojoj se i pripisuje antioksidativna aktivnost (Pereira i dr., 2009). Glavni faktor koji doprinosi *in vivo* antioksidativnoj aktivnosti organskih kiselina zapravo je kompleksno hemijsko okruženje unutar samog organizma koje diktira da li će efekti organskih kiselina biti neutralni, korisni ili štetni (Pereira i dr., 2009).

Rezultati o sadržaju organskih kiselina u plodonosnim telima *A. aegerita* su prvi put dobijeni u ovom radu, što je značajno s obzirom na višestruki biološki potencijal organskih kiselina. Uzorak *L. sulphureus* poreklom iz Rusije je produkovao pet organskih kiselina, od kojih su jabučna i limunska kiselina prisutne i u uzorku iz Srbije (Olennikov i dr., 2008; Khatua, 2017). Podaci o sadržaju organskih kiselina *P. squamosus* poreklom iz Portugalije i Rumunije prema navodima Fernandes i dr. (2015) i Mocan i dr. (2017), u skladu su sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji, iako je uzorak iz Srbije produkovao znatno više jabučne kiseline (3,96 g/100 g suve mase) nego uzorak iz Portugalije (1,33 g/100 g suve mase) ili Rumunije (2,21 g/100 g suve mase). Kako su saopštili Fernandes i dr. (2015), bazidiokarp *P. ostreatus* koji je formiran na supstratu od otpadnog papira produkovao je oksalnu, kininsku i fumarnu kiselinu čime je pored produkcije bioaktivnih jedinjenja koja imaju potencijalnu primenu u farmaciji, eliminisan i otpadni materijal.

4.3.3.2. Organske kiseline sa fenolnom grupom (fenolne kiseline)

Rezultati analize fenolnih kiselina testiranih vrsta makromiceta prikazani u Tabeli 7. su pokazali da ukupan sadržaj fenolnih kiselina varira od 0,17 mg/100 g suve mase kod uzorka *L. sulphureus* 1 do 7,74 mg/100 g suve mase kod uzorka *L. sulphureus* 2. U testiranim uzorcima makromiceta nije identifikovana galna kiselina, dok je sadržaj *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarne, cinaminske i protokatehinske kiseline bio promenljiv (Tabela 7.). U uzorku *A. aegerita* 1 detektovane su *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarna i cinaminska kiselina (najviše od svih testiranih uzoraka 1,04 mg/100 g suve mase) dok protokatehinska nije zabeležena (Tabela 7.). U testiranim uzorcima *L. sulphureus* (1, 2 i 3), pored galne kiseline nije identifikovana ni *p*-kumarna kiselina. Protokatehinska kiselina je odustvovala samo u uzorku 1, dok je u uzorcima 2 i 3 zabeležen znatan sadržaj ove kiseline (3,21 mg/100 g suve mase, odnosno 1,55 mg/100 g suve mase). Treba istaći da je jedina kiselina koja je prisutna u sva tri uzorka ove vrste *p*-hidroksibenzoeva

kiselina sa najvećim sadržajem u uzorku 2 (4,54 mg/100 g suve mase) što je ujedno i najveća izmerena vrednost u testiranim uzorcima (Tabela 7.). U uzorku *P. squamosus* 1 je određen sadržaj samo dve od pet fenolnih kiselina i to *p*-hidroksibenzoeve (0,63 mg/100 g suve mase) i cinaminske (0,13 mg/100 g suve mase). U uzorcima *P. ostreatus* S i K je izmeren mali sadržaj fenolnih kiselina, a kod oba uzorka je jedino identifikovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina (0,38 mg/100 g suve mase, odnosno 0,08 mg/100 g suve mase), dok je cinaminska kiselina zabeležena samo u uzorku komercijalnog soja (0,56 mg/100 g suve mase). Do sada publikovani rezultati koji se odnose na profil fenolnih kiselina istih makromiceta sa drugih lokaliteta potvrđuju prisustvo gore navedenih fenolnih kiselina, sa nekim izuzecima. Tako je, kako navodi Sulkowska-Ziaja (2012), u bazidiokarpu *L. sulphureus* sa teritorije Poljske zabeležen znatan sadržaj protokatehinske kiseline 1,77 mg/100 g suve mase (vrednost između uzoraka 2 i 3 sa teritorije Srbije), dok su *p*-hidroksibenzoeva i vanilinska kiselina prisutne u tragovima. U bazidiokarpima *P. squamosus* iz Portugalije i Rumunije kao dominantna je identifikovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina, (1,29 mg/100 g suve mase u portugalskom uzorku i 2,03 mg/100 g suve mase u rumunskom uzorku), što je višestruko veća vrednost od one koja je izmerena za uzorak iz Srbije (0,63 mg/100 g suve mase). Za razliku od uzorka poreklom iz Srbije, rumunski uzorak nije sadržao cinaminsku kiselinu već *p*-kumarnu kiselinu sa 0,27 mg/100 g suve mase, dok su u uzorku poreklom iz Portugalije identifikovane iste fenolne kiseline kao i uzorku iz Srbije.

Tabela 7. Sadržaj fenolnih kiselina testiranih vrsta makromiceta (mg/100 g suve mase; vrednost ± SD)

Makromicete	Protokatehinska kiselina	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	<i>p</i> -Kumarna kiselina	Cinaminska kiselina	Galna kiselina	Ukupni sadržaj
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	n.i.*	0,61 ± 0,04	0,19 ± 0,01	1,04 ± 0,02	n.i.	1,84 ± 0,04
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	n.i.	0,03 ± 0,20	n.i.	0,14 ± 1,82	n.i.	0,17 ± 1,62
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	3,21 ± 0,26	4,54 ± 0,33	n.i.	tr ^{*1}	n.i.	7,74 ± 0,58
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	1,55 ± 0,02	1,70 ± 0,16	n.i.	tr	n.i.	3,25 ± 0,13
<i>Polyporus squamosus</i> 1	n.i.	0,63 ± 0,03	n.i.	0,13 ± 0,01	n.i.	0,79 ± 0,31
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	n.i.	0,38 ± 0,11	n.i.	tr	n.i.	0,38 ± 0,11
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	n.i.	0,08 ± 0,04	n.i.	0,56 ± 0,01	n.i.	0,63 ± 0,03

*n.i. – nije identifikovana;

*¹tr – u tragovima;

U brojnim istraživanjima je eksperimentalno potvrđeno da fenolne kiseline imaju visok antioksidativni, antimikrobni i antimutageni potencijal (Elmastas i dr., 2007; Barros, 2008a; Alves i dr., 2013a). Dokazano je da se protokatehinska kiselina iz prirodnih sirovina ističe antioksidativnim (Ferreira i dr., 2009), antimikrobnim (Alves i dr., 2013a), citotoksičnim i antiinflamatornim (Semaming i dr., 2015) kao i neuroprotektivnim (An i dr., 2006) dejstvom, dok cinaminska kiselina ima izraženi antitumorski efekat na NCI-H460 malignu ćelijsku liniju humanog porekla (uzročnik kancera nemalih ćelija pluća) (Vaz i dr., 2012). Smatra se da *p*-kumarna kiselina, koja je od testiranih makromiceta izmerena samo kod uzorka *A. aegerita*, poseduje antioksidativna i antitumorska svojstva, kao i dvostruki mehanizam baktericidne aktivnosti: narušava ćelijsku membranu bakterija i vezuje se za bakterijsku DNK inhibirajući ćelijske funkcije što dovodi do njihove smrti (Lou i dr., 2012). Pored navedenih svojstava, fenolne kiseline imaju i UV protektivno dejstvo kao i insekticidnu aktivnost (Heleno i dr., 2015). Višestruku biološku aktivnost fenolne kiseline duguju specifičnoj hemijskoj strukturi jer imaju jedan/više aromatičnih prstenova sa jednom/više hidroksilnih grupa čija pozicija određuje antioksidativnu aktivnost (Barros, 2008a).

Mehanizam kojim fenolne kiseline ostvaruju *in vivo* biološku aktivnost nije još uvek u potpunosti poznat, ali ono što se zna je da nakon apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, ovi molekuli podležu reakcijama konjugacije kojima se povećava njihova hidrofilitnost i izbegavaju potencijalni toksični efekti. Nakon konjugacije, derivati se sekretuju do duodenuma, gde su u distalnim segmentima izloženi dejstvu bakterijskih enzima, naročito β -glukuronidaze (Heleno i dr., 2015). Iako se smatra da fenolne kiseline ne doprinose nutritivnoj vrednosti makromiceta, unos ovih jedinjenja na dnevnom nivou (prosečno 200 mg/danu) veoma je značajan zbog njihovog višestrukog biološkog potencijala (Clifford i Scalbert, 2000).

4.3.3.3. Masne kiseline

U proučavanim uzorcima makromiceta je identifikovano ukupno 27 masnih kiselina, a njihova zastupljenost (u %) je predstavljena u Tabeli 8. U bazidiokarpu *A. aegerita* 1 dominantna je linolna kiselina (78,40%), dok su palmitinska (13,07%), oleinska (3,03%) i stearinska kiselina (2,13%) znatno manje prisutne; ostale masne kiseline su zastupljene sa udelom manjim od 1,00%. Analiza uzoraka *L. sulphureus* 1, 2 i 3 je ukazala da su u sva tri uzorka dominantne iste kiseline, ali u različitom odnosu. U uzorku 1 polinezasićena linolna kiselina je zastupljena sa

63,27%, dok su oleinska i palmitinska kiselina zastupljene sa 14,52% i 11,68%. U uzorku 2 je sličan odnos dominantnih kiselina: dominantna je linolna (59,90%), a za njom slede oleinska (20,75%) i palmitinska kiselina (10,09%). U uzorku 3 su linolna i oleinska kiselina zastupljene približno isto (42,29% i 41,22%), dok je sadržaj palmitinske kiseline niži (8,95%). U uzorku *P. squamosus* 1 zastupljenost tri dominantne kiseline je: 52,80% (linolna kiselina), 24,64% (oleinska kiselina) i 15,54% (palmitinska kiselina). Poređenjem rezultata analize masnih kiselina samoniklog i komercijalno gajenog bazidiokarpa *P. ostreatus* zaključeno je da su linolna, palmitinska i oleinska kiselina ujednačeno zastupljene kod ova dva soja (Tabela 8.). Gotovo sve ostale zasićene i nezasićene masne kiseline su u testiranim uzorcima izmerene sa udelom manjim od 1,00% (Tabela 8). Sličan odnos nezasićenih i zasićenih masnih kiselina je naveo i Kalač (2009), kao i podatak da kod svih makromiceta dominiraju polinezasićena linolna, mononezasićena oleinska i nutritivno nepoželjna zasićena palmitinska kiselina.

Kada se analizira odnos ukupnog udela polinezasićenih, mononezasićenih i zasićenih masnih kiselina u testiranim makromicetama, može se zaključiti da u svim uzorcima dominiraju polinezasićene masne kiseline u odnosu na mononezasićene i zasićene masne kiseline (Tabela 8).

Do sada objavljeni podaci su pokazali da je *A. aegerita* iz Italije bogatiji nezasićenim masnim kiselinama nego zasićenim, a najzastupljenija nezasićena masna kiselina je linolna sa 76,00% ukupnih masnih kiselina što je u saglasnosti sa rezultatima uzorka ove vrste iz Srbije (Landi i dr. 2017). Analiza masnih kiselina uzorka *P. squamosus* poreklom iz Rumunije je ukazala da je dominantna linolna kiselina (56,55%) dok su oleinska (22,27%) i palmitinska (13,40%) znatno manje prisutne (Mocan i dr. 2017), dok je u uzorku iz Turske, sadržaj oleinske i palmitinske kiseline bio viši nego u uzorku iz Srbije (Ergönül i dr., 2013). Zengin (2015) takođe navodi visok sadržaj linolne kiseline za uzorak *P. squamosus* iz Turske u odnosu na uzorak iz Srbije (74,60%, odnosno 52,80%). Linolna kiselina je dominantna kod uzorka samoniklog bazidiokarpa *P. ostreatus* iz Turske sa 65,29%, a slično je potvrđeno i u komercijalno gajenom uzorku, u kom su dominirale linolna, palmitinska i oleinska kiselina (Ergönül i dr. 2013; Tijera-Gonzalez i dr., 2014). Navedeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za uzorke iz Srbije. Razlike u profilu masnih kiselina se smatraju posledicom variranja spoljašnjih faktora pod kojima gljiva raste, a uočena je značajna korelacija sa klimatskim uslovima, naročito temperaturom. Rast i plodonošenje komercijalno gajene bukovače na temperaturi ispod 17°C rezultovao je u porastu zastupljenosti nezasićenih masnih

kiselina u bazidiokarpu u poređenju sa bazidiokarpima koji su formirani na temperaturi iznad 17°C (Pedneault i dr., 2007). Termička obrada plodonosnih tela takođe snižava sadržaj polinezasićenih u korist mononezasićenih masnih kiselina (Barros i dr., 2007d). Literaturni pregled masnokiselinskog sastava velikog broja vrsta makromiceta ukazuje na sledeće: (1) polinezasićene masne kiseline višestruko dominiraju u odnosu na zasićene masne kiseline, (2) prisustvo neuobičajenih masnih kiselina je zanemarljivo, (3) 2-3 masne kiseline su prisutne u znatnoj količini, ostale uglavnom u tragovima, (4) prisustvo trans masnih kiselina nije potvrđeno u uzorcima (Kalač, 2009). Iako su polinezasićene masne kiseline zastupljene sa visokim udelom, njihov nutritivni doprinos je ograničen zbog niskog ukupnog sadržaja lipida (Kalač, 2009). Visok udeo polinezasićenih masnih kiselina zabeležen je i kod drugih vrsta, a najviše vrednosti su prema Barroetaveña i Toledo (2017) izmerene kod *Coprinus comatus* (74,86%), *Calvatia utriformis* (70,29%) i *Agaricus campestris* (68,97%), dok je izuzetak *Lactarius deliciosus* čije plodonosno telo sadrži značajnu količinu stearinske kiseline (Guillamón i dr., 2010). Masne kiseline su za makromicete važne kao prekursora aromatična jedinjenja, pa je linolna kiselina prekursor alkoholnog jedinjenja 1-okten-3-ol koje daje bazidiokarpima specifičnu aromu (Ribeiro i dr. 2009). Visoka zastupljenost nezasićenih masnih kiselina u makromicetama je veoma važna sa aspekta ljudskog zdravlja – u ovom smislu se posebna pažnja pridaje prisustvu esencijalnih masnih kiselina (linolna i α -linoleinska) koje ljudi ne mogu sintetisati, ali je njihov unos putem namirnica neophodan za optimalno funkcionisanje i balans masti u organizmu (Ribeiro i dr., 2009). Simpoulos (1999) navodi da su masne kiseline važne zbog antiinflamatornih, hipolipidemijskih i vazodilatatornih svojstava kao i da deluju preventivno kod kardiovaskularnih oboljenja i hipertenzije, dok Su i dr., (2013) navode da nezasićene masne kiseline mogu odložiti razgradnju ugljenih hidrata u intestinumu i sprečiti porast nivoa glukoze nakon obroka.

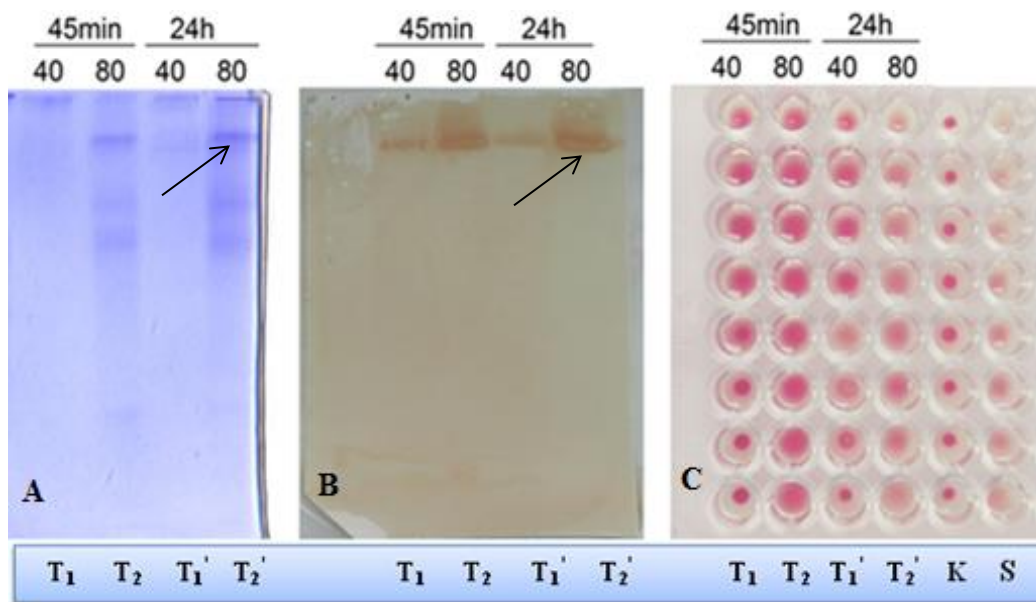
Tabela 8. Sadržaj masnih kiselina (%) u testiranim vrstama makromiceta ± SD

Masne kiseline	<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2
Heksanska (C6:0)	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,67 ± 0,01
Kaprilna (C8:0)	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,01
Dekanska (C10:0)	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,01
Laurinska (C12:0)	0,06 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01
Miristinska (C14:0)	0,23 ± 0,00	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Miristoleinska (C14:1)	0,01 ± 0,00	n.i.	n.i.
Pentadekanska (C15:0)	0,43 ± 0,00	1,41 ± 0,03	1,67 ± 0,01
Palmitinska (C16:0)	13,07 ± 0,11	11,68 ± 0,19	10,09 ± 0,04
Palmitoleinska (C16:1)	0,29 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,16 ± 0,01
Heptadekanska (C17:0)	0,25 ± 0,00	1,94 ± 0,04	1,53 ± 0,01
Stearinska (C18:0)	2,13 ± 0,02	3,17 ± 0,02	1,74 ± 0,01
Oleinska (C18:1n9)	3,03 ± 0,00	14,52 ± 0,02	20,75 ± 0,06
Linolna (C18:2n6c)	78,40 ± 0,10	63,27 ± 0,26	59,90 ± 0,13
α-Linoleinska (C18:3n3)	0,07 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Arahidinska (C20:0)	0,49 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,10 ± 0,01
cis-11-Eikozenoinska (C20:1)	0,05 ± 0,00	0,51 ± 0,01	0,44 ± 0,01
cis-11,14-Eikozadienska (C20:2)	0,03 ± 0,00	n.i.	0,11 ± 0,01
Eikozatetraenoin (C20:3n3 + C21:0)	0,08 ± 0,00	0,17 ± 0,01	n.i.
Eikozapentaenoinska (C20:5n3)	0,02 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,61 ± 0,01
Heneikozanoinska (C21:0)	n.i.	n.i.	0,23 ± 0,01
Behenska (C22:0)	0,40 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Erukinska (C22:1n9)	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,01	n.i.
Trikozilna (C23:0)	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,07 ± 0,01
Dokozaheksaenoinska (C22:6n3)	n.i.	n.i.	0,19 ± 0,01
Lignocerinska (C24:0)	0,45 ± 0,01	0,74 ± 0,00	0,41 ± 0,01
Ceramid (C24:1)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	n.i.
Ukupne ZMK (% ukupnih MK)	17,93 ± 0,07	20,54 ± 0,27	17,61 ± 0,07
Ukupne NZMK (% ukupnih MK)	3,47 ± 0,03	15,32 ± 0,04	21,34 ± 0,06
Ukupne PNMK (% ukupnih MK)	78,60 ± 0,10	64,14 ± 0,23	61,05 ± 0,13

	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Heksanska (C6:0)	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,61 ± 0,01	n.i.
Kaprilna (C8:0)	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,07 ± 0,01	n.i.
Dekanska (C10:0)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,01	n.i.
Laurinska (C12:0)	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,11 ± 0,01	n.i.
Tridekanska (C13:0)	n.i.	0,01 ± 0,00	n.i.	n.i.
Miristinska (C14:0)	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,51 ± 0,01	n.i.
Pentadekanska (C15:0)	0,89 ± 0,03	1,14 ± 0,04	1,75 ± 0,05	n.i.
Palmitinska (C16:0)	8,95 ± 0,08	15,54 ± 0,22	14,34 ± 0,05	14,70 ± 0,40
Palmitoleinska (C16:1)	0,29 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,58 ± 0,01	n.i.
Heptadekanska (C17:0)	1,40 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01	n.i.
Stearinska (C18:0)	1,31 ± 0,01	1,62 ± 0,00	1,29 ± 0,01	3,50 ± 0,10
Oleinska (C18:1n9)	41,22 ± 0,10	24,64 ± 0,07	10,14 ± 0,06	17,80 ± 0,10
Linolna (C18:2n6c)	42,29 ± 0,06	52,80 ± 0,16	66,96 ± 0,06	54,70 ± 0,20
α-Linoleinska (C18:3n3)	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,13 ± 0,01	n.i.
Arahidinska (C20:0)	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01	n.i.
cis-11-Eikozenoinska (C20:1)	0,35 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	n.i.
cis-11,14-Eikozadienska (C20:2)	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	n.i.
Eikozatetraenoin (C20:3n3 + C21:0)	n.i.	0,12 ± 0,01	n.i.	n.i.
Heneikozanoinska (C21:0)	0,35 ± 0,01	n.i.	0,33 ± 0,02	n.i.
Eikozapentaenoinska (C20:5n3)	0,80 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,75 ± 0,01	n.i.
Behenska (C22:0)	0,24 ± 0,01	0,66 ± 0,01	0,21 ± 0,01	n.i.
Erukinska (C22:1n9)	n.i.	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	n.i.
Trikozilna (C23:0)	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,01	n.i.
Dokozaheksaenoinska (C22:6n3)	0,25 ± 0,01	n.i.	0,16 ± 0,01	n.i.
Lignocerinska (C24:0)	0,72 ± 0,02	0,81 ± 0,04	0,16 ± 0,01	n.i.
Ceramid (C24:1)	n.i.	0,48 ± 0,03	1,03 ± 0,01	n.i.
Ukupne ZMK (% ukupnih MK)	14,47 ± 0,18	20,69 ± 0,22	19,76 ± 0,01	24,90 ± 0,30
Ukupne NZMK (% ukupnih MK)	41,87 ± 0,11	25,97 ± 0,05	12,15 ± 0,06	18,90 ± 0,10
Ukupne PNMK (% ukupnih MK)	43,66 ± 0,07	53,34 ± 0,07	68,08 ± 0,06	56,20 ± 0,20

4.3.4. Lektini

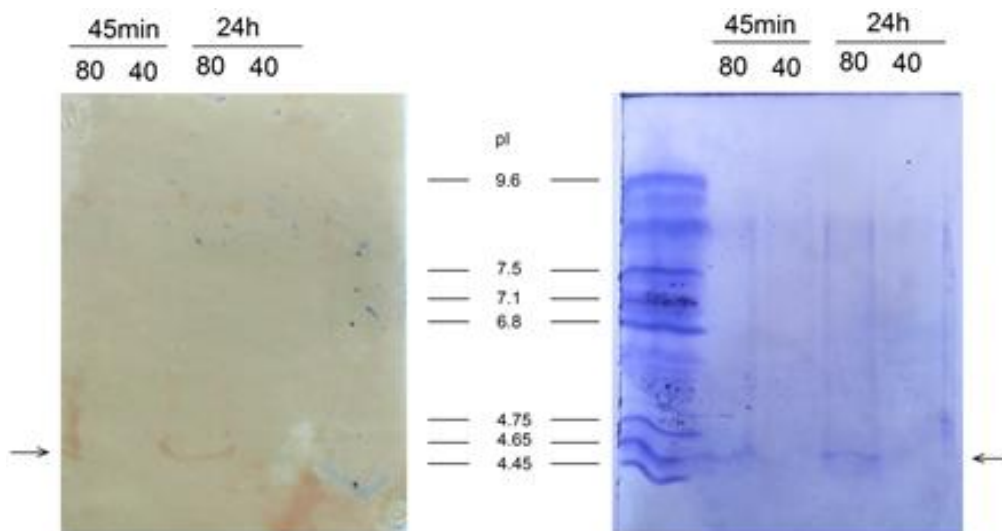
Lektini su pokazali brojne biološke aktivnosti: citotoksičnu, antiproliferativnu, insekticidnu, antiviralnu i dr. (Ng, 2004; Akkouch i dr., 2015; Singh i dr., 2015a). Poznato je da gljive predstavljaju bogat izvor lektina i to kako makromicete tako i mikromicete i kvasci, ali do sada ne postoje podaci o lektinima izolovanim iz makromiceta sa teritorije Srbije. Radi ispitivanja doprinosa lektina zabeleženoj biološkoj aktivnosti ekstrakta *Laetiporus sulphureus* 1, pristupilo se njegovom prečišćavanju i karakterizaciji prema metodi Tateno i Goldstein, (2003). Nakon ekstrakcija tokom 45 min i 24 h, proteinske smeše su frakcionisane taloženjem sa AS u cilju razdvajanja frakcija koje su siromašne i frakcija koje su bogate lektinom. Frakcionisanje je izvedeno na zasićenjima od 0 - 40% i 40 - 80%, a zatim su uzorci dijalizovani kako bi se uklonio amonijum sulfat. Dobijeni uzorci su označeni kao T₁ i T₂ (nakon ekstrakcije tokom 45 min) i T₁' i T₂' (nakon ekstrakcije tokom 24 h) i oni su dalje korišćeni u testu hemaglutinacije (za potvrdu prisustva lektina) i nativne PAGE.



Slika 8. Utvrđivanje prisustva i aktivnosti lektina u bazidiokarpu *Laetiporus sulphureus* 1. A - gel obojen CBB bojom nakon nativne PAGE; B - trake aglutiniranih tripsinizovanih eritrocita; C - nivo hemaglutinacije ekstrakata u „V“ ploči; strelicama je označeno da najintenzivnija traka sa gela odgovara aglutiniranoj traci eritrocita poreklom od lektina.

Rezultati hemaglutinacije su ukazali na veću aktivnost lektina u frakciji zasićenoj na 80% (Slika 8C), jer su uzorci T_1 i T_1' pokazali aktivnost do bunarčića br. 5 (titar 2^5 ili 1:32), a uzorci T_2 i T_2' do bunarčića br. 8 (titar 2^8 ili 1:256). Dobijeni uzorci su zatim analizirani nativnom poliakrilamidnom elektroforezom nakon čega su proteini obojeni CBB bojom. Slab intenzitet obojenih traka na zasićenju 40% (uzorci T_1 i T_1') je ukazao da je sadržaj ekstrahovanih proteina nizak, dok je jača obojenost T_2 i T_2' ukazala na veću koncentraciju proteina (Slika 8A.). Bojenje CBB bojom je dalo informaciju o ukupnim proteinima, dok je lektinska aktivnost detektovana u formi aglutiniranih eritrocita (traka na membrani) ukazala na prisustvo lektina u uzorcima (Slika 8B.). Poređenjem traka (položaja i intenziteta aglutinirane trake) na NC membrani sa proteinima obojenim CBB-om na gelu, zaključeno je da je u svim frakcijama dominantan samo jedan lektin. Sudeći po intenzitetu aglutinirane trake, lektin je prisutan u većoj koncentraciji u frakciji ekstrakta zasićenog na 80%, što je saglasno i sa rezultatima dobijenim u testu hemaglutinacije (veći titar aktivnosti za uzorke T_2 i T_2' , Slika 8C.). Na osnovu sličnosti u intenzitetu traka dobijenih nakon bojenja CBB-om, zaključeno je da vremenski okvir trajanja ekstrakcije (45 min i 24 h) nije bio od značajnog uticaja na prinos ekstrahovanih proteina i samog lektina.

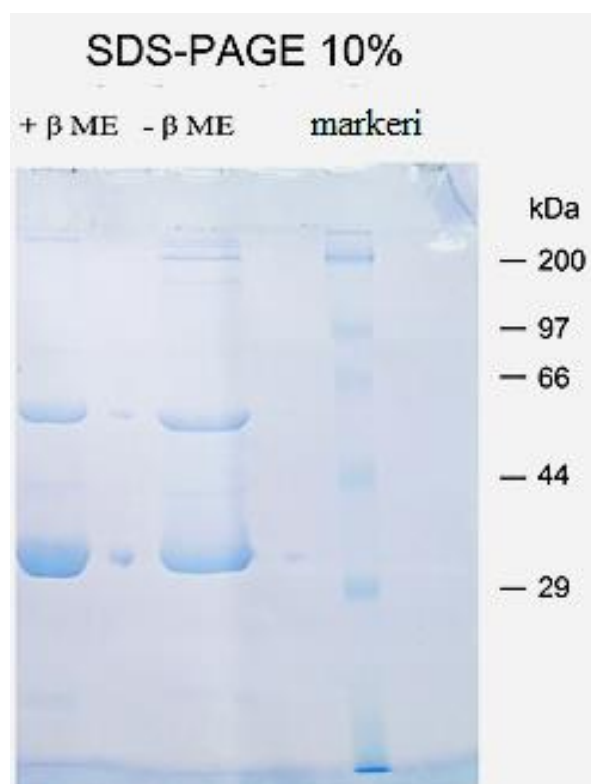
Da bi se ustanovilo prisustvo potencijalnih lektinskih izoformi i odredila njihova pI vrednost, izoelektrofokuseranje je izvedeno korišćenjem sva četiri uzorka (Slika 9).



Slika 9. Izoelektrofokuseranje. Levo: NC membrana nakon inkubacije sa tripsinizovanim eritrocitima; desno: gel nakon IEF obojen CBB bojom. Korišćeni su standardi opsega pI 4,45 – 9,6

Bojenje gela CBB-om je pokazalo prisustvo više proteinskih traka, dok je nakon inkubacije membrane sa tripsinizovanim eritrocitima formirana samo jedna traka, što je ukazalo na prisustvo samo jedne lektinske forme. Poređenjem sa trakama standarda, zaključeno je da prisutni lektin ima pI vrednost ~ 4,6.

Imajući u vidu rezultate dobijene u nativnoj PAGE i IEF, u daljim eksperimentima karakterizacije lektina korišćen je samo uzorak T₂'. Za SDS-PAGE, uzorak je pripremljen bez ili sa raskidanjem potencijalnih disulfidnih mostova tj. u neredukujućim i redukujućim uslovima (u odsustvu ili prisustvu β -ME). Dobijeni rezultati su pokazali prisustvo dve dominantne trake molekulske mase od ~ 30 i ~ 60 kDa (Slika 10.).



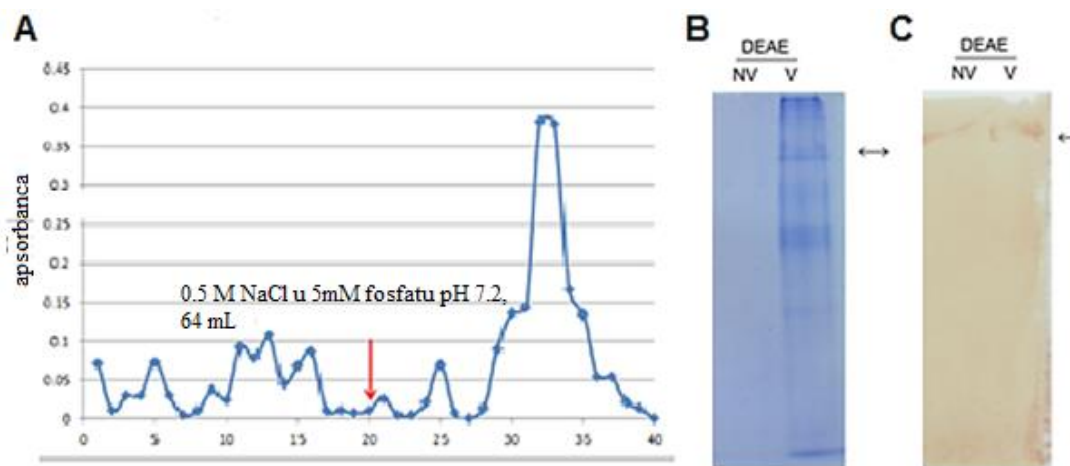
Slika 10. SDS elektroforeza u redukujućim i neredukujućim uslovima (+ β ME i - β ME). Gel je obojen CBB bojom, a standardi molekulske mase su prikazani desno

Identične pozicije traka prilikom elektroforeze za oba tipa uzorka pokazale su da nedostatak β -ME u pripremi uzorka nije promenio obrazac traka, što ukazuje na odsustvo disulfidnih veza. Dobijeni rezultati su kritički analizirani, s obzirom da su literaturni podaci koji se odnose na strukturu i molekulske mase lektina izolovanog iz *L. sulhureus* različiti. Dok su

Konska i dr. (1994) naveli da je lektin tetramer građen od subjedinica molekulske mase 36 kDa i 60 kDa, Tateno i Goldstein (2003) su saopštili da je isti lektin homotetramer subjedinica molekulske težine 35 kDa. Konačno, Mancheño i dr. (2005) su na osnovu kristalografske strukture pokazali da je lektin homoheksamer građen od subjedinica molekulske mase od 35 kDa. Dobijeni podaci za lektin sa teritorije Srbije su u saglasnosti sa podacima koje su saopštili Konska i dr. (1994), mada ukoliko se uzmu u obzir najpouzdaniji podaci kristalografske strukture da je lektin homoheksamer građen od 6 subjedinica molekulske mase 35 kDa, traka od ~ 60 kDa u uzorku iz Srbije može se interpretirati i kao zaostali dimer.

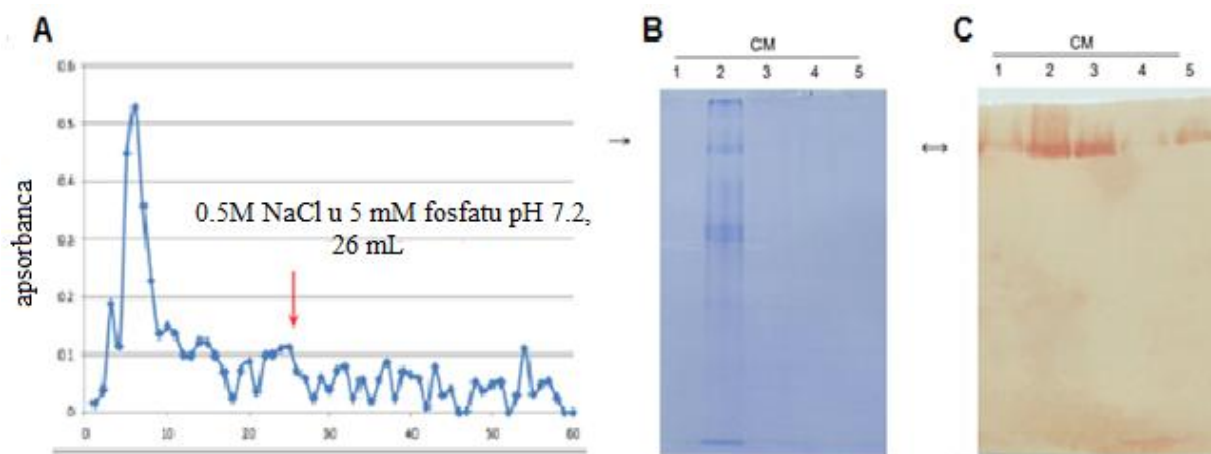
4.3.4.1. Izolacija lektina

Prisustvo proteina u frakcijama nakon jonoizmenjivačke hromatografije na DEAE smoli je praćeno u spot testu sa BCA kompletom kao i merenjem apsorbance frakcija na 560 nm. Proteini nisu bili detektovani u nevezanim (NV) frakcijama, ali jesu u eluiranim (V), a nakon hemaglutinacionog testa, u frakcijama je utvrđeno i prisustvo lektina (Slika 11A.). Odsustvo proteina u nevezanoj i njihovo prisustvo u vezanoj frakciji je konačno potvrđeno bojenjem gela CBB-om nakon native PAGE. Nakon transfera proteina sa gela na NC membranu i inkubacije sa tripsinizovanim eritrocitima, potvrđeno je prisustvo lektina i to u vezanoj frakciji (Slika 11B i C.).



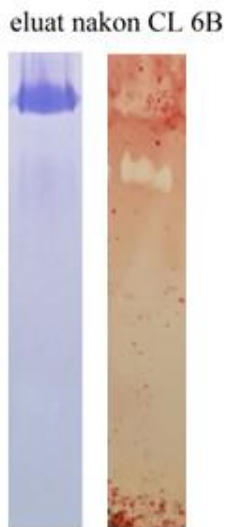
Slika 11. Jonoizmenjivačka hromatografija na DEAE sefarozi. A) vrednosti apsorbance (A_{560}) nevezanih (NV) i vezanih (V) frakcija; (B) Gel obojen CBB – om nakon native PAGE; (C) aglutinirane trake eritrocita na NC membrani nakon inkubacije sa tripsinizovanim eritrocitima

Prisustvo proteina u frakcijama je i u slučaju jonoizmenjivača CM sefaroze praćeno u spot testu sa BCA kompletom kao i merenjem apsorbance frakcija na 560 nm. Povećane vrednosti apsorbance koje su ukazale na prisustvo proteina su identifikovane ovog puta u nevezanim frakcijama što je i potvrđeno nakon native PAGE (Slika 12A. i 12B.). U testu hemaglutinacije i nakon inkubacije sa tripsinizovanim eritrocitima je dokazano da su u slučaju CM smole nevezane frakcije bile bogate lektinima (Slika 12C). Ovako dobijeni rezultati su potvrdili rezultate dobijene nakon hromatografije na DEAE jonoizmenjivaču.



Slika 12. Jonoizmenjivačka hromatografija na CM sefarozi. A) vrednosti apsorbance (A_{560}) nevezanih i vezanih frakcija; (B) Gel obojen CBB – om nakon native PAGE; (C) aglutinirane trake eritrocita na NC membrani nakon inkubacije sa tripsinizovanim eritrocitima.

Posle delimične karakterizacije, lektin je izolovan po metodi Tateno i Goldstein (2003), a čistoća lektina je potvrđena nakon native PAGE i inkubacije NC membrane sa tripsinizovanim eritrocitima (Slika 13.). Pozicija aglutiniranih traka eritrocita na NC membrani odgovara poziciji proteina identifikovanih CBB-om na gelu. Visoka koncentracija prečišćenog lektina uzrokovala je hemolizu eritrocita, zbog čega se ne vide jasne granice traka aglutiniranih eritrocita, a ova aktivnost lektina iz *L. sulphureus* je poznata u literaturi od ranije (Tateno i Goldstein, 2003).



Slika 13. Nativna elektroforeza nakon afinitetne hromatografije na CL6B. Levo: bojenje CBB bojom. Desno: hemaglutinacija na NC sa tripsinizovanim eritrocitima

Nakon afinitetne hromatografije i potvrde nativnom PAGE, dobijeni uzorak lektina iz *L. sulphureus* 1 je liofilizovan i određen njegov prinos. Iz 100 g bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 dobijeno je 15 mg čistog lektina, što je znatno iznad vrednosti koju su dobili Mancheño i dr. (2005) za isti lektin - 7 mg/100 g svežeg bazidiokarpa.

4.4. Biološke aktivnosti testiranih makromiceta

Radi procene biološkog potencijala, testirane makromicete su analizirane u pogledu antioksidativne, antimikrobne i citotoksične aktivnosti.

4.4.1. Antioksidativna aktivnost

Za procenu *in vitro* antioksidativnog potencijala makromiceta korišćene su DPPH \cdot , fericijanid/Prusko plavo, β -karoten/linolna kiselina i TBARS metoda, dok su rezultati predstavljeni u mg/mL preko EC₅₀/EC_{0,5} vrednosti (Tabela 9.). Vrednost EC₅₀ je koncentracija ekstrakta koja odgovara vrednosti 50% antioksidativne aktivnosti u testovima DPPH \cdot , TBARS i β -karoten/linolna kiselina, dok vrednost EC_{0,5} predstavlja koncentraciju ekstrakta koja odgovara vrednosti 0,5 apsorbance u fericijanid/Prusko plavo metodi. Takođe, u proučavanim vrstama makromiceta određen je ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja i izražen u mg GAE/g ekstrakta.

Ekstrakt plodonosnog tela *L. sulphureus* 1 imao je najveću sposobnost neutralizacije DPPH· radikala (EC₅₀ vrednost od 6,80 mg/mL), dok su ekstrakti *P. squamosus* 1, *L. sulphureus* 2 i *P. ostreatus* K imali nizak potencijal hvatanja DPPH· (EC₅₀ vrednosti su iznosile 13,57 mg/mL, 17,14 mg/mL i 17,80 mg/mL). Ekstrakt *A. aegerita* 1 je delovao umereno efikasno u DPPH· testu, što pokazuje EC₅₀ vrednost 7,23 mg/mL, dok su uzorci *L. sulphureus* 3 i *P. ostreatus* S pokazali nešto slabiju aktivnost od pomenutog ekstrakta (EC₅₀ su iznosile 8,84 mg/mL, odnosno 9,31 mg/mL).

Analiza EC₅₀ vrednosti u testu β-karoten/linolna kiselina je pokazala da ekstrakti svih testiranih makromiceta imaju umerenu antioksidativnu aktivnost (opseg vrednosti se kretao od 5,60 mg/mL za *P. ostreatus* K do 9,66 mg/mL za *P. ostreatus* S), izuzev uzorka *L. sulphureus* 1 koji je pokazao veoma dobru aktivnost (EC₅₀ je 3,56 mg/mL).

Rezultati TBARS analize su demonstrirali izuzetnu aktivnost ekstrakata u pogledu lipidne peroksidacije, a najbolja aktivnost je uočena za uzorak *L. sulphureus* 3 EC₅₀ 0,25 mg/mL U poređenju sa ostalim metodama procene antioksidativne aktivnosti, ova metoda je dala najbolje rezultate za sve testirane vrste.

Isti uzorci su u korišćenim testovima pokazali različit antioksidativni potencijal. Ekstrakt *A. aegerita* 1 koji je ispoljio umerenu sposobnost hvatanja DPPH· i umerenu inhibiciju izbeljivanja β-karotena je u TBARS protokolu pokazao izuzetnu aktivnost (EC₅₀ 0,39 mg/mL), a slično je uočeno i za rezultate redukcione sposobnosti (EC_{0,5} 2,66 mg/mL). Uzorak *L. sulphureus* 3 koji je bio najbolji antioksidans od svih testiranih makromiceta u TBARS testu uz EC₅₀ vrednost 0,25 mg/mL, pokazao je veoma slabu redukcionu sposobnost (EC_{0,5} 23,78 mg/mL). Suprotno tome, slab antioksidativni potencijal određen TBARS metodom su pokazali uzorci *P. squamosus* 1 (EC₅₀ 2,03 mg/mL) i *P. ostreatus* K (EC₅₀ 2,40 mg/mL), pa ipak, ove vrednosti su niže nego sve ostale EC₅₀ vrednosti dobijene u ostalim protokolima.

Troloks koji je korišćen kao pozitivna kontrola u svim protokolima je delovao efikasnije od testiranih makromiceta, u opsegu vrednosti EC₅₀ = 0,02 – 0,04 mg/mL. Imajući u vidu štetne efekte često korišćenih sintetskih antioksidanasa (prema Carocho i Ferreira, 2013), svaki pozitivan rezultat ukazuje na visok potencijal makromiceta je veoma važan.

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja određen je u kolorimetrijskoj reakciji sa Folin-Ciocalteu (FC reagens dalje u tekstu) reagensom. Rezultati ukupnih fenola za testirane vrste

makromiceta pokazuju da je u uzorku *A. aegerita* 1 izmerena najviša vrednost ukupnih fenola (17,36 mg GAE/g ekstrakta), a za njim slede *L. sulphureus* 1 (15,89 mg GAE/g ekstrakta), komercijalno gajeni *P. ostreatus* (12,70 mg GAE/g ekstrakta) i *P. squamosus* 1 (9,53 mg GAE/g ekstrakta). U uzorcima *L. sulphureus* 2 i 3 su izmerene daleko niže vrednosti ukupnih fenola nego u uzorku 1 i iznosile su 3,02 mg GAE/g ekstrakta, odnosno 0,75 mg GAE/g ekstrakta. Upporedna analiza ukupnog sadržaja fenola *P. ostreatus* S i K pokazala je da samonikli soj sadrži znatno manje fenola (2,11 mg GAE/g ekstrakta) nego komercijalni (12,70 mg GAE/g ekstrakta).

Za dalju analizu dobijenih rezultata ukupnih fenola kod testiranih makromiceta potrebno je imati u vidu da iako je metoda određivanja ukupnih fenola sa FC reagensom najčešće korišćena, ima i neke nedostatke. Naime, FC reagens kolorimetrijski reaguje i sa nefenolnim jedinjenjima (npr. askorbinska kiselina), pa dobijene vrednosti ukupnih fenola mogu biti precenjene (Padda i Picha, 2007). Upporedna analiza sa drugim literaturnim podacima može biti otežana jer se za izražavanje ukupnog sadržaja fenola u literaturi koriste različite vrednosti: suva težina, sveža težina, ekstrakt, pa u zavisnosti od toga za jednu vrstu mogu biti dostupne i različite vrednosti (Ferreira i dr., 2009). Tako *Helvella crispa* poreklom iz Indije ima najveći sadržaj fenola izražen po gramu ekstrakta (34,65 mg/g) dok *Sparassis crispa* poreklom iz Koreje ima najveću vrednost izraženu po suvoj težini (0,76 mg/g). Rezultati Ferreira i dr. (2009) su pokazali da makromicete u znatnoj meri sadrže fenole, pa je u uzorku *Lentinus squarulosus* izmereno 15,00 mg GAE/g ekstrakta, a u uzorku *Morchella conica* čak 16,90 mg GAE/g ekstrakta, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji.

Testirane makromicete su pokazale manje ili više izražen antioksidativni potencijal u dosadašnjim istraživanjima. Prema podacima Lo i Cheung (2005), etil-acetatna frakcija ekstrakta bazidiokarpa *A. aegerita* pokazala je visok kapacitet hvatanja radikala u ABTS testu, a kako je utvrđena značajna korelacija između ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja i frakcija/subfrakcija ekstrakta, zaključeno je da su za antioksidativnu aktivnost najverovatnije odgovorna fenolna jedinjenja. Mujić i dr. (2010) su saopštili da je među testiranim jestivim vrstama, etanolni ekstrakt *A. aegerita* pokazao najviši antioksidativni potencijal koji su autori takođe doveli u vezu sa visokim sadržajem fenola (23,07 mg GAE/g ekstrakta za pomenuti uzorak), mada su još višu vrednost ukupnih fenola za istu vrstu izmerili Landi i dr. (2017) – 39,60 mg GAE/g ekstrakta. Ovo je više nego dvostruko veća vrednost od one koja je dobijena za uzorak u ovoj doktorskoj disertaciji (17,36 mg GAE/g ekstrakta) i verovatno je posledica različite pripreme ekstrakta za

analizu. Naime, uzorak sa višim sadržajem fenola je pripremljen ultrazvučnom maceracijom što je možda omogućilo bolju ekstrakciju fenolnih jedinjenja.

Različiti autori su nizom *in vitro* testova dokazali visok antioksidativni kapacitet etanolnog i polisaharidnog ekstrakta bazidiokarpa *L. sulphureus* što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji, a utvrđeno je i da metoda ekstrakcije i sadržaj ukupnih fenola značajno utiču na nivo antioksidativne aktivnosti *L. sulphureus* (Turkoglu i dr., 2006; Klaus, 2011; Petrović i dr., 2014). Acharya i dr. (2016) su naveli je metanolni ekstrakt bazidiokarpa *L. sulphureus* pokazao bolji antioksidativni kapacitet u DPPH• testu od uzoraka proučavanih u ovoj doktorskoj disertaciji (EC₅₀ za DPPH• je iznosila 0,11 mg/mL, dok je redukujuća sposobnost iznosila 0,26 mg/mL), a slične rezultate su pokazali i Kim i dr. (2012) za metanolni ekstrakt *L. sulphureus* var. *miniatus* u ABTS i DPPH testovima. Ubedljivo najbolju antioksidativnu aktivnost su pokazali Kolundžić i dr. (2016) navodeći da je metanolni ekstrakt *L. sulphureus* pokazao izuzetnu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u DPPH testu uz IC₅₀ vrednost 0,66 mg/mL. Ukupni sadržaj fenola za pomenuti uzorak iznosio je 14,10 mg GAE/g ekstrakta, a autori su naveli da je visok antioksidativni potencijal posledica efikasne sukcesivne ekstrakcije sa nizom rastvarača različite polarnosti koja je dovela do boljeg razdvajanja komponenti sa antioksidativnim efektom.

Analize rezultata brojnih autora pokazale su da ekstrakti *P. squamosus* imaju značajan antioksidativni potencijal (Elmastas i dr., 2007, Akata i dr., 2012, Fernandes i dr., 2016, Mocan i dr., 2017). Najveći antioksidativni potencijal je pokazao uzorak *P. squamosus* poreklom iz Rumunije (u TBARS testu EC₅₀ je iznosila 0,22 mg/mL) (Mocan i dr., 2017), što je znatno bolja antioksidativna aktivnost od izmerene za uzorak iz Srbije (u TBARS testu EC₅₀ je iznosila 2,03 mg/mL), dok je uzorak iz Portugalije pokazao nešto slabiji potencijal (Fernandes i dr., 2016). Komercijalni sojevi *P. ostreatus* su se pokazali efikasnim u neutralizaciji slobodnih radikala, redukcionoj sposobnosti i prevenciji lipidne peroksidacije, na šta ukazuju rezultati Vamanu (2013), Adebayo i dr. (2014) i Rezaeian i dr. (2015), mada je poznata i umerena antioksidativna aktivnost bazidiokarpa *P. ostreatus* koji su gajeni na različitim supstratima koja je verovatno posledica umerenog sadržaja fenola 3,15 - 6,24 mg GAE/g suvog ekstrakta (Singh i dr., 2015b). Suprotno tome, različiti ekstrakti samoniklih bazidiokarpa *P. ostreatus* su pokazali visok kapacitet neutralizacije DPPH• radikala i znatnu količinu ukupnih fenola i flavonoida (Ejelonu i dr., 2013; Elbatrawy i dr., 2015; Mircea i dr., 2015; Smolskaite i dr., 2015; Khan i dr., 2016).

Chirinang i Intarapichet (2009) su proučavajući antioksidativnu aktivnost vodenog i etanolnog ekstrakta bazidiokarpa *P. ostreatus* odredili EC₅₀ vrednosti koje indikuju veći antioksidativni potencijal vodenog ekstrakta u odnosu na etanolni (11,56 mg/mL odnosno 31,75 mg/mL).

U literaturi se često navodi da ukupni sadržaj fenola koreliše sa stepenom antioksidativne aktivnosti što je samo delimično potvrđeno u rezultatima ove doktorske disertacije. Tako, uzorak *A. aegerita* 1 koji je imao relativno nizak sadržaj fenolnih kiselina (1,84 mg/100 g suve mase), imao je visoki ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja 17,36 mg GAE/g ekstrakta (ovo uključuje značajno prisustvo drugih fenolnih jedinjenja) i pokazao je izuzetnu antioksidativnu aktivnost, naročito mereno TBARS metodom. Uzorak *L. sulphureus* 1 je imao najveću sposobnost neutralizacije DPPH• radikala uz EC₅₀ vrednost od 6,80 mg/mL, dok su uzorci *P. squamosus* 1, *L. sulphureus* 2 i *P. ostreatus* K pokazali nisku antioksidativnu sposobnost merenu ovom metodom (EC₅₀ vrednosti su iznosile 13,57 mg/mL, 17,14 mg/mL i 17,80 mg/mL). Uzorci *L. sulphureus* 1, 2 i 3 sakupljeni na različitim lokalitetima su sadržali značajno različite vrednosti ukupnih fenola (15,89 mg GAE/g ekstrakta, 3,02 mg GAE/g ekstrakta i 0,75 mg GAE/g ekstrakta), što je delimično saglasno sa rezultatima antioksidativne aktivnosti i ukazuje da u ostvarivanju antioksidativnog potencijala učestvuju i druga nefenolna jedinjenja, kao npr. organske kiseline, tokoferoli i dr.

Hemijske analize niza makromiceta su ih prepoznale kao izvor brojnih jedinjenja sa antioksidativnim potencijalom uključujući: fenolna jedinjenja, organske kiseline, tokoferole, karotenoide i dr., a mehanizmi kojima ona ostvaruju antioksidativnu aktivnost su višestruki i zavise od hemijske strukture (Ferreira i dr., 2009; Rathee i dr., 2012; Stajić i dr., 2013). Fenolna jedinjenja na primer, sadrže niz hidroksilnih grupa vezanih za fenolni prsten koje se smatraju odgovornim za antioksidativnu aktivnost. U gastrointestinalnom traktu, fenoli podležu modifikacijama (metilaciji i glukuronidaciji) koje smanjuju broj hidroksilnih grupa, a to za posledicu ima smanjenje njihove antioksidativne aktivnosti (Heleno i dr., 2015). Međutim, Serafini i dr. (2000) su saopštili da uprkos ovim modifikacijama, neki fenolni metaboliti zadržavaju antioksidativnu aktivnost i u *in vivo* sistemima.

Poznato je da izlaganje plodonosnih tela temperaturi od 100 °C može znatno sniziti sadržaj polifenola (i antioksidativnu aktivnost) jer visoka temperatura razlaže fenolni prsten, ali i da tretman nižom temperaturom može povećati koncentraciju fenolnih jedinjenja (Barros i dr.,

2007d). Za razliku od fenola, tokoferoli ostvaruju antioksidativnu aktivnost u interakciji sa peroksil radikalima koji nastaju od polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima ili lipoproteinima membrane.

Antioksidativna aktivnost jedinjenja/ekstrakta makromiceta zavisi od kompleksnog hemijskog okruženja, testa koji se koristi, kao i međusobnih interakcija više prisutnih aktivnih jedinjenja. Nerealno je očekivati da se sve komponente i mehanizmi pojedinačno testiraju, a kako je poznato da nivo antioksidativne aktivnosti pojedinačnih jedinjenja ne odražava nužno i njihov ukupni antioksidativni kapacitet (usled mogućnosti sinergističkih/antagonističkih interakcija), pitanje je koliko je ovo i poželjno. Dobijene rezultate treba sa pažnjom analizirati jer su korišćeni testovi prilagođeni *in vitro* uslovima, a sam koncept da je *in vitro* antioksidans dobar i *in vivo* nije pouzdan i oko ovog pitanja postoji niz kontroverzi (Halliwell, 2013). U tom smislu i pretpostavka da se supstance (uključujući i one iz makromiceta) sa antioksidativnim potencijalom mogu koristiti kao profilaktički agensi mora biti kritički razmotrena kod oboljenja čija se etiologija i progresija smatraju posledicom oksidativnog stresa (Sobrattee i dr., 2005).

Tabela 9. Antioksidativna aktivnost testiranih vrsta makromiceta (mg/mL ± SD)

Testirane makromicete	FC protokol	Fericijanid/Prusko plavo	DPPH· aktivnost	β-Karoten/linolna kiselina	TBARS
	Kontrola	(mg GAE/g ekstrakt)	(EC _{0,5} ; mg/mL)	(EC ₅₀ ;mg/mL)	(EC ₅₀ ; mg/mL)
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	17,36 ± 0,88	2,66 ± 0,10	7,23 ± 0,18	6,11 ± 1,60	0,39 ± 0,06
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	15,89 ± 0,50	1,93 ± 0,02	6,80 ± 0,18	3,56 ± 0,08	0,78 ± 0,07
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	3,02 ± 0,02	9,02 ± 0,23	17,14 ± 0,33	8,97 ± 0,65	0,40 ± 0,02
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	0,75 ± 0,01	23,78 ± 0,23	8,84 ± 0,06	9,22 ± 0,98	0,25 ± 0,02
<i>Polyporus squamosus</i> 1	9,53 ± 0,21	3,53 ± 0,04	13,57 ± 0,19	8,41 ± 0,11	2,03 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	2,11 ± 0,01	11,16 ± 0,44	9,31 ± 0,19	9,66 ± 0,23	0,30 ± 0,01
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	12,70 ± 0,40	1,88 ± 0,02	17,80 ± 0,40	5,60 ± 0,20	2,40 ± 0,30
Troloks	-	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,000	0,02 ± 0,000

4.4.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost sirovih ekstrakta 7 uzoraka 4 vrste makromiceta testirana je metodama mikrodilucije i bioautografije na pločama sa silika gelom za tankoslojnu hromatografiju, a ispitan je i antibakterijski potencijal lektina izolovanog iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1. Rezultati antimikrobne aktivnosti testiranih ekstrakata na test bakterije i mikromicete određeni metodom mikrodilucije su predstavljeni u Grafiku 1.

4.4.2.1. Antibakterijska aktivnost

Radi preciznije procene antibakterijskog potencijala sirovih ekstrakata makromiceta korišćene su mikrodiluciona i bioautografska metoda, kojima su određene efikasne koncentracije za sprečavanje rasta test bakterija (mg/mL) i zone inhibicije na TLC pločama, dok je antibakterijski potencijal lektina procenjen putem mikrodilucione metode.

4.4.2.1.1. Antibakterijska aktivnost sirovih ekstrakata

Rezultati antibakterijske aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakta testiranih makromiceta (ME, EE i VE) određenih metodom mikrodilucije prikazani su u Tabelama 10 - 12.

Metanolni ekstrakti bazidiokarpa pokazali su visok antimikrobni potencijal na testirane bakterije (Tabela 10.). Najbolju antibakterijsku aktivnost su pokazali uzorak *L. sulphureus* 1 koji je efikasno inhibirao rast *Bacillus cereus* (MIK 0,07 mg/mL i MBK 0,14 mg/mL) i *Enterobacter cloacae* (MIK 0,28 mg/mL i MBK 0,56 mg/mL) i uzorak *P. squamosus* 1 koji je efikasno inhibirao rast *B. cereus* (MIK 0,40 mg/mL i MBK 0,75 mg/mL). Metanolni ekstrakt *P. squamosus* 1 je efikasno delovao i na rast ostalih testiranih mikroorganizama uz opseg nešto većih MIK vrednosti 0,56 – 1,50 mg/mL i MBK vrednosti 1,14 – 3,00 mg/mL. Iako pri nešto većoj kocentraciji MIK 0,59 mg/mL i MBK 1,18 mg/mL, metanolni ekstrakt *A. aegerita* 1 je efikasno sprečio rast sojeva *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Najotpornija na dejstvo metanolnog ekstrakta *A. aegerita* 1 bila je vrsta *Listeria monocytogenes* sa MBK 9,49 mg/mL. Rezultati antimikrobne aktivnosti metanolnog ekstrakta *P. ostreatus* S i K ukazuju na viši antimikrobni potencijal komercijalnog soja, osim u slučaju oportunističkog patogena *P. aeruginosa*, gde je samonikli soj pokazao izuzetan antibakterijski potencijal (MIK 0,12 mg/mL i MBK 0,23 mg/mL). Komercijalni antibiotici streptomycin i ampicillin pokazali su inhibitornu aktivnost u opsegu 0,05 – 0,30 mg/mL i baktericidnu aktivnost u opsegu 0,10 – 0,50 mg/mL, što je u većini slučajeva bila niža koncentracija koja je efikasno eradikovala bakterije od testiranog

metanolnog ekstrakta. Ovo nije slučaj sa uzorkom *L. sulphureus* 1 koji je efikasno inhibirao rast *B. cereus* (MIK 0,07 mg/mL i MBK 0,14 mg/mL) pri nižoj koncentraciji od one određene za ampicilin.

Etanolni ekstrakti su pokazali izuzetnu antimikrobnu aktivnost jer su na niskim koncentracijama efikasno inhibirali rast niza patogena (Grafik 1.). Tako je etanolni ekstrakt *A. aegerita* 1 pri MIK 0,52 mg/mL i MBK 1,05 mg/mL u potpunosti sprečio rast *B. cereus*, dok je najrezistentnija na dejstvo ovog ekstrakta bila *L. monocytogenes* sa MIK 4,20 mg/mL i MBK 8,40 mg/mL. Uzorci *L. sulphureus* 1, 2 i 3 su pokazali aktivnost u sličnom opsegu; najniža MIK vrednost je iznosila već 0,16 mg/mL, dok je najniža MBK iznosila 0,53 mg/mL (Tabela 11.). Od svih testiranih ekstrakata, ubedljivo najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt *P. squamosus* 1, jer je efikasno sprečio rast *S. aureus* pri MIK od samo 0,02 mg/mL i MBK 0,04 mg/mL. Najslabije antimikrobno dejstvo među testiranim etanolnim ekstraktima pokazao je uzorak *P. ostreatus* S na *M. flavus* i *L. monocytogenes* (MIK 4,38 mg/mL, MBK 8,75 mg/mL), dok je uzorak *P. ostreatus* K pokazao znatno bolji antimikrobni potencijal. Razlika je najizraženija kod *E. cloacae*, gde su vrednosti za komercijalni soj iznosile MIK 0,58 mg/mL i MBK 1,16 mg/mL, dok su za samonikli soj iznosile MIK 4,38 mg/mL i MBK 8,75 mg/mL (Tabela 11.).

Rezultati antibakterijske aktivnosti vodenih ekstrakata testiranih makromiceta su pokazali znatno niži antibakterijski potencijal od metanolnih i etanolnih ekstrakata (Tabela 12.). Najmanja MIK vrednost postignuta vodenim ekstraktom iznosila je 1,17 mg/mL, što je višestruko veća vrednost u poređenju sa nekim MIK vrednostima za metanolni ekstrakt (npr. MIK za *B. cereus* je 0,07 mg/mL u slučaju metanolnog ekstrakta uzorak *L. sulphureus* 1). Najotpornija bakterija na delovanje vodenog ekstrakta bila je *L. monocytogenes*, naročito u slučaju ekstrakta uzorka *P. ostreatus* S, gde je MBK vrednost iznosila čak 25,00 mg/mL.

Objavljeni podaci koji se tiču antimikrobnog potencijala sirovih ekstrakata i izolovanih jedinjenja testiranih vrsta makromiceta u saglasnosti su sa rezultatima ove doktorske disertacije i ukazuju da one mogu veoma efikasno inhibirati rast patogenih mikroorganizama. Za antimikrobnu aktivnost su odgovorne različite klase jedinjenja: polisaharidi, peptidi, proteini, terpenoidi i dr., a ova jedinjenja u formi sirovog ekstrakta često mogu pokazati znatno bolju aktivnost nego pojedinačno testirana i to zahvaljujući međusobnim interakcijama (Stojković i dr., 2013).

Agrocibolakton, izolovan iz *Agrocybe* sp. HKI 0259 umereno je inhibirao rast *Bacillus subtilis* i *Mycobacteria smegmatis* pri koncentracijama > 50 µg/mL (Berg i dr., 2002), dok je agrocibin (peptid od 9 kDa) izolovan iz bazidiokarpa *A. cylindracea* efikasno inhibirao rast Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija (Ngai i dr., 2005; Karaman i dr., 2014).

Antimikrobni potencijal različitih ekstrakata bazidiokarpa *L. sulphureus* je potvrđen u nekoliko istraživanja, a dokazano je i da izbor rastvarača i metoda ekstrakcije značajno utiču na stepen ove aktivnosti (Petrović i dr., 2013; Petrović i dr., 2014; Sinanoglou i dr., 2015). Tako je etanolni ekstrakt *L. sulphureus* poreklom iz Poljske umereno inhibirao rast testiranih patogena (*Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* i *Klebsiella pneumoniae* su bile najotpornije na dejstvo ekstrakta), dok je tečna kultura *L. sulphureus* efikasno inhibirala rast širokog spektra patogenih bakterija uključujući sojeve kao što su MRSA i glikopeptid – rezistentni soj *Leuconostoc mesenteroides* (Ershova i dr., 2003; Nowacka i dr., 2014).

Prema navodima Fernandes i dr. (2016), metanolni ekstrakt uzorka *P. squamosus* poreklom iz Portugalijske inhibirao je rast istih patogenih mikroorganizama kao i uzorak iz Srbije i to u sličnom opsegu, dok je metanolni ekstrakt uzorka iz Rumunije prema Mocan i dr. (2017) slabo inhibirao rast testiranih mikroorganizama (MIK 0,61 – 20,40 mg/mL, a MBK 1,20 – 40,80 mg/mL). Etanolni ekstrakt bazidiokarpa *P. squamosus* koji je sakupljen na drugom lokalitetu u Srbiji slabo je inhibirao rast kolonije *S. aureus* (MBK 6,30 mg/mL) u odnosu na etanolni ekstrakt *P. squamosus* u ovoj doktorskoj disertaciji gde je MIK iznosila 0,02 mg/mL, a MBK 0,03 mg/mL (Dimitrijević i dr., 2015).

Ekstrakti micelije *P. ostreatus* su pokazali značajan antimikrobni potencijal u istraživanju Vamanu i dr. (2011), pri čemu je metanolni ekstrakt micelije *P. ostreatus* pokazao slabiju aktivnost od etanolnog, osim u slučaju *Listeria innocua*; visoka antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta je potvrđena i za primordije *P. ostreatus* nakon otkrića da je rast *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* var. *mycoides* značajno inhibiran delovanjem gemoterapijskog ekstrakta, dok je niska aktivnost utvrđena za vrstu *Serratia marcescens* kako rast patogena nije inhibiran pri koncentraciji 50mg/mL (Pauliuc i dr., 2013a).

Zone inhibicije rasta bakterija određene metodom bioautografije su prikazane u Tabeli 13. Rezultati su nedvosmisleno pokazali da je antibakterijski efekat zavisio od primenjene koncentracije ekstrakta, što je zaključeno prema porastu dijametra zone inhibicije sa povećanjem

testiranih koncentracija. *E. coli* je bila najotpornija na delovanje svih ekstrakta i neometano je rasla u njihovom prisustvu pri svim testiranim koncentracijama (0,25 mg/mL – 2,50 mg/mL). Uzorak *L. sulphureus* 1 je u odnosu na uzorke 2 i 3 pokazao slabiji antimikrobni potencijal jer pri testiranim koncentracijama (0,25 – 2,50 mg/mL) nije inhibirao rast *E. cloacae*, *S. typhimurium* i *E. coli*. Za razliku od uzorka 1, uzorak 3 je pri navedenim koncentracijama inhibirao rast svih testiranih vrsta, izuzev *E. coli*. Najveća zona inhibicije postignuta uzorkom *L. sulphureus* 3 je izmerena kod *P. aeruginosa* (13,00 mm), a najmanja kod *S. aureus* i *M. flavus* (1,67 mm). Metanolni ekstrakt *A. aegerita* 1 je efikasno inhibirao rast tri Gram negativne bakterije pri svim testiranim koncentracijama, a najveća zona inhibicije je izmerena za *E. cloacae* - 11,00 mm. Metanolni ekstrakti uzoraka *P. squamosus* 1 i *P. ostreatus* K su takođe efikasno inhibirali rast mikroorganizama, što se ne može reći i za ekstrakt *P. ostreatus* S koji pri testiranim koncentracijama nije inhibirao rast: *B. cereus*, *M. flavus* i *E. coli*.

Slične rezultate koji su dobijeni za komercijalni soj *P. ostreatus*, saopštili su i Nehra i dr. (2012) nakon ekstrakcije plodonosnog tela rastvaračima različite polarnosti (benzen, hloroform, aceton, etanol, metanol i destilovana voda) i testiranja njihovog antimikrobnog potencijala. Dobijene zone inhibicije su bile u opsegu 6,50 – 14,00 mm, a ekstrakti su u nekim slučajevima delovali efikasnije i od komercijalnih antibiotika koji su korišćeni kao kontrole. Umerena antimikrobna aktivnost etanolnog ekstrakta komercijalnog soja *P. ostreatus* je potvrđena u istraživanjima Oyetayo i Ariyo (2013), kada je zabeležen znatno viši opseg zona inhibicije rasta testiranih patogena (5,33 – 20,33 mm). Da antimikrobni efekat zavisi kako od rastvarača koji se koristi za ekstrakciju kao i od prirode samog patogena, zaključili su Sala Uddin i dr. (2015) nakon ispitivanja antimikrobnog potencijala hloroformskog, heksanskog i etil acetatnog ekstrakta komercijalnog soja *P. ostreatus*. *B. cereus* i *Vibrio parahaemolyticus* su bile rezistentne na delovanje svih ekstrakata pri koncentraciji 500 µg, dok je heksanski ekstrakt efikasno inhibirao rast *Bacillus megaterium* (24,56 mm). Selektivni antimikrobni potencijal ekstrakata bazidiokarpa *P. ostreatus* je potvrđen i u drugim istraživanjima (Akyuz i dr., 2010; Neelam i dr., 2013; Ahmad i dr., 2014; Chowdhury i dr., 2015; Han i dr., 2015), a testirani metanolni i etanolni ekstrakti su efikasno smanjili disperziju kolonija: *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Agrobacterium tumefaciens* i *S. aureus*.

Za ostale uzorke testiranih makromiceta podaci o antimikrobnoj aktivnosti koja je određena bioautografskom metodom su malobrojni i ističe se efekat etanolnog ekstrakta

bazidiokarpa *L. sulphureus* poreklom iz Turske na rast Gram-pozitivnih bakterija (zona inhibicije 21,00 mm) (Turkoglu i dr., 2006).

Iako su gotovo svi testirani ekstrakti makromiceta pokazali antibakterijski potencijal različitog intenziteta, u literaturi se najčešće ističe visoka antibakterijska aktivnost metanolnih ekstrakata *Ganoderma lucidum* i *Coprinus comatus* u opsegu koncentracija MBK 0,017 – 0,15 mg/mL, odnosno 0,125 – 6,25 mg/mL (Soković i dr., 2017).

4.4.2.1.2. Antibakterijska aktivnost lektina

Mikrodilucionom metodom je ispitan antibakterijski potencijal čistog lektina izolovanog iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1, u cilju procene njegovog doprinosa ukupnoj antibakterijskoj aktivnosti testiranih sirovih ekstrakata ove vrste. Pri testiranim koncentracijama (0,06 – 0,3 mg/mL), lektin nije pokazao inhibitorno delovanje na testirane bakterije: *S. aureus*, *B. cereus*, *M. flavus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. cloacae* i *E. coli*. Ovo nije u saglasnosti sa literaturnim podacima u kojima se navodi da lektini izolovani iz bazidiokarpa *Sparassis latifolia* deluju inhibitorno na rast patogenih bakterija i mikromiceta pri koncentraciji 50 - 200 µg/mL (Chandrasekaran i dr., 2016). Isti literaturni izvor je pokazao da se antimikrobna aktivnost lektina zasniva na interakciji lektina sa komponentama (pre svega polisaharidima) ćelijskog zida mikroorganizama što je i preduslov za inhibiciju njihovog rasta. Uzrok izostanka antibakterijske aktivnosti lektina izolovanog iz *L. sulphureus* 1 je možda upravo različita šećerna specifičnost lektina koji nije interagovao sa polisaharidima ćelijskog zida bakterija, pa nije doveo ni do inhibicije njihovog rasta. Iako negativan, ovaj rezultat je ukazao da uzorak *L. sulphureus* 1 ne ostvaruje antimikrobnu aktivnost putem lektina već mogućim sinergističkim i/ili aditivnim interakcijama drugih jedinjenja, što se u literaturi često navodi za jedinjenja prirodnog porekla (Paiva i dr., 2010).

Tabela 10. Antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta testiranih makromiceta merena metodom mikrodilucije (mg/mL)

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizam	Ekstrakt	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	0,59	1,80	1,04	2,08	1,50	0,63	0,26
	MBC	1,18	3,60	2,08	4,17	3,00	1,25	0,51
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	1,18	0,07	1,04	1,04	0,40	0,63	0,26
	MBC	2,38	0,14	2,08	2,08	0,75	1,25	0,51
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	4,74	3,60	1,56	1,56	1,50	3,75	2,04
	MBC	9,49	7,20	3,13	3,13	3,00	7,50	4,08
<i>Micrococcus flavus</i>	MIC	2,38	1,40	1,56	1,56	1,50	7,50	2,04
	MBC	4,74	1,80	3,13	3,13	3,00	15,00	4,08
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	0,59	2,80	1,04	0,78	1,50	0,12	0,51
	MBC	1,18	3,60	2,08	1,56	3,00	0,23	1,02
<i>Escherichia coli</i>	MIC	2,38	2,80	1,56	1,56	0,56	7,50	2,04
	MBC	4,74	3,60	3,13	3,13	1,14	15,00	8,16
<i>Salmonella typhimurium</i>	MIC	2,38	0,90	1,56	1,56	0,75	3,75	4,08
	MBC	4,74	1,80	3,13	3,13	1,50	7,50	8,16
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC	1,18	0,28	0,78	0,39	0,40	3,75	0,51
	MBC	2,38	0,56	1,56	3,13	1,50	7,50	1,02

Tabela 11. Antibakterijska aktivnost etanolnog ekstrakta testiranih makromiceta merena metodom mikrodilucije (mg/mL)

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizam	Ekstrakt	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	1,51	0,26	0,31	0,31	0,02	0,14	1,16
	MBC	2,10	0,53	0,63	0,63	0,04	0,27	2,34
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	0,52	0,26	0,16	0,31	0,03	2,19	0,58
	MBC	1,05	1,05	0,63	0,63	0,06	4,38	2,34
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	4,20	1,05	0,63	0,16	0,51	4,38	0,58
	MBC	8,40	2,10	1,25	3,13	4,05	8,75	2,34
<i>Micrococcus flavus</i>	MIC	2,10	0,53	1,25	0,63	2,03	4,38	1,16
	MBC	4,20	1,05	2,50	1,25	4,05	8,75	2,34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	1,05	0,26	0,63	0,16	2,03	0,55	0,58
	MBC	4,20	0,53	1,25	1,25	4,05	1,09	1,16
<i>Escherichia coli</i>	MIC	1,05	0,53	0,63	0,63	2,03	2,19	0,58
	MBC	2,10	1,05	1,25	1,25	4,05	4,38	1,16
<i>Salmonella typhimurium</i>	MIC	2,10	0,26	0,31	0,31	0,03	0,14	0,58
	MBC	4,20	0,53	0,63	0,63	0,06	0,27	1,16
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC	1,05	0,53	0,31	0,31	0,51	4,38	0,58
	MBC	2,10	1,05	0,63	0,63	4,05	8,75	1,16

Tabela 12. Antibakterijska aktivnost vodenog ekstrakta testiranih makromiceta metodom mikrodilucije (mg/mL)

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizam	Ekstrakt	VE	VE	VE	VE	VE	VE	VE
<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC	2,35	1,17	2,19	1,17	3,13	1,56	1,60
	MBC	4,69	2,35	4,37	2,35	6,25	6,25	3,20
<i>Bacillus cereus</i>	MIC	1,17	1,17	4,37	1,17	3,13	1,56	1,60
	MBC	2,35	2,35	4,37	2,35	12,50	3,13	3,20
<i>Listeria monocytogenes</i>	MIC	4,69	4,69	4,37	2,35	12,50	12,50	3,20
	MBC	9,38	9,38	8,75	4,69	12,50	25,00	6,40
<i>Micrococcus flavus</i>	MIC	2,35	2,35	4,37	2,35	6,25	6,25	3,20
	MBC	4,69	4,69	8,75	4,69	12,50	12,50	3,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MIC	1,17	1,17	2,19	1,17	3,13	6,25	1,60
	MBC	2,35	2,35	4,37	2,35	6,25	12,50	3,20
<i>Escherichia coli</i>	MIC	2,35	2,35	8,75	2,35	12,50	6,25	3,20
	MBC	4,69	4,69	8,75	4,69	12,50	12,50	6,40
<i>Salmonella typhimurium</i>	MIC	2,35	2,35	2,19	1,17	3,13	3,13	3,20
	MBC	4,69	4,69	8,75	2,35	6,25	6,25	3,20
<i>Enterobacter cloacae</i>	MIC	2,35	1,17	4,37	2,35	6,25	6,25	1,60
	MBC	4,69	4,69	8,75	4,69	12,50	12,50	1,60

Tabela 13. Antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta testiranih makromiceta metodom bioautografije (mm ± SD)

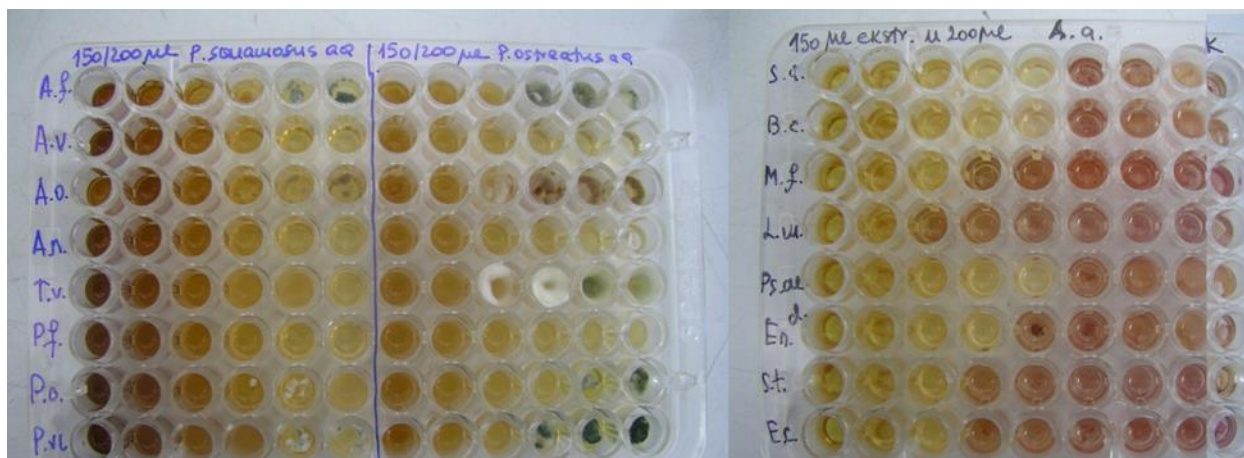
		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizam	mg/mL	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]
Ekstrakt								
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25	n.i.	n.i.	ni	1,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58	n.i.	n.i.
	0,63	n.i.	n.i.	5,67 ± 0,58	5,00 ± 1,00	5,67 ± 0,58	1,67 ± 0,58	5,00 ± 0,00
	1,25	n.i.	n.i.	7,67 ± 0,58	7,00 ± 1,00	7,67 ± 0,58	2,67 ± 0,58	6,67 ± 0,58
	2,50	7,33 ± 0,58	5,33 ± 0,58	11,00 ± 1,00	10,33 ± 0,58	10,33 ± 0,58	6,67 ± 0,58	7,00 ± 0,00
<i>Bacillus cereus</i>	0,25	n.i.	n.i.	n.i.	2,00 ± 0,00	3,67 ± 0,58	n.i.	5,00 ± 0,00
	0,63	n.i.	n.i.	4,67 ± 0,58	4,67 ± 0,58	4,67 ± 0,58	n.i.	5,33 ± 0,58
	1,25	n.i.	n.i.	6,33 ± 0,58	7,67 ± 0,58	8,67 ± 0,58	n.i.	6,67 ± 0,58
	2,50	10,33 ± 0,58	5,33 ± 0,58	8,67 ± 0,58	11,00 ± 0,00	10,33 ± 0,58	n.i.	7,00 ± 0,00
<i>Micrococcus flavus</i>	0,25	n.i.	n.i.	n.i.	1,67 ± 0,58	n.i.	n.i.	3,00 ± 0,00
	0,63	n.i.	n.i.	n.i.	2,67 ± 0,58	2,67 ± 0,58	n.i.	4,33 ± 0,58
	1,25	n.i.	n.i.	5,33 ± 0,58	4,33 ± 0,58	5,67 ± 0,58	n.i.	4,33 ± 0,58
	2,50	n.i.	6,66 ± 0,58	7,67 ± 0,58	7,33 ± 0,58	7,33 ± 0,58	n.i.	4,33 ± 0,58
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,25	n.i.	2,67 ± 0,58	n.i.	3,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58	n.i.	2,00 ± 0,00
	0,63	n.i.	3,67 ± 0,58	n.i.	6,33 ± 0,58	5,33 ± 0,58	n.i.	2,00 ± 0,00
	1,25	n.i.	5,67 ± 0,58	5,67 ± 0,58	9,67 ± 0,58	7,00 ± 1,00	n.i.	4,33 ± 0,58
	2,50	n.i.	9,67 ± 0,58	9,67 ± 0,58	10,67 ± 0,58	10,33 ± 0,58	7,00 ± 0,00	6,67 ± 0,58

nastavak Tabele 13.

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizam	mg/mL	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]	ME ZI [mm]
Ekstrakt								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,25	4,33 ± 0,58	1,67 ± 0,58	2,33 ± 0,58	2,67 ± 0,58	4,00 ± 0,00	1,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58
	0,63	6,33 ± 0,58	5,00 ± 1,00	6,67 ± 0,58	4,67 ± 0,58	5,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58
	1,25	7,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	8,67 ± 0,58	8,00 ± 1,00	9,67 ± 0,58	6,00 ± 1,00	5,67 ± 0,58
	2,50	9,33 ± 0,58	6,33 ± 0,58	11,00 ± 1,00	13,00 ± 0,58	12,00 ± 1,00	6,67 ± 0,58	8,00 ± 0,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	0,25	5,33 ± 0,58	n.i.	2,33 ± 0,58	2,67 ± 0,58	n.i.	n.i.	3,67 ± 0,58
	0,63	7,33 ± 0,58	n.i.	4,33 ± 0,58	5,33 ± 0,58	n.i.	2,67 ± 0,58	3,67 ± 0,58
	1,25	8,33 ± 0,58	n.i.	7,33 ± 0,58	7,33 ± 0,58	5,67 ± 0,58	4,33 ± 0,58	4,33 ± 0,58
	2,50	11,00 ± 1,00	n.i.	9,33 ± 0,58	10,00 ± 0,00	7,67 ± 0,58	6,67 ± 0,58	6,00 ± 0,00
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,25	4,33 ± 0,58	n.i.	2,33 ± 0,58	ni	n.i.	n.i.	3,00 ± 0,00
	0,63	5,67 ± 0,58	n.i.	3,67 ± 0,58	3,33 ± 0,58	n.i.	n.i.	3,00 ± 0,00
	1,25	8,33 ± 0,58	n.i.	5,67 ± 0,58	7,00 ± 0,58	6,33 ± 0,58	n.i.	4,33 ± 0,58
	2,50	10,00 ± 0,58	n.i.	7,67 ± 0,58	11,00 ± 0,58	7,67 ± 0,58	10,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00
<i>Escherichia coli</i>	0,25	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	0,63	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	1,25	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
	2,50	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

4.4.2.2. Antifungalna aktivnost sirovih ekstrakata

Rezultati antifungalne aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakta testiranih makromiceta su prikazani u Tabelama 14. – 16, dok je primer izgleda mikrodilucione ploče prikazan na Slici 14. Metanolni ekstrakt bazidiokarpa *A. aegerita* 1 najefikasnije je inhibirao rast *Aspergillus versicolor*, poznatog producenta mikotoksina sa vrednostima MIK 0,03 mg/mL i MFK 0,95 mg/mL, dok je najmanja inhibicija zabeležena za vrstu *Aspergillus niger* MFK 9,49 mg/mL.



Slika 14. Izgled mikrodilucione ploče, 96 sistem. (Levo) Antifungalna aktivnost: bunarčići u kojima nije došlo do rasta micelije su ostali bistri; (Desno) Antibakterijska aktivnost: bunarčići obojeni crveno označavaju rast bakterija, bunarčići obojeni žuto označavaju da rast bakterije izostaje

Metanolni ekstrakti *L. sulphureus* 1, 2 i 3 su inhibirali rast micelije test mikromiceta pri svim ispitivanim koncentracijama, osim uzorka 3 koji nije uspeo u potpunosti da zaustavi rast *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium ochrochloron* i *P. verrucosum* var. *cyclopium* pri koncentraciji od 12,50 mg/mL. Metanolni ekstrakt uzorka *P. squamosus* 1 je delovao u opsegu 0,40 – 3,00 mg/mL, a komercijalni soj *P. ostreatus* delovao je bolje na testirane mikromicete od samoniklog soja *P. ostreatus*, što je bio slučaj i kod rezultata antibakterijske aktivnosti (Tabela 14.).

Etanolni ekstrakti bazidiokarpa testiranih vrsta makromiceta takođe su efikasno inhibirali rast test mikromiceta (Tabela 15.). *A. aegerita* 1 je sa MIK 0,02 mg/mL i MFK 1,05 mg/mL u potpunosti inhibirala rast *Trichoderma viride*, dok su ostale mikromicete inhibirane u opsegu

MIK 0,26 – 1,05 mg/mL i MFK 1,05 – 8,33 mg/mL. *P. verrucosum* var. *cyclopium* bio je najotporniji na dejstvo etanolnog ekstrakta *A. aegerita* 1 sa MFK od 8,33 mg/mL. Uzorci *L. sulphureus* 1, 2 i 3 pokazali izraženi su antifungalni potencijal (Tabela 15.), a od ova tri, uzorak 1 je pokazao najbolju antifungalnu aktivnost MIK u opsegu 0,03 – 0,53 mg/mL, a MFK 0,13 – 1,05 mg/mL. Najosetljivija na dejstvo etanolnog ekstrakta uzorka 1 je *A. versicolor* (MIK 0,03 mg/mL, a MBK 0,13 mg/mL). Iako nema literaturnih podataka o antifungalnoj aktivnosti etanolnog ekstrakta *P. squamosus* 1, rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da je pri testiranim koncentracijama manje ili više efikasno inhibirao rast svih mikromiceta (najviša MIK je iznosila 4 mg/mL, a najviša MFK čak 8,00 mg/mL kod *A. fumigatus*, *A. ochraceus* i *A. niger*). Etanolni ekstrakti *P. ostreatus* S i K su pri testiranim koncentracijama inhibirali rast mikromiceta, a uzorak komercijalnog soja je pokazao znatno bolji antifungalni potencijal od samoniklog soja (Tabela 15.).

Rezultati antifungalne aktivnosti vodenih ekstrakata testiranih makromiceta (Tabela 16.) pokazali su slabiju aktivnost na testirane mikromicete u odnosu na metanolni i etanolni, što je bio slučaj i sa bakterijskim sojevima. Rezultati antifungalne aktivnosti vodenih ekstrakata pokazali su da je najniža koncentracija kojom je postignuta inhibicija rasta *P. ochrochloron* iznosila 0,59 mg/mL za uzorke *A. aegerita* 1 i *L. sulphureus* 1, dok je najniža koncentracija potrebna za potpuno zaustavljanje rasta *P. ochrochloron* iznosila 1,17 mg/mL za iste uzorke makromiceta. Najslabija inhibicija rasta postignuta je vodenim ekstraktima uzoraka *L. sulphureus* 2 i *P. ostreatus* K uz MIK vrednost 12,50 mg/mL.

Tabela 14. Antifungalna aktivnost metanolnog ekstrakta testiranih makromiceta merena metodom mikrodilucije (mg/mL)

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizmi	Ekstrakt	ME	ME	ME	ME	ME	ME	ME
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC	2,38	2,50	0,91	2,08	0,75	0,25	1,16
	MFC	18,96	9,00	1,83	4,16	1,50	0,50	4,66
<i>Aspergillus versicolor</i>	MIC	0,03	4,50	0,11	1,56	0,40	15,00	0,58
	MFC	0,95	9,00	3,65	3,13	0,75	>15,00	1,16
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MIC	1,19	2,50	2,19	6,25	0,40	1,88	0,58
	MFC	4,74	5,00	3,65	>12,50	0,75	>15,00	1,16
<i>Aspergillus niger</i>	MIC	2,38	4,45	2,19	3,13	0,75	1,88	0,58
	MFC	9,49	17,81	3,65	6,25	1,50	>15,00	1,16
<i>Trichoderma viride</i>	MIC	2,38	3,75	0,91	3,13	0,40	>15,00	1,16
	MFC	2,38	5,00	1,83	6,25	0,75	>15,00	2,34
<i>Penicillium funiculosum</i>	MIC	2,38	0,02	0,11	3,13	0,75	3,75	0,58
	MFC	4,74	0,56	1,83	12,50	1,50	>15,00	2,34
<i>Penicillium ochrochloron</i>	MIC	1,19	1,25	0,91	12,50	0,75	15,00	1,16
	MFC	4,74	2,50	3,65	>12,50	1,50	>15,00	2,34
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	MIC	2,38	4,50	0,91	3,13	1,50	15,00	0,58
	MFC	4,47	9,00	3,65	>12,50	3,00	>15,00	1,16

Tabela 15. Antifungalna aktivnost etanolnog ekstrakta testiranih makromiceta merena metodom mikrodilucije (mg/mL)

		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorganizmi	Ekstrakt	EE	EE	EE	EE	EE	EE	EE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC	0,52	0,26	0,75	0,75	4,00	2,19	4,67
	MFC	2,10	0,53	0,75	1,50	8,00	8,75	9,33
<i>Aspergillus versicolor</i>	MIC	0,26	0,03	0,19	0,75	2,00	1,09	2,33
	MFC	2,10	0,13	0,38	0,75	4,00	8,75	4,67
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MIC	0,52	0,13	0,38	0,38	2,00	2,19	2,33
	MFC	1,05	0,26	0,75	0,75	8,00	8,75	9,33
<i>Aspergillus niger</i>	MIC	1,05	0,26	0,75	0,75	2,00	1,09	2,33
	MFC	2,10	0,53	1,50	1,50	8,00	2,19	9,33
<i>Trichoderma viride</i>	MIC	0,02	0,03	0,19	0,19	2,00	2,19	2,33
	MFC	1,05	0,26	0,38	0,38	4,00	4,38	4,67
<i>Penicillium funiculosum</i>	MIC	0,02	0,07	0,19	0,38	2,00	2,19	2,33
	MFC	2,10	0,53	0,38	1,50	4,00	8,75	4,67
<i>Penicillium ochrochloron</i>	MIC	0,26	0,26	0,75	0,19	1,00	2,19	1,16
	MFC	2,10	0,53	1,50	0,75	4,00	8,75	4,67
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	MIC	1,05	0,53	0,38	0,38	1,00	4,38	1,16
	MFC	8,33	1,05	3,00	0,75	4,00	8,75	4,67

Tabela 16. Antifungalna aktivnost vodenog ekstrakta testiranih makromiceta merena metodom mikrodilucije (mg/mL)

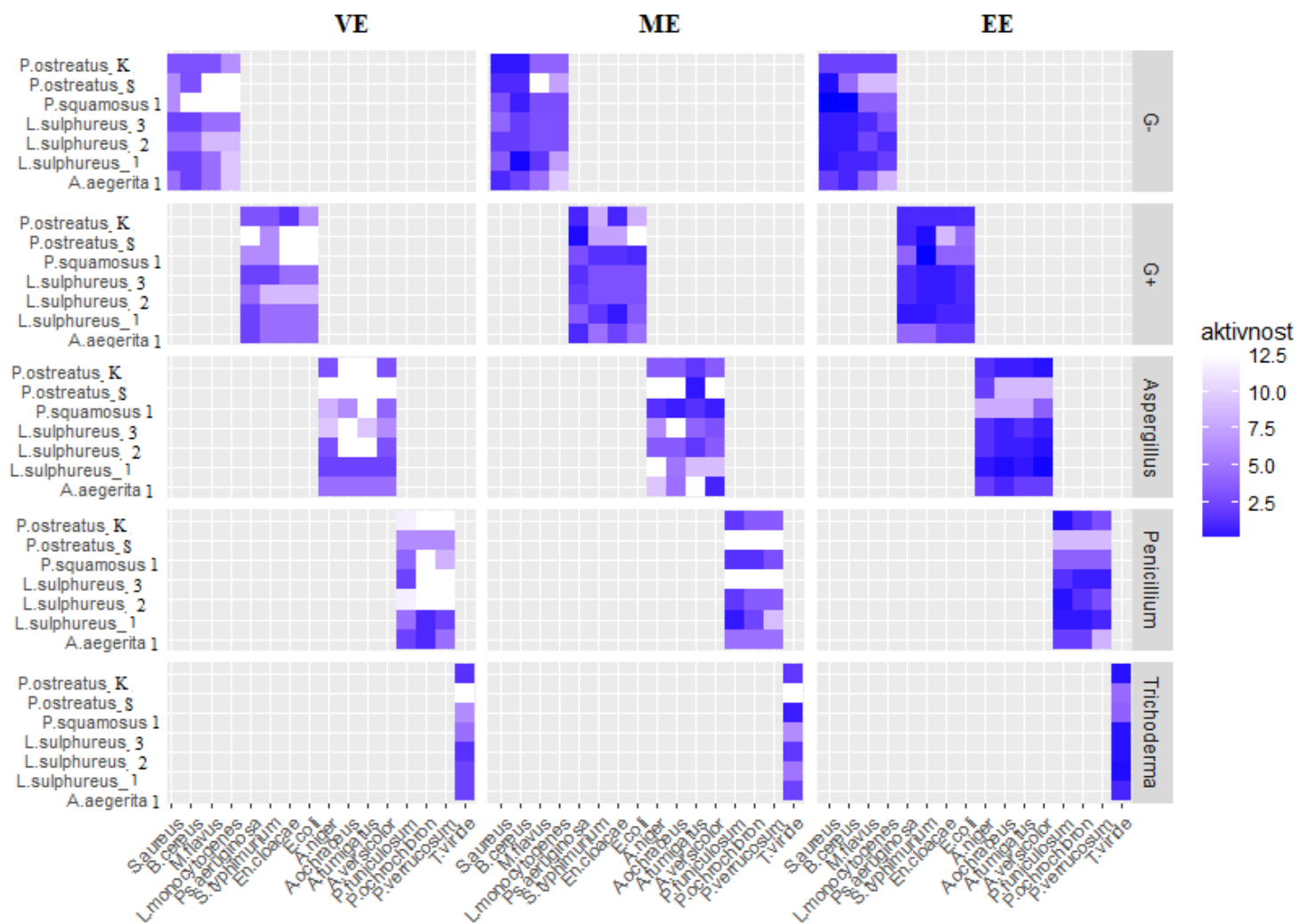
		<i>Agrocybe aegerita</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	<i>Polyporus squamosus</i> 1	<i>Pleurotus ostreatus</i> S	<i>Pleurotus ostreatus</i> K
Mikroorg, Ekstrakt		VE	VE	VE	VE	VE	VE	VE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	MIC	2,35	1,17	6,25	4,69	3,13	3,13	6,25
	MFC	4,69	2,35	12,50	9,38	12,50	25,00	12,50
<i>Aspergillus versicolor</i>	MIC	2,35	1,17	1,56	1,56	0,26	2,08	1,56
	MFC	4,69	2,35	3,13	6,25	4,17	16,67	3,13
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MIC	2,35	1,17	12,50	4,69	0,78	6,25	12,50
	MFC	4,69	2,35	>12,50	18,75	6,25	25,00	>12,50
<i>Aspergillus niger</i>	MIC	2,35	2,35	1,56	4,69	2,08	6,25	1,56
	MFC	4,69	2,35	3,13	9,38	8,33	25,00	3,13
<i>Trichoderma viride</i>	MIC	1,17	1,17	0,78	2,35	6,25	6,25	1,56
	MFC	2,35	2,35	1,56	4,69	6,25	25,00	3,13
<i>Penicillium funiculosum</i>	MIC	1,17	1,17	11,67	2,35	1,04	0,78	11,67
	MFC	2,35	4,69	11,67	2,35	4,17	6,25	11,67
<i>Penicillium ochrochloron</i>	MIC	0,59	0,59	6,25	4,69	6,25	3,13	6,25
	MFC	1,17	1,17	12,50	18,75	12,50	6,25	12,50
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	MIC	2,35	1,17	6,25	9,38	2,08	6,25	6,25
	MFC	4,69	2,35	12,50	18,75	8,33	6,25	12,50

Tabela 17. Antibakterijska aktivnost komercijalnih antibiotika merena metodom mikrodilucije (mg/mL) i bioautografije (mm)

	Bakterije	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Streptomycin	MIK	0,05	0,05	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,05
	MBK	0,1	0,10	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,10
Ampicilin	MIK	0,30	0,10	0,40	0,30	0,80	0,30	0,30	0,15
	MBK	0,40	0,15	0,50	0,40	1,25	0,50	0,40	0,20

Tabela 18. Antifungalna aktivnost komercijalnih miktika (mg/mL)

	Mikromi cete	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Ketokonazol	MIK	0,20	0,20	1,50	0,20	1,00	2,50	2,50	0,20
	MFK	0,50	0,50	2,00	0,50	1,00	3,50	3,50	0,30
Bifonazol	MIK	0,15	0,10	0,15	0,15	0,10	0,20	0,20	0,15
	MFK	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,25	0,25	0,20



Grafik 1. Toplotne mape (*eng.* heat mape) antimikrobne aktivnosti ekstrakata testiranih makromiceta

Dosadašnji objavljeni podaci koji se odnose na antifungalnu aktivnost makromiceta proučavanih u ovoj disertaciji su malobrojni. Pârvu i dr. (2010) su naveli značajnu antifungalnu aktivnost *L. sulphureus* prema brojnim patogenim vrstama biljaka (*A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* i dr.), čak i u poređenju sa komercijalnim mikotikom flukonazolom, dok su suprotno tome, Ershova i dr. (2003) saopštili da *L. sulphureus* nema antifungalni potencijal. Etanolni ekstrakt bazidiokarpa *L. sulphureus* poreklom iz Turske efikasno je inhibirao rast *Candida albicans* formirajući zonu inhibicije 21,00 mm (Turkoglu i dr., 2006), a Vamanu (2012; 2013) je za metanolni i etanolni ekstrakt micelije *P. ostreatus* istakao selektivnu antimikrobnu aktivnost na *Candida albicans*.

Rezultati antimikrobne aktivnosti komercijalnih lekova koji se koriste za lečenje infekcija uzrokovanih patogenim bakterijama i mikromicetama pokazali su bolju aktivnost od testiranih makromiceta u najvećem broju slučajeva (Tabela 17. i 18.). *S. aureus*, *B. cereus* i *E. cloacae* bili su najosetljivije na dejstvo streptomicina (MIK 0,05 mg/mL, MBK 0,10 mg/mL), dok je posebno osetljiva na dejstvo ampicilina bila vrsta *B. cereus*. Najotpornije na dejstvo ketokonazola su bile mikromicete *P. ochrochloron* i *P. funiculosum* (MIK 2,50 mg/mL, MFK 3,50 mg/mL), a iste vrste su bile najotpornije i na dejstvo bifonazola (MIK 0,20 mg/mL, MFK 0,25 mg/mL). Iako su testirani komercijalni lekovi delovali efikasno na patogene, oni mogu prouzrokovati i niz propratnih negativnih efekata kod korisnika, pa je neophodno pronalaženje novih agenasa koji su efikasni u eradikaciji patogena i nemaju nus efekte.

Ljudsko društvo je od svog nastanka suočeno sa problemom rasprostranjenosti patogenih mikroorganizama. Iako je otkriće antibiotika pre gotovo jednog veka revolucioniralo lečenje infektivnih bolesti uzrokovanih bakterijama, danas se suočavamo sa brojnim multirezistentim sojevima koje je veoma teško eliminisati dostupnim antimikrobnim agensima (Alves i dr., 2013a). Mnoge Gram pozitivne i Gram negativne bakterije stekle su mehanizme rezistencije na antimikrobne agense uključujući: *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, kao i respiratorne patogene *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*. Eksperimentalni podaci ukazuju da prilikom izlaganja bakterija malim koncentracijama tetraciklina dolazi do čak stotrukog porasta u transferu gena čiji produkti povećavaju rezistenciju, a izlaganje *Streptococcus pneumoniae* subinhibitornim koncentracijama tetraciklina indukuje njegovu povećanu rezistentnost na ovaj antibiotik (Wilson i dr., 2002). Pored toga, komercijalni antibiotici mogu dovesti do indukovane hepatotoksičnosti, što može imati ozbiljne

posledice naročito kod pacijenata sa hepatitisom ili HIV-om (Sharma i Mohan, 2004; Andrade i Tulkens, 2011). Infekcije uzrokovane mikromicetama su naročito u ekspanziji poslednjih godina usled porasta broja imunokompromitovanih pacijenata, a antifungalni lekovi koji se koriste u kliničkoj praksi su pokazali selektivnu biološku aktivnost i toksičnost, čime je omogućena pojava rezistentnih sojeva (Madigan i Martinko, 2006).

Zbog svega navedenog je intenzivirana potraga za novim jedinjenjima koja imaju antimikrobni potencijal, a prirodne supstance su se istakle kao efikasne alternative (Harvey, 2007). Tokom poslednje decenije, veliki broj vrsta iz podrazdela Basidiomycotina je testiran sa ciljem pronalaženja supstanci sa antimikrobnim potencijalom (Barros i dr., 2007c; Iwalokun i dr., 2007; Alves i dr., 2012a; 2012b; Alves i dr., 2013a; 2013b). Rezultati studija su pokazali da su makromicete bogate jedinjenjima koja u formi ekstrakta ili pojedinačno imaju manje ili više izraženu antimikrobnu aktivnost i u ovom smislu se posebno ističe potencijal: polisaharida, fenola, terpenoida, sterola, organskih kiselina, derivata antrahinona, peptida i proteina, ribonukleaza i dr. (Butler, 2005; Karaman i dr., 2012; Alves i dr., 2012b). U prirodnim uslovima navedena jedinjenja imaju zaštitnu funkciju kod gljiva, a kako su makromicete eukariotske ćelijske organizacije isto kao i ljudi, moguće je da možemo iskoristiti njihove prirodne odbrambene strategije kako bismo se izborili sa patogenima koji su za nas značajni (Ranadive i dr., 2013). U ovoj doktorskoj disertaciji potvrđeno je da su testirane makromicete bogate nekim od navedenih jedinjenja, pa se njihov antimikrobni potencijal možda može tome i pripisati.

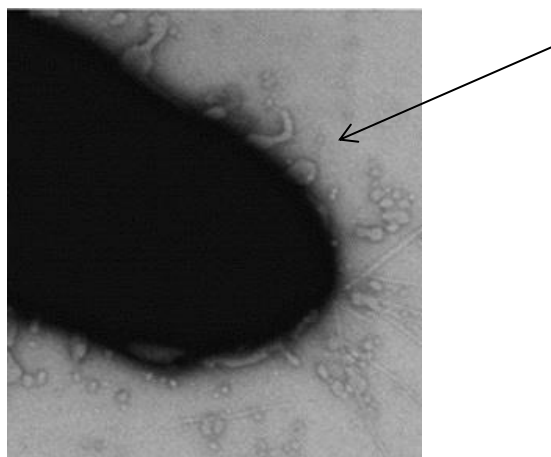
Danas su u upotrebi brojne metode koje se koriste za brzu detekciju antimikrobne aktivnosti: mikrodiluciona i disk difuziona, metode koje uključuju inkorporaciju ekstrakta u medijum kulture i dr. Ovo ima za posledicu da su rezultati antibakterijske aktivnosti izraženi u različitim jedinicama što otežava njihovo objedinjavanje i interpretaciju (Balouiri i dr., 2016). Metoda ekstrakcije, izbor rastvarača i analize koja se za tu priliku koristi takođe doprinose razlikama u rezultatima antimikrobne aktivnosti, što su naveli Petrović i dr. (2014b) gde je ekstrakt dobijen pomoću ultrazvučnog aparata imao znatno bolju aktivnost nego ekstrakt dobijen klasičnom ekstrakcijom. Tom prilikom je utvrđeno da je najveća inhibicija postignuta ekstraktom *L. sulphureus* koji je dobijen pomoću ultrazvučnog aparata na rast *T. viride* i *P. funiculosum* (vrednosti MIK su 0,006 mg/mL i odnosno 0,023 mg/mL). Buduća istraživanja bi trebala obuhvatiti usavršavanje metoda i standardizovanje jedinica kako bi rezultate bilo moguće efikasnije porediti.

4.4.2.3. Anti - QS aktivnosti

Anti-QS aktivnost metanolnog ekstrakta testiranih vrsta makromiceta na virulentnost soja *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 određena je: (1) testovima za kvantifikaciju promena struktura za kretanje, čime se onemogućava disperzija kolonija („twitching” i „flagella” test), (2) testom za kvantifikaciju smanjenja produkcije pigmenta piocijanina, faktora virulentnosti, pod uticajem ekstrakta i (3) testom za kvantifikaciju inhibicije formiranja biofilma pod uticajem ekstrakta. Rezultati izvedenih testova su prikazani u Tabelama 19. i 20.

4.4.2.3.1. Pokretljivost

U nizu tipova kretanja kojima se pokretne bakterije služe kako bi se proširile na nutritivno bogata mesta, oportunistički patogen *P.aeruginosa* PAO1 prema navodima Gupta i dr. (2016) koristi plivanje – „swimming“ pomoću unipolarne flagele, trzanje („twitching“) pomoću pila tipa IV (dalje u tekstu T4P) i „swarming“ kretanje (kombinuje polarnu flagelu, T4P i produkciju surfaktanta ramnolipida). *P. aeruginosa* PAO1 formira na površini končaste strukture za kretanje označene kao T4P (Slika 15.). Ove strukture omogućuju disperziju preko biotičkih površina, formiranje ćelijskih agregata, a značajne su i prilikom adhezije bakterije za domaćina i formiranje biofilma (Toole i dr., 2002; Gupta i dr., 2016). Smanjenje broja ovih struktura sprečava disperziju kolonija nakon iscrpljivanja nutrijenata, što može dovesti i do iskorenjivanja bakterije.



Slika 15. Izgled pila tipa IV kod *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (označeno strelicom) preuzeto iz Jain i dr. (2012)

Testovi pokretljivosti izvedeni su kako bi se utvrdio potencijal metanolnog ekstrakta da utiču na kretanje *P. aeruginosa* PAO1. Nakon 24 h inkubacije sa subinhibitornom koncentracijom ekstrakta (subMIK) kolonije su posmatrane praćenjem sledećih parametara pod binokularnim mikroskopom: (1) dijametra kolonije (2) boje kolonije i (3) ivice kolonije. Testirani ekstrakti makromiceta značajno su smanjili dijametar kolonija i broj struktura za kretanje (Tabela 19).

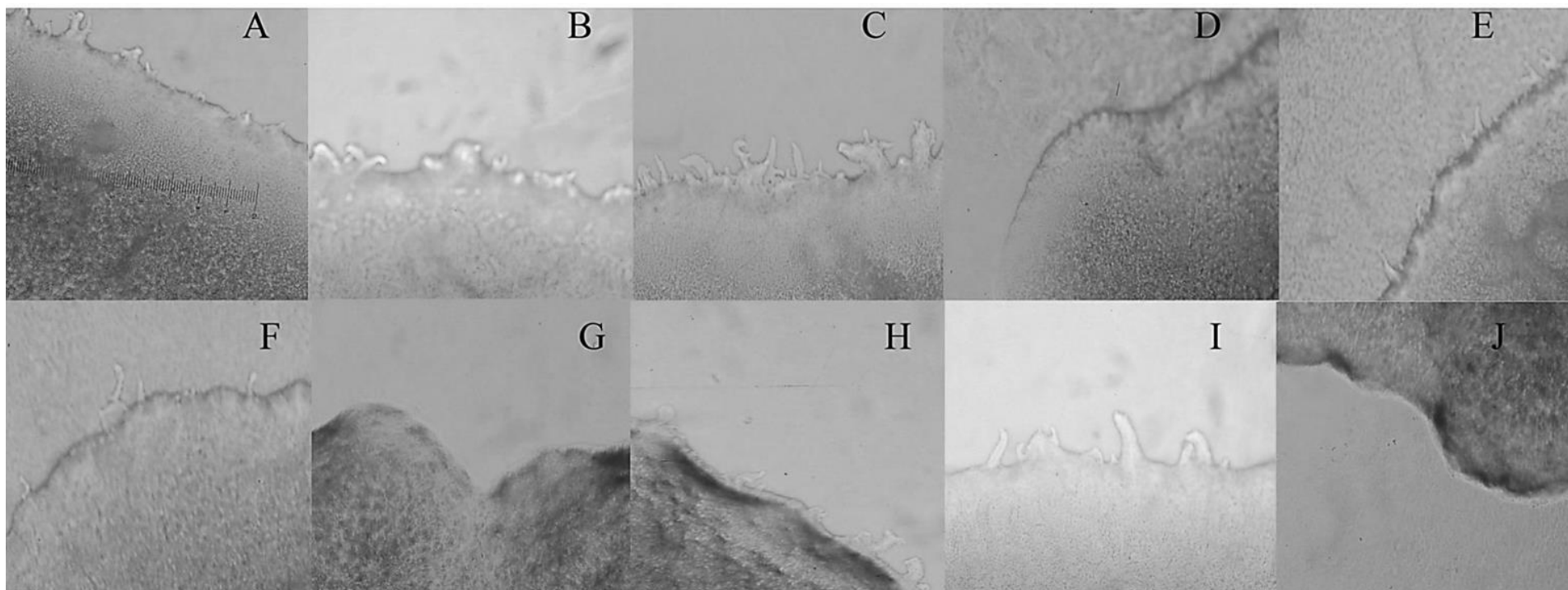
Tabela 19. Efekat metanolnog ekstrakta testiranih makromiceta na rast i strukturu kolonije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Makromiceta Kontrola	Dijametar kolonije (mm)	Boja kolonije	Ivica kolonije
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	15,33	bledo zelena	redukovane T4P
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	7,67	bela	ravna ivica
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	15,00	bela	ravna ivica
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	7,67	bela	redukovane T4P
<i>Polyporus squamosus</i> 1	7,67	bela	redukovane T4P
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	9,33	bela	redukovane T4P
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	12,00	bela	ravna ivica
Streptomycin	8,33	bela	redukovane T4P
Ampicilin	8,00	zelena	redukovane T4P
Kontrola <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	21,00	zelena	brojne T4P

Kontrolna kolonija *P. aeruginosa* PAO1 koja je rasla neometano na hranljivoj podlozi dostigla je \varnothing 21,00 mm, dok su ivice kolonije su bile neravne usled postojanja zbog prisustva niza pila što se može uočiti na (Slici 16C.). Zelena boja kolonije ukazuje na značajnu produkciju pigmenta piocijanina. Uzorci *L. sulphureus* 1, 3 i *P. squamosus* 1 veoma su efikasno inhibirali širenje kolonije na šta ukazuje njen dijametar koji je iznosio 7,67 mm za sva tri uzorka (Slika

16E, 16F i 16H). Uzorak *P. ostreatus* S je slabije redukovao širenje kolonije u odnosu na gore navedene ekstrakte (\varnothing 9,33 mm, slika 16I.), dok su metanolni ekstrakti *P. ostreatus* K, *L. sulphureus* 2 i *A. aegerita* 1 (\varnothing 12,00 mm, \varnothing 15,00 mm i \varnothing 15,33 mm; Slika 16J., 16G. i 16D.) pokazali nizak efekat na širenje kolonije u poređenju sa kontrolom (\varnothing 21,00 mm). Komercijalni antibiotici streptomycin i ampicilin su takođe efikasno inhibirali disperziju kolonije *P. aeruginosa* PAO1: uz streptomycin kolonija je dostigla dijametar 8,33 mm, dok je uz ampicilin ova vrednost iznosila 8,00 mm (Slika 16A. i 16B.). Boja kolonije je pod dejstvom ekstrakata promenjena delimično ili potpuno, od bledo zelene kod *A. aegerita* 1 do potpuno bele kod svih ostalih testiranih ekstrakata, što ukazuje na smanjenje produkcije piocijanina. Posmatranjem ivica kolonija *P. aeruginosa* PAO1 koje su inkubirane sa testiranim ekstraktima uočena je efikasna redukcija TIVP što se odrazilo i na širenje kolonija *P. aeruginosa* PAO1 (Slika 16.). Smanjenje dijametra kolonije, uz promenu broja TIVP i boje kolonije, mogu ukazati da ekstrakt efikasno utiče na testirane QS regulisane faktore koji omogućuju *P. aeruginosa* PAO1 disperziju i virulentnost.

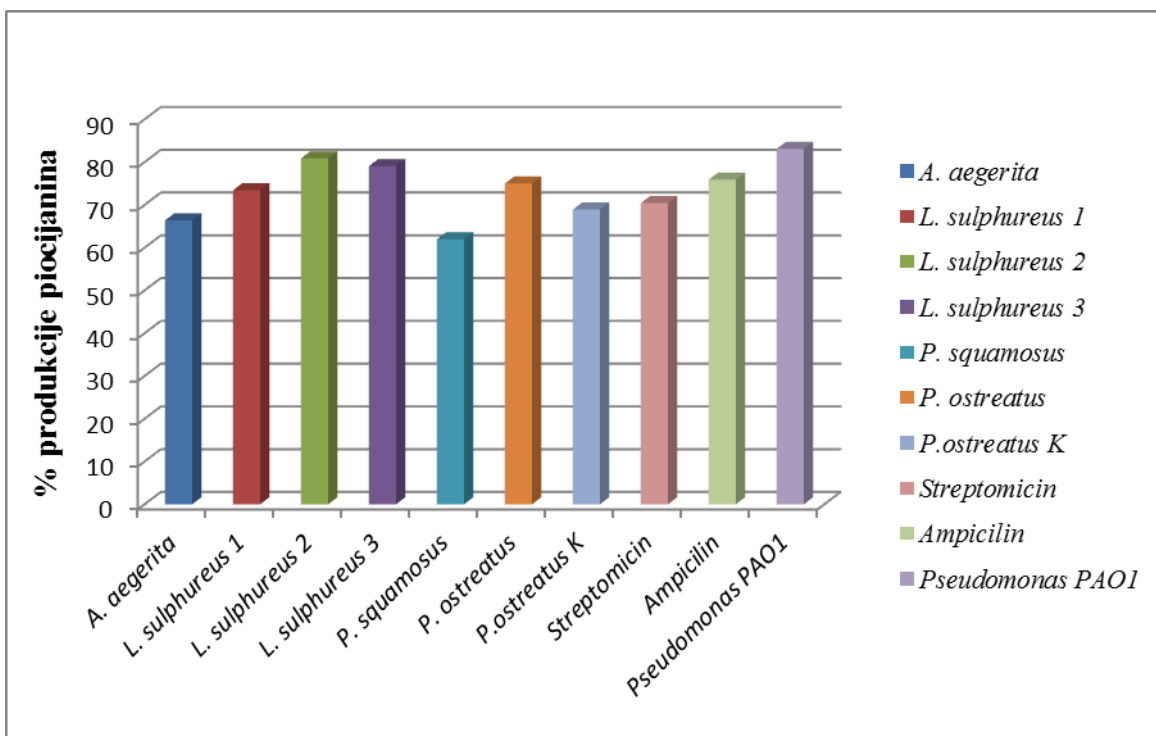
Literaturni podaci ukazuju da supstance prirodnog porekla efikasno inhibiraju QS regulaciju kao i to da su idealni inhibitori QS regulatornog puta molekuli male molekulske mase koji su otporni na degradaciju, imaju visok afinitet za QS regulator i značajno redukuju ekspresiju QS regulisanih gena (Rasmussen i Givskov, 2006). Makromicete proizvode jedinjenja koja u obliku ekstrakta imaju izražena anti-QS svojstva. Soković i dr. (2014) su saopštili da je vodeni ekstrakt *Agaricus blazei* efikasno redukovao produkciju piocijanina, pokretljivost i formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1, dok su Zhu i dr. (2011) naveli da su pigmenti ekstrahovani iz bazidiokarpa *Auricularia auricular*, efikasno inhibirali produkciju pigmenta violaceina. Mehanizmi anti-QS aktivnosti ekstrakata makromiceta nisu u detalje poznati, ali se pretpostavlja da su slični već poznatim mehanizmima dejstva ekstrakata biljaka. Tako, biljni ekstrakti degraduju signalne receptore koji regulišu transkripciju ili se vezuju za njih čime im menjaju konformaciju i onemogućavaju aktivnost, a neka jedinjenja koja su strukturno slična sa QS signalima kroz kompetitivno vezivanje za receptor, mogu delovati kao inhibitori QS regulisanog puta (Koh i dr., 2013). QS inhibitori su usko specifični prema malom broju patogena, a kako ne utiču na osnovne životne procese (npr. sinteza proteina) selektivni pritisak za razvoj rezistencije prema njima je minimalan (Rasmussen i Givskov, 2006).



Slika 16. Izgled površine kolonije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A. i B. redukcija pila tipa IV (T4P) u prisustvu streptomicina i ampicilina; C. formiranje T4P u kontroli; D. odsustvo T4P u prisustvu MeOH ekstrakta *Agrocybe aegerita* 1; E. i F. redukcija T4P u prisustvu MeOH ekstrakt *Laetiporus sulphureus sulphureus* 1 i 3; G. odsustvo T4P u prisustvu MeOH ekstrakta *Laetiporus sulphureus* 2; H. i I. redukcija T4P u prisustvu MeOH ekstrakta *Polyporus squamosus* 1 i *Pleurotus ostreatus* S; J. odsustvo T4P u prisustvu MeOH ekstrakta *Pleurotus ostreatus* K (uveličanje 100 X)

4.4.2.3.2. Inhibicija produkcije piocijanina

Pseudomonas aeruginosa PAO1 proizvodi pigment piocijanin plavo-zelene boje koji je sposoban da prolazi kroz ćelijsku membranu i može biti izolovan u znatnoj količini iz sputuma, uha i urina pacijenata (El-Fouly i dr., 2015; Hall i dr., 2016). Mogućnost inhibicije produkcije ovog faktora virulentnosti subinhibitornim koncentracijama supstanci prirodnog porekla je veoma značajna, zbog čega su metanolni ekstrakti plodonosnih tela gljiva i testirani (Grafik 2).



Grafik 2. Produkcija piocijanina u prisustvu subMIK koncentracija metanolnog ekstrakta testiranih makromiceta

Smanjena produkcija piocijanina je zabeležena kod svih testiranih ekstrakata u poređenju sa kontrolom. Produkcija piocijanina u prisustvu subMIK koncentracije metanolnog ekstrakta bazidiokarpa je iznosila: za *L. sulphureus* 2 80,88%; *L. sulphureus* 3 79,08%; *P. ostreatus* S 75,00%; *L. sulphureus* 1; 73,43%; *P. ostreatus* K 68,90%; *A. aegerita* 1 66,37%; *P. squamosus* 1 61,96%, dok je produkcija u kontroli iznosila 83,12%. U prisustvu ampicilina i streptomicina zabeležen je pad produkcije pigmenta u odnosu na kontrolu (75,90% odnosno 70,49%). Iz predstavljenih rezultata se može uočiti da je MeOH ekstrakt *P. squamosus* 1 najefikasnije inhibirao produkciju piocijanina, a za njim sledi ekstrakt *A. aegerita* 1. Oba uzorka su delovala efikasnije i od antibiotika dok je najslabiji efekat imao metanolni ekstrakt *L. sulphureus* 2.

4.4.2.3.3. Antibiofilm aktivnost

Rezultati antibiofilm aktivnosti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela proučavanih vrsta pokazali su da je inhibicija formiranja biofilma (u %) zavisila od primenjene koncentracije ekstrakta (Tabela 20). Ekstrakt *P. squamosus* 1 snažno je inhibirao ovaj proces sa 88,30% pri ½ MIK i 85,45% pri ¼ MIK, dok je nisku antibiofilm aktivnost imao uzorak *P. ostreatus* S 40,43% pri ½ MIK i 38,45% pri ¼ MIK. Metanolni ekstrakti komercijalnog soja *P. ostreatus* i uzorak *L. sulphureus* 3 u testiranim koncentracijama nisu imali efekat na formiranje biofilma. Kao pozitivna kontrola je korišćen ampicilin koji je inhibirao formiranje biofilma za 69,16% pri ½ MIK i 56,46% pri ¼ MIK.

Uporednom analizom je zaključeno da ekstrakti *A. aegerita* 1, *L. sulphureus* 1 i *P. squamosus* 1 snažno deluju na formiranje biofilma, čak jače nego ampicilin. Ovo je značajno jer su bakterije u formi biofilma otpornije i do 1000 puta na delovanje antibiotika nego slobodnoživeće forme, pa su i doze antibiotika potrebne za njihovo eliminisanje višestruko veće od sigurnih doza koje se primenjuju u kliničkoj praksi (Alves i dr., 2014). Povećana tolerancija na antimikrobne agense se smatra posledicom njihovog vezivanja za egzopolisaharidni matriks koji okružuje biofilm čime je ograničen ulazak antimikrobnih jedinjenja unutar biofilma, kao i razlikama u metaboličkoj aktivnosti ćelija koje su locirane na različitim mestima u biofilmu. Ćelije na površini imaju slobodan pristup nutrijentima i kiseoniku pa aktivno rastu, dok one unutar biofilma rastu usporeno zbog ograničenog pristupa ovim faktorima (Rasmussen i Givskov, 2006; Abdallah i dr., 2014).

Prema navodima niza autora, neke od testiranih makromiceta (*Lepista nuda*, *Leucopaxillus giganteus*, *Russula delica*, *Sarcodon imbricatus*, *Armillaria mellea*) mogu efikasno inhibirati formiranje biofilma: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* u opsegu 14,22% – 57,49% (Alves i dr., 2014; Kostić i dr., 2017). Još značajnije je otkriće Bahari i dr. (2017) da kurkumin (komponenta rizoma *Curcuma longa*) i antibiotik azitromicin sinergistički deluju na formiranje biofilma, pa je važno dalje ispitati mogućnosti sinergističkog i aditivnog dejstva supstanci prirodnog porekla i komercijalnih antibiotika, čime bi se stvorila osnova za formiranje novih i efikasnijih kombinovanih terapija. Stav o tome da li je formiranje biofilma QS regulisan proces ili ne je još uvek predmet razmatranja. Dok Sakuragi i Kolter (2007) ukazuju da QS regulacija ima značajnu ulogu u formiranju biofilma, Kjelleberg i Molin (2002) navode da

ova regulacija verovatno nije dominantni i ekskluzivni put za formiranje biofilma. Za neka jedinjenja je potvrđeno da nemaju direktan efekat na biofilm, ali ga mogu učiniti podložnijim na delovanje antibiotika (Rasmussen i Givskov, 2006).

Tabela 20. Efekat metanolnog ekstrakta testiranih vrsta makromiceta na stepen inhibicije (%) formiranja biofilma *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Makromicete	½ MIK	¼ MIK
Kontrola		
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	84,24	55,03
<i>Laetiporus sulphures</i> 1	85,94	84,77
<i>Laetiporus sulphureus</i> 2	60,58	59,75
<i>Laetiporus sulphureus</i> 3	n.i.	n.i.
<i>Polyporus squamosus</i> 1	88,30	85,45
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	40,43	38,45
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	n.i.	n.i.
Ampicilin	69,16	56,46

Iz svega navedenog, može se zaključiti da iako QS inhibitori mogu pokazati izraženi *in vitro* efekat, neosnovano je sa sigurnošću tvrditi da inhibiraju virulentnost i u kompleksnom okruženju kakvo imaju *in vivo* sistemi. Značajno je i pitanje količine koja će dati adekvatan i efikasan anti-QS odgovor u *in vivo* sistemima, kao i potencijalna toksičnost jedinjenja. Tako je patulin izolovan iz *Penicillium* sp. značajan QS inhibitor, ali je toksičan pa nema praktičnu primenu (Kalia, 2013), dok ekstrakt belog luka koji je pokazao značajan *in vitro* anti-QS efekat, mora biti unet u organizam u velikim količinama i čak 50 čenova belog luka dnevno je ekvivalentno dozi koja je pokazala efekte *in vitro* što bi sigurno imalo značajne sekundarne efekte na korisnika (Rasmussen i Givskov, 2006).

4.4.3. Citotoksična aktivnost

Rezultati citotoksične aktivnosti metanolnog i polisaharidnog ekstrakta testiranih makromiceta na tumorske ćelijske linije humanog porekla i netumorske primarne ćelije jetre animalnog porekla su prikazani u Tabeli 21. Od svih testiranih makromiceta, jedino je polisaharidni ekstrakt uzorka *L. sulphureus* 1 pokazao *in vitro* citotoksičnu aktivnost. Najosetljivija ćelijska linija na delovanje polisaharidnog ekstrakta je HeLa sa GI_{50} 72,26 $\mu\text{g/mL}$, dok su ćelijske linije NCI-H460 i MCF-7 pokazale manju osetljivost (181,49 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 239,57 $\mu\text{g/mL}$). U poređenju sa elipticinom koji je korišćen kao pozitivna kontrola (aktivnost je u opsegu 0,91 $\mu\text{g/mL}$ za MCF-7 do 1,14 $\mu\text{g/mL}$ za HepG₂), polisaharidni ekstrakti su pokazali znatno nižu aktivnost. Ispitivanje dejstva ekstrakata na hepatocite sisara je obavezan korak u proceni toksičnosti jedinjenja, a korišćenje svinjskih hepatocita u tu svrhu je prihvatljivo jer su ove ćelije u pogledu fiziološke funkcije veoma slične humanim (Calhelha i dr., 2014). Rezultati analize citotoksičnosti (Tabela 21.), pokazali su da testirani ekstrakti nisu inhibirali rast netumorskih primarnih ćelija u prisustvu najviše testirane koncentracije (u svim slučajevima $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$), iz čega je zaključeno da ekstrakti nisu toksični za PLP2 ćelije jetre. Ovo pruža mogućnost sigurne primene preparata pripremljenih od testiranih makromiceta uz određivanje efikasnih koncentracija. Za analizu citotoksične aktivnosti odabrani su metanolni i polisaharidni ekstrakti, kako je procenjeno da će se ovim rastvaračima ekstrahovati jedinjenja koja će na adekvatan način predstaviti citotoksičnu efikasnost testiranih makromiceta. Metanolom su efikasno ekstrahovana fenolna jedinjenja odgovorna za antioksidativnu aktivnost koja je važna u prevenciji kancerogenih oboljenja (Barros i dr., 2007b; Reis i dr., 2011a), dok je polisaharidni ekstrakt odabran za analizu jer je iz literature poznato da polisaharidi makromiceta imaju značajan antitumorski potencijal (Popović i dr., 2013).

Citotoksični potencijal ekstrakata *L. sulphureus* potvrđen je i u istraživanju Kolundžić i dr. (2016), kada su autori odredili aktivnost cikloheksanskog i dihlormetanskog ekstrakta bazidiokarpa ove vrste prema HeLa malignim ćelijskim linijama (IC_{50} 92,12 $\mu\text{g/mL}$ odnosno 67,20 $\mu\text{g/mL}$), u rangu dobijenih vrednosti za istu ćelijsku liniju. Nešto bolja aktivnost dihlormetanskog ekstrakta prema HeLa ćelijama u odnosu na dobijene (67,20 $\mu\text{g/mL}$ prema 72,26 $\mu\text{g/mL}$) može biti posledica razlika u pripremi ekstrakata za analizu i izboru rastvarača, što Shang i dr. (2016) navode da je od presudnog značaja za analize biološke aktivnosti.

Iako metanolni i polisaharidni ekstrakti ostalih testiranih makromiceta nisu pokazali citotoksični potencijal, ove vrste sintetišu brojna jedinjenja koja taj potencijal imaju: lektini (AAL izolovani iz *A. aegerita* u radu Zhao i dr., 2003), terepenoidi (izolovani iz *L. sulphureus* u radu Radić i dr., 2009) i dr. Ovaj podatak ukazuje da je neophodno ispitati kako pojedinačna izolovana jedinjenja tako i njihove smeše (korišćenjem različitih rastvarača) kako bi se prilikom procene citotoksičnog potencijala uključio niz jedinjenja iz različitih grupa od interesa. Dosadašnji objavljeni podaci idu u prilog navedenoj tvrdnji, jer je u nizu istraživanja pokazano da i sirovi ekstrakti i čista jedinjenja (hinoni, izoflavoni, kateholi, steroidi, glukani, glikoproteini, proteini, lektini i dr.) imaju veliki *in vitro* i *in vivo* antitumorski potencijal. Problem sa *in vitro* rezultatima je što predstavljaju samo naznaku terapijske vrednosti makromiceta, dok je za njihovu kliničku primenu neophodna identifikacija aktivnih jedinjenja, rasvetljavanje mehanizama delovanja, određivanje sigurne doze i dr. (Daba i Ezeronye, 2003; Patel i Goyal, 2012).

Zahvaljujući intenzivnim proučavanjima, danas se zbog visoke antitumorske aktivnosti koristi oko 30 vrsta makromiceta (Soković i dr., 2017), a iz nekih od njih su izolovana aktivna jedinjenja koja ostvaruju ovu aktivnost različitim mehanizmima: indukcijom programirane ćelijske smrti, imunomodulacijom, antioksidativnim potencijalom, kao i spečavanjem proliferacije i inflamcije (Stajić, 2015). Potencijal lentinana, krestina, psilocibina i šizofilana je već poznat, kao i činjenica da su ova jedinjenja visoko efikasna kada se koriste samostalno u terapiji, ali i u kombinaciji sa drugim metodama lečenja (hirurški tretman, hemioterapija i terapija zračenjem) (Ferereira i dr., 2010; Patel i Goyal, 2012).

Tabela 21. Citotoksična aktivnost metanolnog i polisaharidnog ekstrakta testiranih makromiceta na tumorske ćelijske linije humanog porekla ($GI_{50} \pm SD$)

Makromicete ($\mu\text{g/mL}$)	Ekstrakt	MCF – 7	NCI – H460	HeLa	HepG2	PLP2
Kontrola						
<i>Agrocybe aegerita</i> 1	Metanolni	>400	>400	>400	>400	>400
	Polisaharidni	>400	>400	>400	>400	>400
<i>Laetiporus sulphureus</i> 1	Metanolni	>400	>400	>400	>400	>400
	Polisaharidni	239,57 \pm 2,44	181,49 \pm 12,58	72,26 \pm 5,37	>400	>400
<i>Polyporus squamosus</i> 1	Metanolni	>400	>400	>400	>400	>400
	Polisaharidni	>400	>400	>400	>400	>400
<i>Pleurotus ostreatus</i> S	Metanolni	>400	>400	>400	>400	>400
	Polisaharidni	>400	>400	>400	>400	>400
<i>Pleurotus ostreatus</i> K	Metanolni	>400	>400	>400	>400	>400
	Polisaharidni	>400	>400	>400	>400	>400
Elipticin		0,91 \pm 0,04	1,03 \pm 0,09	1,91 \pm 0,06	1,14 \pm 0,21	3,22 \pm 0,67

MCF7: ćelijska linija humanog karcinoma dojke, **NCI – H460:** ćelijska linija humanog karcinoma nemalih ćelija pluća; **HeLa:** ćelijska linija humanog karcinoma cerviksa; **HepG2:** ćelijska linija humanog primarnog karcinoma jetre; **PLP2:** netumorska ćelijska linija svinjske jetre

4.5. Opšta diskusija

Iz kolekcije identifikovanih makromiceta sakupljenih sa teritorije Republike Srbije, izbor za dalja istraživanja napravljen je na osnovu zastupljenosti vrste, njene jestivosti kao i literaturnih podataka o medicinskom potencijalu. Testirane vrste prvi put su okarakterisane u pogledu sadržaja makronutrijenata i metabolita, kao i određenih aspekata biološke aktivnosti.

Dobijeni rezultati pokazali su da su testirane vrste makromiceta značajan izvor nutritivno važnih jedinjenja koja mogu značajno doprineti poboljšanju zdravlja, dok ih nizak energetski sadržaj čini značajnom hranom u dijetalnim režimima ishrane. Pored toga što sadrže esencijalne makronutrijente, testirane vrste su bogate i organskim kiselinama sa/bez fenolne grupe, kao i masnim kiselinama i tokoferolima. Identifikovane organske kiseline čine mali, ali sa aspekta biološke aktivnosti značajan deo suve mase makromiceta i njihov sadržaj je u pozitivnoj korelaciji sa nivoom antioksidativne aktivnosti. Analizom masnih kiselina je pokazano da polinezasićene masne kiseline dominiraju u testiranim uzorcima u odnosu na zasićene, što je važan podatak imajući u vidu da makromicete imaju nizak ukupni sadržaj masti.

Uzevši u obzir dobijene podatke analize nutritivne vrednosti i odabranih metabolita, može se zaključiti da testirane makromicete pre svega imaju potencijal kao funkcionalna hrana zahvaljujući dobrom profilu i odnosu makronutrijenata kao i prisustvu biološki aktivnih jedinjenja, mada se ne sme zanemariti njihov potencijal u medicini i farmaciji, što je zaključak i istraživanja Soković i dr. (2018).

Iako su svi eksperimenti biološke aktivnosti izvedeni u *in vitro* uslovima koji samo delimično aproksimiraju uslove koji postoje u *in vivo* sistema, dobijeni rezultati su dobra polazna osnova za dalje analize i moguća preklinička i klinička testiranja. Danas se veliki broj oboljenja dovodi u vezu sa povećanim oksidativnim stresom, pa je procena potencijalnih antioksidativnih agenasa prirodnog porekla putem više protokola od velikog značaja kako bi se nakon korelacije podataka procenio realan potencijal testiranog jedinjenja kao antioksidansa. Svi testirani uzorci u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali antioksidativnu aktivnost, slabiju od komercijalnog troloksa, a TBARS metoda je dala najbolje rezultate. Imajući u vidu negativne propratne efekte koje mogu prouzrokovati komercijalni antioksidansi, svi rezultati koji pokazuju pozitivan efekat prirodnih supstanci su veoma važni. Ipak, odgovor na pitanje da li moćni *in vitro* antioksidansi zaista predstavljaju i moćne *in vivo* antioksidanse je i dalje predmet

kontroverzi. Ono što je pouzdano poznato je da kompleksno hemijsko okruženje u živim sistemima zapravo diktira aktivnost nekog biološkog jedinjenja.

Testirani ekstrakti su pokazali slabiji antimikrobni potencijal od komercijalno dostupnih antibiotika (osim u pojedinačnim slučajevima), a potvrđeno je da izbor rastvarača značajno utiče na stepen antimikrobne aktivnosti. Dobijeni rezultati su ukazali da makromicete imaju perspektivu antimikrobnih agenasa, naročito ukoliko se definiše aktivno jedinjenje i njegov mehanizam delovanja. Testirani metanolni ekstrakti efikasno su ometali i međucelijsku komunikaciju na subinhibitornom nivou, što je zaključeno prema promenama u strukturama za disperziju kolonije *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, smanjenoj produkciji pirocinanina i slabije formiranom biofilmu, a anti-QS efekat je u nekim slučajevima bio bolji i od streptomocina i ampicilina koji su korišćeni kao pozitivna kontrola. Mogućnost ometanja bakterijske komunikacije jedinjenjima prirodnog porekla, koja je dokazana u ovom radu, predstavlja zapravo i potencijalno novi put kontrole bolesti uzrokovane ovim patogenom.

Rezultati analize citotoksičnog potencijala testiranih makromiceta pokazali su da je polisaharidni ekstrakt uzorka *L. sulphureus* 1 jedini pokazao aktivnost koja se u poređenju sa komercijalno dostupnim agansom elipticinom može označiti kao umerena do slaba, u zavisnosti od testirane ćelijske linije.

Iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 izolovan je i okarakterisan lektin kao komponenta od interesa, ali analiza biološke aktivnosti nije pokazala antibakterijski potencijal. Ipak, nije isključeno da se njihovom konzumacijom ne mogu postići neki drugi biološki efekti.

Trenutno je na svetskom tržištu lekova i pomoćnih lekovitih sredstava dostupan veliki broj proizvoda na bazi gljiva sa lekovitim svojstvima, koji su svrstani u posebnu kategoriju poznatu pod različitim terminima, najčešće kao „nutraceutikali“, „nutriceutici“ ili „aditivi funkcionalnoj hrani“, „suplementi“ i dr. (Morris i dr., 2017). Većina ovih „kovanica“ nastala je kao posledica potrebe da se naglase biološki efekti proizvoda na bazi gljiva, a u zavisnosti od zakonske regulative zemalja neki termini se koriste kao sinonimi. Ubedljivo dominiraju preparati na bazi plodonosnih tela, sa čak 85% proizvoda, dok je preostalih 15% na bazi micelije. Efikasnost i sirovinsko poreklo mnogih od ovih preparata je neophodno proveriti, jer se, zahvaljujući neusaglašenim zakonskim regulativama, na tržištu nalazi i veliki broj onih koji nemaju efekat zbog kojeg se distribuiraju. Sve ovo ukazuje da je potražnja za funkcionalnim

sastojcima ili bioaktivnim jedinjenjima iz prirodnih izvora povećana, pa i pred toga, preparati na bazi makromiceta sa medicinskim svojstvima često se ne prihvataju kao lekovito sredstvo u konvencionalnoj medicini jer ne odgovaraju njenim standardima (neophodno je opisati mehanizam delovanja, efekat na model životinje, toksičnost, odrediti sigurne doze i proceniti kliničku vrednost).

Mikoterapija je nova, multidisciplinarna grana nauke koja proučava zdravstvene efekte jestivih i gljiva sa medicinskim svojstvima. Dostigla je značajan progres poslednjih 30 godina, na šta ukazuje podatak da je u tom periodu urađeno preko 50 000 naučnih studija i čak 400 kliničkih testiranja, prijavljeno je 15 000 patenata, a do sada je objavljen najveći broj studija o biološkoj aktivnosti predstavnika familije Polyporaceae (Grienke i dr., 2014; Soković i dr., 2017; Morris i dr., 2017).

Istraživanja u oblasti jestivih i lekovitih gljiva su od velikog značaja za samu nauku, jer doprinose novim saznanjima, stvaraju uvid u prirodne procese i rasvetljavaju opšte naučne zakonitosti. Rezultati sprovedenih istraživanja su još jednom pokazali su gljive izvanredan izvor proteina i dijetetskih vlakana sa niskokaloričnim indeksom, kao i brojnih biološki aktivnih jedinjenja zbog čega imaju potencijal u prevenciji raznih oboljenja. Višestruki biološki potencijal koji je pokazan za testirane jestive i lekovite makromicete, omogućava njihovu dalju primenu kao profilaktičkih agenasa kod bolesti čiji je osnovni uzrok povezan sa oksidativnim stresom (antioksidativni potencijal), bakterijskim i gljivičnim infekcijama (antimikrobni potencijal) i razvojem tumorskih ćelija (citotoksična aktivnost).

U svetlu svih dobijenih naučnih rezultata, na raskršću istočne i zapadne medicine, smatra se da će se i životni vek i kvalitet života ljudske populacije značajno unaprediti. Saradnja između različitih aspekata nauke i marketinga mora biti sprovedena kako bi se dobijena saznanja prenela do javnosti i ohrabrila upotreba, gajenje i dalja proučavanja makromiceta.

5. Zaključci

Na osnovu rezultata istraživanja ove doktorske disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Ugljeni hidrati su glavni nutrijenti prisutni u svim testiranim vrstama (opseg vrednosti iznosio je 72,64 g/100 g suve mase – 87,59 g/100 g suve mase), za njima slede proteini (opseg vrednosti iznosio je 5,54 g/100 g suve mase – 15,97 g/100 g suve mase), pepeo sa mineralnim elementima (opseg vrednosti iznosio je 3,42 g/100 g suve mase – 9,03 g/100 g suve mase) i masti (opseg vrednosti iznosio je 1,55 g/100 g suve mase – 2,86 g/100 g suve mase);
- Testirane makromicete su niskokalorijske namirnice, energetske vrednosti u opsegu 375,62 kcal/100 g suve mase za uzorak *L. sulphureus* 1 – 396,07 kcal/100 g suve mase za uzorak *L. sulphureus* 3;
- Analiza odabranih šećera makromiceta pokazala je prisustvo ramnoze, fruktoze, manitola, glukoze i trehaloze koja je bila najzastupljenija u samoniklom i komercijalnom soju *P. ostreatus*;
- U testiranim uzorcima identifikovane su α -, β -, γ - i δ - izoforme tokoferola; sadržaj α - tokoferola je najviša izmerena vrednost u uzorku *L. sulphureus* 1 (109,25 μ g/100 g suve mase);
- Testirane makromicete su značajan izvor prostih organskih kiselina, na šta ukazuje njihov ukupni sadržaj: 2,08 g/100 g suve mase kod *P. ostreatus* S – 8,00 g/100 g suve mase kod *L. sulphureus* 2; oksalna kiselina je najviša izmerena vrednost u uzorku *L. sulphureus* 2 – 5,69 g/100 g suve mase;
- Ukupni sadržaj fenolnih kiselina je varirao u opsegu 0,17 mg/100 g suve mase kod uzorka *L. sulphureus* 1 do 7,74 mg/100 g suve mase kod uzorka *L. sulphureus* 2 što je posledica visokog sadržaja *p*-hidroksibenzoeve kiseline u ovom uzorku (4,54 mg/100 g suve mase);
- Kod testiranih uzoraka polinezasićene masne kiseline višestruko dominiraju u odnosu na zasićene masne kiseline, a u najvećoj meri su identifikovane linolna, oleinska i palmitinska masna kiselina;
- Iz bazidiokarpa uzorka *L. sulphureus* 1 izolovan je i okarakterisan čist, multimeran lektin, pI vrednosti ~ 4,6, čije su subjedinice sledećih molekulskih masa: ~ 30 i 60 kDa, pri čemu je proteinska traka na masi od 60 kDa verovatno zaostali dimer;

- Svi testirani uzorci pokazali su antioksidativnu aktivnost, ali slabiju od komercijalno dostupnog troloksa; uzorak *L. sulphureus* 1 pokazao je najveći antioksidativni potencijal u DPPH• i β-karoten/linolna kiselina testu; uzorak *P. ostreatus* K je pokazao najbolju redukcionu sposobnost, uz EC₅₀ vrednost 1,88 mg/mL;
- Rezultati TBARS analize su u poređenju sa ostalim metodama *in vitro* procene antioksidativne aktivnosti pokazali najbolju aktivnost: najviši antioksidativni kapacitet imao je uzorak *L. sulphureus* 3 (EC₅₀ 0,25 mg/mL), a najniži *P. ostreatus* K (EC₅₀ 2,40 mg/mL);
- U uzorku *A. aegerita* 1 izmeren je najveći ukupni sadržaj fenola– 17,36 mg GAE/g ekstrakta;
- Metanolni i etanolni ekstrakti bazidiokarpa testiranih makromiceta efikasniji su antimikrobni agensi od vodenog ekstrakata, ali su generalno slabiji od komercijalno dostupnih antimikrobnih agenasa;
- Etanolni ekstrakt uzorka *P. squamosus* 1 pokazao je najbolji antibakterijski potencijal meren mikrodilucionom metodom, uz MIK vrednost 0,02 mg/mL i MBK 0,04 mg/mL na *S. aureus*;
- Vodeni ekstrakt *P. ostreatus* S je pokazao najslabiju antibakterijsku aktivnost merenu mikrodilucionom metodom, uz MIK vrednost 12,50 mg/mL i MBK 25,00 mg/mL na *L. monocytogenes*;
- Bioautografskom metodom je pokazano da je *E. coli* najotpornija na delovanje testiranih ekstrakata, dok je najveća zona inhibicije uočena za uzorak *L. sulphureus* 3;
- Lektin izolovan iz bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 nije pokazao antibakterijsku aktivnost pri testiranim koncentracijama;
- Najbolji antifungalni potencijal pokazao je etanolni ekstrakt *L. sulphureus* 1 na *A. versicolor*, uz MIK 0,03 mg/mL i MFK 0,13 mg/mL;
- Najslabiji antifungalni potencijal imali su metanolni ekstrakt *A. aegerita* 1 na *A. fumigatus* (MFK je iznosila 18,96 mg/mL) i vodeni ekstrakt *P. ostreatus* S na *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. niger* i *T. viride* (MFK je iznosila 25,00 mg/mL);
- Metanolni ekstrakti testiranih makromiceta efikasno su pri subMIK koncentracijama redukovali dijametar kolonije PAO1, strukture za kretanje, sintezu piocijanina, dok antibiofilm efekat nisu pokazali samo uzorci *L. sulphureus* 3 i *P. ostreatus* K;
- Uočena je značajna interspecijska varijabilnost u pogledu hemijskog sastava i rezultata biološke aktivnosti kod uzoraka *L. sulphureus* 1, 2 i 3 i *P. ostreatus* S i K;

- Polisaharidni ekstrakt bazidiokarpa *L. sulphureus* 1 jedini je pokazao citotoksični potencijal na tumorske ćelijske linije humanog porekla HeLa, NCI-H460 i MCF-7, a ekstrakti nisu pokazali citotoksični potencijal na primarne hepatocite PLP2 svinje;
- Testirani ekstrakti su slabiji citotoksični agensi od komercijalnog citostatika elipticina;

6. Prilog

Potrebni rastvori za nativnu i SDS PAGE, procedura bojenja gela nakon elektroforeze su rađeni po metodama iz praktikuma Eksperimentalna biohemija (Vujičić, 2002):

1. Monomerni rastvor akrilamida i bisakrilamida (30% T*; 2,7% C*). Oznaka u tabeli je AA. Oznaka T* se odnosi na: g akrilamida + g bisakrilamida u 100 mL rastvora; oznaka C* se odnosi na: g bisakrilamida u odnosu na zbirnu masu akrilamida i bisakrilamida; obe vrednosti se izražavaju u procentima:

Akrilamid	58,40 g
Bisakrilamid	1,60 g
Voda do	200,00 mL

2. Priprema gelova:

Gel (%)	12%	10%	8%	6%	4% *
dH₂O	3,40 mL	6,56 mL	4,70 mL	5,35 mL	3,05 mL
30% AA	4,00 mL	5,28 mL	2,70 mL	1,98 mL	0,65 mL
TRIS pH 8.8	2,50 mL	4,00 mL	2,50 mL	2,47 mL	1,25 mL pH 6,8
SDS*1	100 µL	160 µL	100 µL	100 µL	50 µL
APS	100 µL	160 µL	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	10 µL	16 µL	10 µL	10 µL	5 µL

*Koncentrujući gel;

*10% SDS se dodaje samo kod SDS PAGE;

3. Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris HCl, pH 6,8). Oznaka u tabeli je pH 6,8.

Tris	6,05 g
Voda do	100,00 mL
4M HCl do	pH 6,8

4. Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris HCl pH 8,8, oznaka u tabeli Tris pH 8,8):

Tris	36,30 g
Voda do	200,00 mL
4M HCl do	pH 8,8

5. Radni pufer za nativnu i SDS PAGE (0,025 M Tris, 0,192 M Glicin, 0,1% SDS, pH 8,3):

Komponente	1 x
Tris	3,00 g
Glicin	14,40 g
10% SDS*	10,00 mL
Voda	Do 1 L

*SDS se dodaje samo kod SDS PAGE;

6. Inicijator reakcije polimerizacije je amonijum persulfat. Oznaka u tabeli je APS.

APS	0,20 g
Voda do	2,00 mL

Pored APS-a, kao katalizator reakcije polimerizacije akrilamida se koristi reagens tetrametiletilendiamin (TEMED) u odgovarajućoj zapremini, koja je navedena u Tabeli pod 2.

7. Uzorci za elektroforezu se pripremaju različito u zavisnosti od tipa uslova u kojima se odvija PAGE:

Rastvori za PUZ	1 X	2 X	3 X* ¹
0,5 M Tris HCl pH 6,8	3,12 mL	6,25 mL	9,38 mL
99% glicerol	2,50 mL	5,00 mL	7,5 mL
ili 85% glicerol	3,00 mL	6,00 mL	(9,0 mL)
čvrst ili 10% SDS*²	0,50 g (5,00 mL)	1,00 g (10,00 mL)	1,50 g
0,1% brom fenol plavo*³	0,50 mL	1,00 mL	1,50 mL
voda do	23,75 mL	22,50 mL	21,25 mL
komercijalni β – ME*⁴	1,25 mL	2,50 mL	3,75 mL
PUZ + β – ME (μL)	950/50	900/100	850/150

*¹ 3 X se koristi za uzorke sa niskom koncentracijom proteina;

*² SDS se dodaje samo prilikom SDS PAGE, ukoliko je u pitanju nativna PAGE, zapremina se nadomesti istom zapreminom destilovane vode;

*³ 0.1% brom fenol plavo: 0,02 g boje rastvoriti u 20,00 mL destilovane vode; procediti kroz filter papir ako ima ostataka;

*⁴ β – ME: β – merkaptetanol;

8. Rastvor za fiksiranje gelova nakon PAGE (50% metanol, 10% sirćetna kiselina):

Metanol	500,00 mL
Sirćetna kiselina	100,00 mL
Voda	do 1,00 L

9. Rastvor CBB boje za bojenje gela nakon PAGE (0,1% CBB, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina):

CBB G ili R 250	0,50 g
Rastvor 8.	do 0,50 L

10. Rastvor za obezbojavanje gelova (5% metanol, 7% sirćetna kiselina):

Metanol	50,00 mL
Sirćetna kiselina	70,00 mL
Voda	do 1,00 L

U izradi ove doktorske disertacije, korišćeni su 10% gelovi za razdvajanje i 4% gelovi za koncentrovanje (debljine 1mm) za nativnu i SDS PAGE i IEF. Procedura je izvedena prema sledećem redosledu: rastvor gela za razdvajanje je pripremljen prema receptu iz Tabele 2., a katalizatori reakcije (APS i TEMED, redom) su dodati na kraju. Rastvor je lagano pipetiran između ploča i nadslojen destilovanom vodom. Nakon završene polimerizacije (oko 60 min), koncentrujući gel je nadslojen preko gela za razdvajanje i stavljen je češalj. Po završetku polimerizacije gornjeg gela (30 minuta), češalj je izvađen, novonastali bunarčići su isprani vodom i naneti su uzorci pripremljeni prema Tabeli 7. Uslovi PAGE su iznosili: (1) 120 V tokom 10 minuta kroz koncentrujući gel i (2) 160 V tokom 60 minuta kroz razdvajajući gel. Radni pufer korišćen za nativnu PAGE je pripremljen prema recepturi iz Tabela 5. Nakon završene PAGE, dobijeni gelovi su: (1) obojeni bojom Coomassie Brilliant Blue (CBB) G250, ili (2) podvrgnuti elektrotransferu na nitroceluloznu membranu (Western blotting).

11. Proteini (uključujući i lektine) su plavo obojeni rastvorom CBB, na providnom gelu, nakon sledeće procedure:

Faza	Rastvor	Vreme
Ispiranje	Destilovana voda	0,5 min
Fiksiranje	9.	10 minuta
Bojenje	10.	10 minuta
Obezbojavanje	11.	minuta

12. Priprema gela za IEF mini Protean tetra cell vertical:

Komponente	Gel za razdvajanje	Gel za koncentrovanje
AA	2,70 mL	400 μ L
Amfoliti pH opsega 3-10	1,00 mL	-
40 mM NaOH	-	1,35 mL
Glicerol (50%)	1,18 mL	-
Voda	5,12 mL	1,20 mL
TEMED	20,00 μ L	7,00 μ L
APS (10%)	75 μ L	40 μ L

Korišćeni su sledeći amfoliti:

Anodni elektrolit: 10 mM H_3PO_4 (5 mL 1M H_3PO_4 + 495,00 mL destilovane vode);

Katodni elektrolit (između sendviča): 10 mM NaOH;

Nakon završenog IEF, izvršen je transfer na NC membranu (Western blotting), u 0,7% acetatnom puferu na 23 V tokom 90 minuta; membrana je nakon transfera inkubirana sa tripsinizovanim eritrocitima, tokom 30 minuta na 37 °C.

7. Literatura

- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N.E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196 (7), 453–472.
- Acharya, K., Ghosh, S., Khatua, S., Mitra, P. (2016). Pharmacognostic standardization and antioxidant capacity of an edible mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 11 (1), 33–42.
- Adebayo, E., Oloke, J., Aina, D., Bora, T. (2014). Antioxidant and nutritional importance of some *Pleurotus* species. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3 (4), 289–294.
- Adebayo, A., Martinez-Carrera, D., Morales, P., Sobal, M., Escudero, H., Meneses, M.E., Avila-Nava, A., Castillo, I., Bonilla, M. (2018). Comparative study of antioxidant and antibacterial properties of the edible mushrooms *Pleurotus levis*, *P. ostreatus*, *P. pulmonarius* and *P. tuber-regium*. *International Journal of Food Science and Technology*, doi:10.1111/ijfs.13712.
- Ahmad, N., Mahmood, F., Akbar Khalil, S., Zamir, R., Fazal, H., Abbasi, B.H. (2014). Antioxidant activity via DPPH, gram-positive and gram-negative antimicrobial potential in edible mushrooms. *Toxicology and Industrial Health*, 30 (9), 826–834.
- Ahmed, N., Singh, J., Kour, H., Gupta, P. (2013). Naturally Occurring Preservatives in Food and their Role in Food Preservation. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 4 (1), 22–30.
- Aida, F.M.N.A., Shuhaimi, M., Yazid, M., Maaruf, A.G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 20 (11–12), 567–575.
- Ainsworth, G.C. i Bisby, G.R. (1995): *Dictionary of the fungi*. Eds. D.I. Hawksworth, P.M. Kirk, B.C. Sutton, and D.N. Pegler. CAB International, Surrey, UK.
- Akata, I., Ergönül, B., Kalyoncu, F. (2012). Chemical compositions and antioxidant activities of 16 wild edible mushroom species grown in Anatolia. *International Journal of Pharmacology*, 8 (2), 134–138.
- Akkouh, O., Ng, T.B., Singh, S.S., Yin, C., Dan, X., Chan, Y.S., Cheung, R.C.F. (2015). Lectins with anti-HIV activity: A review. *Molecules*, 20 (1), 648–668.

- Akyuz, M., Onganer, A.N., Erecevit, P., Kirbag, S. (2010). Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and Southeast Anatolia region of Turkey. *Gazi University Journal of Science*, 23 (2), 125–130.
- Alam, N., Amin, R., Khan, A., Ara, I., Shim, M.J., Lee, M. W., Lee, T.S. (2008). Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh - *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus florida* and *Calocybe indica*. *Mycobiology*, 36 (4), 228–32.
- Alam, N., Yoon, K.N., Lee, T.S., Lee, U.Y. (2011). Hypolipidemic activities of dietary *Pleurotus ostreatus* in hypercholesterolemic rats. *Mycobiology*, 39 (1), 45–51.
- Alquini, G., Carbonero, E.R., Rosado, F.R., Cosentino, C., Iacomini, M. (2004). Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.)Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 230 (1), 47–52.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A., Pintado, M. (2012a). Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 113 (2), 466–475.
- Alves, M., Ferreira, I.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012b). A review on antimicrobial activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78, 1707–1718.
- Alves, M. J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V, Martins, A., Pintado, M. (2013a). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115 (2), 346–357.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A. (2013b). A Review on Antifungal Activity of Mushroom Extracts and Isolated Compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13 (21), 2648–2659.
- Alves, M., Ferreira, I., Lourenço, I., Costa, E., Martins, A., Pintado, M. (2014). Wild Mushroom Extracts as Inhibitors of Bacterial Biofilm Formation. *Pathogens*, 3 (3), 667–679.
- ADA, (2009). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 32 (Suppl 1), S62–S67. <http://doi.org/10.2337/dc09-S062>
- An, L.J., Guan, S., Shi, G.F., Bao, Y.M., Duan, Y.L., Jiang, B. (2006). Protocatechuic acid from *Alpinia*

oxyphylla against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 436–443

Anandhi, R., Annadurai, T., Anitha, T.S., Muralidharan, A.R., Najmunnisha, K., Nachiappan, V., Geraldine, P. (2013). Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69 (2), 313–323.

Andrade, R.J., Tulkens, P.M. (2011). Hepatic safety of antibiotics used in primary care. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66 (7), 1431–46.

Angulo, I., Acebrón, I., De Las Rivas, B., Muñoz, R., Rodríguez-Crespo, I., Menéndez, M., Mancheño, J.M. (2011). High-resolution structural insights on the sugar-recognition and fusion tag properties of a versatile-trefoil lectin domain from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Glycobiology*, 21 (10), 1349–1361.

Antunes, L.C.M., Ferreira, R.B.R., Buckner, M.M.C., Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, 156 (8), 2271–2282.

AOAC, (1995). Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists, Arlington VA, USA, 16th ed.

Appleton, R.E., Jan, J.E., Kroeger, P.D. (1988). *Laetiporus sulphureus* causing visual hallucinations and ataxia in a child. *Cmaj*, 139 (1), 48–49.

Arora, S., Tandon, S. (2015). Mushroom Extracts Induce Human Colon Cancer Cell (COLO-205) Death by Triggering the Mitochondrial Apoptosis Pathway and G0/G1-Phase Cell Cycle Arrest. *Archives of Iranian Medicine*, 18 (5), 284–295.

Baati, T., Horcajada, P., Gref, R., Couvreur, P., Serre, C. (2011). Quantification of fumaric acid in liver, spleen and urine by high-performance liquid chromatography coupled to photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 758–762.

Babakhin, A.A., Vedernikov, A.A., Babakhin, A.A., Leskov, V.P., Pisarev, V.M., Logina, N.Y., Dubuske, L. (1999). Immunosuppressive activity of the extract of high mycelium fungus *Polyporus squamosus*, *Allergy and Asthma Proceedings*, 18 (5), 301–310.

Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., Haghi, F. (2017). Inhibition of *Pseudomonas*

- aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 21–28.
- Balouiri, M., Sadiki, M. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Banukie, N., Jayasuriya, W.J.A., Wanigatunge, C.A., Fernando, G.H., Abeytunga, D.T.U., Suresh, T.S. (2015). Hypoglycaemic activity of culinary *Pleurotus ostreatus* and *P. cystidiosus* mushrooms in healthy volunteers and Type 2 diabetic patients on diet control and the possible mechanisms of action. *Phytotherapy Research*, 29 (2), 303–309.
- Baraza, L.D., Nesor, W., Jackson, K.C., Fredrick, J.B., Dennis, O., Wairimu, K.R., Heydenreich, M. (2016). Antimicrobial coumarins from the oyster culinary - medicinal mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Agaricomycetes), from Kenya. *International Journal of Medicinal Mushroom*, 18 (10), 905–913.
- Barroetaveña, C., Toledo, C.V. (2017). The Nutritional Benefits of Mushrooms. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. and Barros, L. (Eds). *Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications*, Wiley Blackwell, pp 65-81.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., Ferreira, I.C.F.R. (2007a). Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105 (1), 140–145.
- Barros, L., Ferreira, M.J., Queiros, B., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P. (2007b). Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 103 (2), 413–419.
- Barros, L., Calhelha, R.C., Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Estevinho, L.M. (2007c). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*, 225 (2), 151–156.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2007d). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (12), 4781–4788.
- Barros, L. (2008a). *Chemical Characterization and Bioactive Properties of Portuguese Wild Edible Mushrooms*. (Tesis de doctorado), Universidad de Salamanca - Facultad de Farmacia.

- Barros, L., Correia, D.M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2008b). Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110 (4), 1046–1050.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C. (2009). Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. *Food and Chemical Toxicology*, 47 (6), 1076–1079.
- Barros, L., Pereira, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Optimized Analysis of Organic Acids in Edible Mushrooms from Portugal by Ultra Fast Liquid Chromatography and Photodiode Array Detection. *Food Analytical Methods*, 6 (1), 309–316.
- Bauer Petrovska, B. (2001). Protein fraction in edible Macedonian mushrooms. *European Food Research and Technology*, 212, 469-472.
- Begić-Akagić, A., Spaho, N., Gaši, F., Drkenda, P., Vranac, A., Meland, M. (2014). Sugar and organic acid profiles of the traditional and international apple cultivars cultivars for processing. *Journal on Hygienic Engineering & Design*, 7,190-196.
- Berg, A., Dorfeltb, H., Kietc, T.T., Schlegela, B., Grafea, U. (2002). Agrocybolacton, a New Bioactive Metabolite from *Agrocybe* sp. HKI 0259. *The Journal of Antibiotics*, 55 (9), 12–14.
- Bobek, P., Galbavý, Š. (2001). Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Science*, 58 (3), 164–168.
- Booth, C. (1971). Fungal culture media, U: Norris, J.R. and Ribbons, J.W. (Eds). *Methods in microbiology*, Academic Press, pp 49-94.
- Butler, M. (2005). Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Natural Products Reports*, 22, 162-195.
- Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanism of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10 (4), 221-247.
- Calhelha, R.C., Falcão, S., Queiroz, M.J.R.P., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R. (2014). Cytotoxicity of Portuguese Propolis: The Proximity of the *In Vitro* Doses for Tumor and Normal Cell Lines. *Biomed Research International*, 1-7.

- Campbell, S., Stone, W., Whaley, S., Krishnan, K. (2003). Development of gamma (γ)-tocopherol as a colorectal cancer chemopreventive agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 47, 249–259.
- Cao, X.Y., Liu, J.L., Yang, W., Hou, X., Li, Q.J. (2015). Antitumor activity of polysaccharide extracted from *Pleurotus ostreatus* mycelia against gastric cancer *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Medicine Reports*, 12 (2), 2383–2389.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51 (1), 15-25.
- Chang, S.T., Miles, P. (2004). *Mushrooms. Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press LLC.
- Cheng, J.J., Lin, C.Y., Lur, H.S., Chen, H.P., Lu, M.K. (2008). Properties and biological functions of polysaccharides and ethanolic extracts isolated from medicinal fungus, *Fomitopsis pinicola*. *Process Biochemistry*, 43, 829-834.
- Chirinang, P., Intarapichet, K.O. (2009). Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*. *ScienceAsia*, 35 (4), 326–331.
- Choma, I.M., Grzelak, E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218 (19), 2684–2691.
- Choudhury, M., Rahman, T. (2013). Effects of *Pleurotus ostreatus* on blood pressure and glycemc status of hypertensive diabetic male volunteers. *Bangladesh Journal of Medicinal Biochemistry*, 6 (1), 5–10.
- Chow, S., Gu, K., Jiang, L., Nassour, A. (2011). Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, 15, 22–29.
- Chowdhury, M., Kubra, K., Ahmed, S., Barros, L., Ferreira, M., Queiros, B., Rahman, A. (2015). Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14 (1), 8.

- Chu, K.T., Xia, L., Ng, T.B. (2005). Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides*, 26 (11), 2098–2103.
- Clifford, M.N., Scalbert, A. (2000). Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118–1125.
- Conrad, F., Rudiger, H. (1994). The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase. *Phytochemistry*, 36 (2), 277–283.
- Culyba, M.J., Mo, C.Y., Kohli, R.M. (2015). Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*, 54 (23), 3573-82.
- Daba, A.S., Ezeronye, O.U. (2003). Anticancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2, 672–678.
- Davoli, P., Mucci, A., Schenetti, L., Weber, R.W.S. (2005). Laetiporic acids, a family of non-carotenoid polyene pigments from fruit-bodies and liquid cultures of *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Phytochemistry*, 66 (7), 817–823.
- De Silva, D.D., Rapior, S., Hyde, K.D., Bahkali, A.H. (2012). Medicinal mushrooms in prevention and control of Diabetes mellitus. *Fungal Diversity*, 56 (1), 1–29.
- De Silva, D.D., Rapior, S., Sudarman, E., Stadler, M., Xu, J., Aisyah Alias, S., Hyde, K.D. (2013). Bioactive metabolites from macrofungi: Ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity*, 62 (1), 1–40.
- Deepalakshmi, K., Mirunalini, S. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Biotechnology*, 5 (2), 718–726.
- Deol, B.S., Ridley, D.D., Singh, P. (1978). Isolation of cyclodepsipeptides from plant pathogenic fungi. *Australian Journal of Chemistry*, 31 (6), 3–5.
- Destefanis, L. (2015). Structural studies of *Pleurotus ostreatus* Lectin (POL), a fungal protein of medical interest, Doctoral thesis, Università degli Studi di Verona.
- Devi, M.R., Krishnakumari, S. (2015). Quantitative estimation of primary and secondary metabolites in hot aqueous extract of *Pleurotus sajor caju*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4 (3), 198-202.
- Dhamodharan, G., Nadu, T. (2011). Identification of Mushroom Lectins and Its Medicinal Properties.

Pharmacologyonline, 1, 170–184.

- Dimitrijević, M., Jovanović, V.S., Cvetković, J., Mihajilov-Krstev, T., Stojanović, G., Mitić, V. (2015). Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Analytical Methods*, 7 (10), 4181–4191.
- Diyabalanage, T., Mulabagal, V., Mills, G., DeWitt, D.L., Nair, M.G. (2008). Health-beneficial qualities of the edible mushroom, *Agrocybe aegerita*. *Food Chemistry*, 108 (1), 97–102.
- Doskočil, I., Havlik, J., Verlotta, R., Tauchen, J., Vesela, L., Macakova, K., (2016). *In vitro* immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmaceutical Biology*, 209, 1–8.
- Duru, M.E., Çayan, G.T. (2015). Biologically active terpenoids from mushroom origin: A review. *Records of Natural Products*, 9 (4), 456–483.
- EFSA, 2011. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, 9 (10), 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392.
- Ejelonu, O.C., Akinmoladun, A.C., Elekofehinti, O.O., Olaleye, M.T. (2013). Antioxidant profile of four selected wild edible mushrooms in Nigeria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5 (7), 286–295.
- Ekor, M. (2014). The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Neurology*, 4, 1–10.
- Elbatrawy, E.N., Ghonimy, E.A., Alassar, M.M., Wu, F.S. (2015). Medicinal mushroom extracts possess differential antioxidant activity and cytotoxicity to cancer cells. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17 (5), 471–479.
- El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Shahin, A.A.M., El-Bialy, H.A., Omara, A.M.A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8 (1), 36–48.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 337–345.

- Ericsson, D.C.B., Ivonne, J.N.R. (2009). Sterol composition of the macromycete fungus *Laetiporus sulphureus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45 (2), 193–196.
- Ergönül, G.P., Akata, I., Kalyoncu, F., Ergönül, B. (2013). Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*, 4.
- Ershova, Ei., Tikhonova,, Efremenkova, O.V, Kamzolkina, O.V, Dudnik Iu, V. (2003). Antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* strains grown in submerged culture. *Antibiotics and Chemotherapy*, 48 (1), 18–22.
- FAO (1991). Food and Agriculture Organization: Protein Quality evaluation. Rome: Food and Agricultural Organization of the United Nations.
- FAO/WHO (1989). Protein quality evaluation. Report of the joint FAO/ WHO expert consultation. Food and Nutrition Paper no. 51. Food and Agriculture Organizations and the World Health Organization, Rome, Italy.
- Faridur, R.M., Karim, M.R., Farhadul, I.M., Rowshanul, H.M., Hossain, M.T. (2010). Phytochemical and cytotoxic investigation on Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Research Journal of Pharmacy*, 1 (1), 342-345.
- Feng, L., Sun, H., Zhang, Y., Li, D.F., Wang, D.C. (2010). Structural insights into the recognition mechanism between an antitumor galectin AAL and the Thomsen-Friedenreich antigen. *FASEB Journal*, 24 (10), 3861–3868.
- Fernandes, Â., Barros, L., Martins, A., Herbert, P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.exFr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. *Food Chemistry*, 169, 396–400.
- Fernandes, Â., Petrović, J., Stojković, D., Barros, L., Glamočlija, J., Soković, M., Ferreira, I.C.F.R. (2016). *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr from different origins: Chemical characterization, screening of the bioactive properties and specific antimicrobial effects against *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 91–97.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*, 100 (4), 1511–1516.

- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16 (12), 1543–1560.
- Ferreira, I.C.F.R., Vaz, J., Vasconcelos, M.H., Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10 (5), 424–436.
- Glamočlija, J., Soković, M. (2017). Fungi: a source with huge potential for "mushroom pharmaceuticals". *Lekovite sirovine*, 37, 50-56.
- González-Tijera, M., Márquez-Fernández, O., Mendoza-López, R., Mata, G., Trigos, Á. (2014). A comparison of fatty acid content in three species of the genus *Pleurotus*. *Revista Mexicana de Micología*, 39, 41-45.
- Grangeia, C., Heleno, S.A., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*, 44, 1029-1035.
- Gregori, A., Švagelj, M., Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3), 238–249.
- Grienke, U., Zöll, M., Peintner, U., Rollinger, J. M. (2014). European medicinal polypores - A modern view on traditional uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 154 (3), 564-583.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., Dárrigo, M., Rostagno, M.A., Villares, A., Martínez, J.A. (2010). Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81 (7), 715–723.
- Konska, G., Guillot, J., Dusser, M., Damez, M., Bottom, B. (1994). Isolation and Characterization Lectin from the Mushroom of an N-Acetyllactosamine-Binding Lectin from Mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Biochemistry*, 116, 519-523.
- Guillot, J., Konska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (3), 203–230.
- Gupta, P., Chhibber, S., Harjai, K. (2016). Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian Journal of Medical Research*, 143, 643–651.
- Hadžić, I., Vukojević, J. (2008). *Ilustrovani rečnik sveta gljiva*. Blaženčić, J., Nikšić, M. (Eds), NNK

Internacional.

- Hadžić I., Vukojević, J. (2013). Atlas Gljiva. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8 (8), 1–14.
- Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: Less paradoxical now? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75 (3), 637–644.
- Han, S.R., Kim, K.H., Lim, K.O., Oh, T.J. (2015). Biological Activity Analysis of Different Solvent Extracts from *Pleurotus ostreatus*. *Indian Journal of Science and Technology*, 8 (26).
- Harvey, A.L. (2007). Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11 (5), 480–484.
- Hassan, M.A.A., Rouf, R., Tiralongo, E., May, T.W., Tiralongo, J. (2015). Mushroom lectins: Specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (4), 7802–7838.
- He, J.B., Tao, J., Miao, X.S., Bu, W., Zhang, S., Dong, Z.J., Liu, J.K. (2015a). Seven new drimane-type sesquiterpenoids from cultures of fungus *Laetiporus sulphureus*. *Fitoterapia*, 102, 1–6.
- He, J.B., Tao, J., Miao, X.S., Feng, Y.P., Bu, W., Dong, Z.J., Liu, J.K. (2015b). Two new illudin type sesquiterpenoids from cultures of *Phellinus tuberculatus* and *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 17 (11), 1054–1058.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2009). Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93 (2), 195–199.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119 (4), 1443–1450.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. *LWT Food Science and Technology*, 44, 1343–1348.

- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513.
- Hepel, M., Andreescu, S. (2015). Oxidative Stress and Human Health. *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*, 2 (7), 1–33.
- Herdeiro, R.S., Pereira, N.D., Panek, A.D., Eleutherio, E. C. (2006). Trehalose protect *Sacchomyces cerevisiae* form lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760 (3), 340-346.
- Horvath, G., Jám bor, N., Végh, A., Böszörményi, A., Lemberkovics, É., Héthelyi, É., Kovács, K., Kocsis, B. (2010). Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC-bioautography. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 178-182.
- Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E.K., Alam, N., Hussain, S., Hasan, M., Mahmud, I. (2003). Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30 (7), 470–475.
- Hwang, H.S., Lee, S.H., Baek, Y.M., Kim, S.W., Jeong, Y.K., Yun, J.W. (2008). Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78 (3), 419–429.
- Hwang, H.S., Yun, J.W. (2010). Hypoglycemic effect of polysaccharides produced by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* on streptozotocin induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15 (1), 173–181.
- Isikhuemhen, O.S., Mikiashvili, N.A., Kelkar, V. (2009). Application of solid waste from anaerobic digestion of poultry litter in *Agrocybe aegerita* cultivation: Mushroom production, lignocellulolytic enzymes activity and substrate utilization. *Biodegradation*, 20 (3), 351–361.
- Iwalokun, B.A., Usen, U.A., Otunba, A.A., Olukoya, D.K. (2007). Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (15), 1732–1739.
- Jain, R., Behrens, A.J., Kaefer, V., Kazmierczak, B.I. (2012). Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations. *Journal of Bacteriology*, 194 (16), 4285–4294.

- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 (2), 228-234.
- Jayasuriya, W., Suresh, T.S., Abeytunga, D.T.U., Fernando, G.H., Wanigatunga, C.A. (2012). Oral hypoglycemic activity of culinary-medicinal mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *P. cystidiosus* (Higher basidiomycetes) in normal and alloxan-induced diabetic wistar rats. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14 (4), 347–355.
- Jedinak, A., Dudhgaonkar, S., Wu, Q.-L., Simon, J., Sliva, D. (2011). Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF- κ B and AP-1 signaling. *Nutrition Journal*, 10 (1), 52.
- Jesenak, M., Majtan, J., Rennerova, Z., Kyselovic, J., Banovcin, P., Hrubisko, M. (2013). Immunomodulatory effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *International Immunopharmacology*, 15 (2), 395–399.
- Jesenak, M., Hrubisko, M., Majtan, J., Rennerova, Z., Banovcin, P. (2014). Anti-allergic effect of pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*) in children with recurrent respiratory tract infections. *Phytotherapy Research*, 28 (3), 471–474.
- Ji, Y., Zheng, M.F., Ye, S.G., Wu, X.B., Chen, J.Y. (2013). *Agrocybe aegerita* polysaccharide combined with chemotherapy improves tumor necrosis factor- γ and interferon- γ levels in rat esophageal carcinoma. *Diseases of the Esophagus*, 26 (8), 859–863.
- Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Pan, Y., Gu, B., Sun, H. (2012). A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *The Biochemical Journal*, 443 (2), 369–78.
- Jin, Y., Che, T., Yin, Y., Yu, G., Yang, Q., Liu, W., Sun, H. (2014). Lethal protein in mass consumption edible mushroom *Agrocybe aegerita* linked to strong hepatic toxicity. *Toxicon*, 90 (1), 273–285.
- Kadirvelraj, R., Grant, O.C., Goldstein, I.J., Winter, H.C., Tateno, H., Fadda, E., Woods, R.J. (2011). Structure and binding analysis of *Polyporus squamosus* lectin in complex with the Neu5Ac2-6Gal1-4GlcNAc human-type influenza receptor. *Glycobiology*, 21 (7), 973–984.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113 (1), 9–16.

- Kalač, P., Svoboda, L. (2000). Trace elements contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000-2009. *Food chemistry*, 122, 2-15.
- Kalač, P. (2012). Chemical Composition and Nutritional Value of European Species of Wild growing Mushrooms. U: Andres, S. and Baumann N. (Eds). *Mushrooms: Types, Properties and Nutrition*, Nova Science Publishers, pp. 129-152.
- Kalač, P. (2013). A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (2), 209–218.
- Kalia, V.C. (2013). Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnology Advances*, 31 (2), 224–245.
- Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavuly, M., Popović, M. (2010). Medicinal and Edible Lignicolous Fungi as Natural Sources of Antioxidative and Antibacterial Agents. *Phytotherapy Research*, 24, 1473-1481.
- Karaman, M., Matavulj, M., Janjić, Lj. (2012). Antibacterial agents from Lignicolous Macrofungi. U: Bobbarala, V. (Eds.). *Antimicrobial Agents*. Intech, pp. 361-386.
- 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 (3), 311–9.
- Karatuna, O., Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (12), 1770-1775.
- Kardošová, A., Babor, K., Kubala, J. (1969). Polysaccharides of Wood-destroying Fungi *Polyporus squamosus* (HUDS.) FR. and *Phellinus igniatus* (L.) QUEL, *Chem zvesti*, 408 (1060), 462–468.
- Kearns, D. B. (2011). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9): 634–644.
- Khan, A.A., Gani, A., Ahmad, M., Masoodi, F. A., Amin, F., Kousar, S. (2016). Mushroom varieties found in the Himalayan regions of India: Antioxidant, antimicrobial, and antiproliferative activities. *Food Science and Biotechnology*, 25 (4), 1095–1100.

- Kim, S. E., Lee, I. K., Jung, Y. A., Yeom, J. H., Ki, D.W., Lee, M.S., Yun, B.S. (2012). Mushrooms collected from Deogyu Mountain, Muju, Korea and their antioxidant activity. *Mycobiology*, 40 (2), 134-137.
- Kjelleberg, S., Molin, S. (2002). Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Current Opinion in Microbiology*, 5 (3), 254–258.
- Klaus, A. (2011). Chemical characterisation, antimicrobial and antioxidative characteristics of lignicollic polysaccharides from *Ganoderma* spp., *Laetiporus sulphureus* and *Schizophyllum commune*. PhD thesis, Faculty of Agriculture, University of Belgrade.
- Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, 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 Sciences and Nutrition*, 64 (5), 599–610.
- Koh, C.L., Sam, C.K., Yin, W.F., Tan, L.Y., Krishnan, T., Chong, Y.M., Chan, K.G. (2013). Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors*, 13 (5), 6217–6228.
- Kolundžić, M. D., Grozdanić, N., Stanojković, T.P., Milenković, M.T., Dinić, M.R., Golić, N.E., Kundaković, T.D. (2016). Antimicrobial and cytotoxic activities of the sulphur shelf medicinal mushroom *Laetiporus sulphureus* (Agaricomycetes) from Serbia. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18 (6), 469–476.
- Konska, G., Guillot, J., Dusset, M., Dumez, M., Botton, B. (1994). Isolation and characterization of an N-Acetyllactosamine-Binding Lectin from the Mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Biochemistry*, 116 (3), 519–523.
- Kostić, M., Smiljković, M., Petrović, J., Glamočilija, J., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Ćirić, A., Soković, M. (2017). Chemical, nutritive composition and wide-broad bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer, *Food & Function*, 8, 3239-3249.
- Kovács, D., Vetter, J. (2015). Chemical composition of the mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murill. *Acta Alimentaria*, 44 (1), 104–110.
- Krzyczkowski, W., Malinowska, E., Suchocki, P., Kleps, J., Olejnik, M., Herold, F. (2009). Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. *Food Chemistry*, 113 (1), 351–355.

- Kunjadia, P.D., Nagee, A., Pandya, P.Y., Mukhopadhyaya, P.N., Sanghvi, G.V, Dave, G.S. (2014). Medicinal and antimicrobial role of the oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher Basidiomycetes) cultivated on banana agrowastes in India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16 (3), 227–38.
- Landette, J.M. (2013) Dietary Intake of Natural Antioxidants: Vitamins and Polyphenols. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53,706–721.
- Lam, S.K., Ng, T.B. (2011). Lectins: Production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (1), 45–55.
- Lange, L. (2014). The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. *International Mycological Association Fungus*, 5 (2), 463–71.
- Landi, N., Pacifico, S., Ragucci, S., Madi, A., Ianuzzi, F., Zarelli, A., Piccolella, S., Di Maro, A. (2017). Pioppino mushroom in southern Italy: an undervalued source of nutrients and bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI: 10.1002/jsfa.8428.
- Lee, C.R., Cho, I.H., Jeong, B.C., Lee, S.H. (2013). Strategies to minimize Antibiotic Resistance. *International journal of Environmental research and public health*, 10 (9), 4274–4305.
- Chandrasekaran, G., Lee, Y.C., Park, H., Wu, Y., Shin, H.J. (2016). Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18 (4), 291–299.
- Léon, F., Quintana, J., Rivera, A., Estévez, F., Bermejo, J. (2004). Lanostanoid triterpenes from *Laetiporus sulphureus* and apoptosis induction on HL-60 human myeloid leukemia cells. *Journal of Natural Products*, 67 (12), 2008–2011.
- León-Guzmán, M.F., Silva, I., López, M.G., 1997. Proximate chemical, composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4329–4332.
- Liang, Y., Feng, L., Tong, X., Wang, K., Li, D. F., Lin, J. C., Sun, H. (2009). Importance of nuclear localization for the apoptosis-induced activity of a fungal galectin AAL (*Agrocybe aegerita* lectin). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386 (3), 437–442.

- Lindequist, U., Niedermeyer, T H.J., Jülich, W.D. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (3), 285–299.
- Liu, W., Yu, G., Yu, W., Ye, X., Jin, Y., Shrestha, A., Sun, H. (2016). Autophagy inhibits apoptosis induced by *Agrocybe aegerita* lectin in hepatocellular carcinoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17 (2), 221–229.
- Lo, K.M., Cheung, P.C.K. (2005). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*. *Food Chemistry*, 89 (4), 533–539.
- Lou, Z., Wang, H., Rao, S., Sun, J., Ma, C., Li, J. (2012). *p* – Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. *Food control*, 25 (2), 550-554.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 118-126.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2006). Brock biology of microorganisms, Carlson, G. (Eds.), Pearson Education LTD.
- Majtan, J. (2012). Pleuran (β -glucan from *Pleurotus ostreatus*): An effective nutritional supplement against upper respiratory tract infections? *Acute Topics in Sport Nutrition*, 59, 57-61.
- Mancheño, J.M., Tateno, H., Goldstein, I.J., Hermoso, J.A. (2004). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel haemolytic lectin from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60 (6), 1139–1141.
- Mancheño, J.M., Goldstein, I.J., Martínez-Ripoll, M., Hermoso, J.A. (2005). Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (17), 17251-17259.
- Manna, D., Pust, S., Torgersen, M.L., Cordara, G., Künzler, M., Krenzel, U., Cheresch, D. (2017). *Polyporus squamosus* Lectin 1a (PSL1a) Exhibits Cytotoxicity in Mammalian Cells by Disruption of Focal Adhesions, Inhibition of Protein Synthesis and Induction of Apoptosis. *Plos One*, 12 (1).
- Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A., Pizzoferrato, L. (2004). Commercial mushrooms: Nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry*, 84 (2), 201–206.
- Martins, A. (2017). The Numbers Behind Mushroom Diversity. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. and

- Barros, L. (Eds). Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications, Wiley Blackwell, pp. 15-63.
- Melville, S., Craig, L. (2013). Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77 (3), 323–341.
- Meng, X., Liang, H., Luo, L. (2016). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 424, 30–41.
- Meza-Menchaca, T., Suárez-Medellín, J., Del Ángel-Piña, C., Trigos, Á. (2015a). The Amoebicidal Effect of Ergosterol Peroxide Isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Phytotherapy Research*, 29 (12), 1982–1986.
- Mircea, C., Cioanca, O., Iancu, C., Tataringa, G., Hancianu, M. (2015). In vitro Antioxidant Activity of Some Extracts Obtained From *Agaricus bisporus* Brown, *Pleurotus ostreatus* and *Fomes fomentarius*. *Farmacia*, 63 (6), 927–933.
- Mishima, K., Tanaka, T., Pu, F., Egashira, N., Iwasaki, K., Hidaka, R. (2003). Vitamin E isoforms α -tocotrienol and δ -tocopherol prevent cerebral infarction in mice. *Neuroscience Letters*, 337, 56–60.
- Mizuno, M., Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 52 (3), 202-207.
- Mlinarič, A., Kac, J., Pohleven, F. (2005). Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Acta Pharmaceutica*, 55 (1), 69–79.
- Mo, H.Q., Winter, H.C., Goldstein, I.J. (2000). Purification and characterization of a Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (14), 10623–10629.
- Mocan, A., Fernandes, A., Barros, L., Crişan, G., Smiljković, M., Soković, M. Ferreira, I.C.F.R. (2017). Chemical composition and bioactive properties of the wild mushroom *Polyporus squamosus* (Huds.) Fr: a study with samples from Romania. *Food & Function*, 9, 160-170.
- Mohamed, E.M., Farghaly, F.A. (2014). Bioactive Compounds of Fresh and Dried *Pleurotus ostreatus* Mushroom. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3, 4–14.

- 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.
- Morris, H.J., Llauro, G., Beltrán, Y., Lebeque, Y., Bermúdez, R.C., García, N., Gaime-Perraud, I., Moukha, S. (2017). The Use of Mushrooms in the Development of Functional Foods, Drugs, and Nutraceuticals. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. and Barros, L. (Eds). *Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications*, Wiley Blackwell, 123-157.
- Mshandete, A., Cuff, J. (2007). Proximate and nutrient composition of three types of indigenous edible wild mushroom grown in Tanzania and their utilization prospects. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 7 (6), 1-16.
- Mujić, I., Zeković, Z., Lepojević, Z., Vidović, S., Živković, J. (2010). Antioksidativne osobine odabranih jestivih gljiva. *Journal of Central European Agriculture*, 11 (4), 387–391.
- Muntañola-Cvetković, M. (1987). Opšta mikologija. U: Blaženčić, J. i Nikolić, V. (Eds). *Niro Književne novine*, 241.
- Nagarajkumar, M., Jayaraj, J., Muthukrishnan, S., Bhaskaran, R., Velazhahan, R. (2005). Detoxification of oxalic acid by *Pseudomonas fluorescens* strain PfMDU2: Implications for the biological control of rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Microbiological Research*, 160,291-298.
- Neelam, S., Chennupati, S., Singh, S. (2013). Comparative studies on parameters and physio-chemical analysis of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus florida*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3 (1), 163–169.
- Nehra, K., Kumar, M., Yadav, A. (2012). Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *International Journal of Microbial Resource Technology*, 391–400.
- Nestler, G.N. (2002). Traditional Chinese Medicine. *Complementary and Alternative Medicine. Medical Clinics of North America*, 86 (1), 63-73.
- Ng, T.B. (2004). Peptides and proteins from Fungi. *Peptides*, 25 (6), 1055-1073.
- Ngai, P.H.K., Zhao, Z., Ng, T.B. (2005). Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom

- Agrocybe cylindracea*. Peptides, 26 (2), 191–196.
- Novaković, A.R., Karaman, M.A., Janjić, Lj.N., Ilić, N.M., Radusin, T.I., Mastilović, J.S. (2012). Antioxidant activity of the species *Agrocybe aegerita* in relation to total phenolic (flavonoid) content. In: Proceedings of 6th Central European Congress on Food - CEFood Congress (pp. 34–39).
- 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. LS - Food Science and Technology, 59 (2P1), 689–694.
- Olennikov, D.N., Agafonova, S.V., Nazarova, A.V., Borovskii, G.B., Penzina, T.A (2008). Organic Acids and Carbohydrates from *Laetiporus sulphureus* fruiting bodies. Chemistry of Natural Compounds, Brief communications, 44 (6), 762-763.
- Olennikov, D.N., Agafonova, S.V., Borovskii, G.B., Penzina, T.A., Rokhin, A.V. (2009a). Alkali-soluble polysaccharides of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr fruit bodies. Applied Biochemistry and Microbiology, 45 (6), 626–630.
- Olennikov, D.N., Agafonova, S.V., Borovskii, G.B., Penzina, T.A., Rokhin, A.V. (2009b). Water-Soluble Endopolysaccharides from the Fruiting Bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murr. Applied Biochemistry and Microbiology, 45 (5), 536-543.
- Orhan, I., Üstün, O. (2011). Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. Journal of Food Composition and Analysis, 24 (3), 386–390.
- Oyetayo, V.O., Ariyo, O.O. (2013). Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq:Fries) Cultivated on Different Tropical Woody Substrates. Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology, 1 (2), 28–32.
- Padda, M.S., Picha, D.H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. Journal of Food Science, 72 (7), 412-416.
- Paiva, P., Gomes, F., Napoleão, T. (2010). Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. U: Méndez – Vilas, A. (Eds). Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, FORMATEX, pp. 396–406.

- Pârvu, M., Adrian-Ștefan, A., Roșca-Casian, O. Antifungal activity of *Laetiporus sulphureus* mushroom extract, *Contrib. Bot.*, 2010, 45, 65.
- Patel, Y., Naraian, R., Singh, V.K. (2012a). Medicinal properties of *Pleurotus* species (Oyster Mushroom): a review. *World Journal of Fungal and Plant Biology*, 3 (1), 1–12.
- Patel, S., Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2 (1), 1–15.
- Pauliuc, D., Botău, D. (2013a). Antibacterial activity of *Pleurotus ostreatus* gemmotherapeutic extract. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17 (1), 242- 245.
- Pednault, K., Anger, P., Avis, T.J., Gosselin, A., Tweddel, R.J. (2007). Fatty acid profiles of polar and non-polar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. 'citrino-pileatus' grown at different temperatures. *Mycological Research*, 111 (10), 1228-1234.
- Petrović, J., Glamočlija, J., Stojković, D., Ćirić, A., Nikolić, M., Bukvički, D., Guerzoni, M.E., Soković, M. (2013). *Laetiporus sulphureus*, edible mushroom from Serbia: Investigation on volatile compounds, *in vitro* antimicrobial activity and *in situ* control of *Aspergillus flavus* in tomato paste, 59, 297-302.
- Petrović, J., Papandreou, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Baskakis, C., Proestos, C., Lamari, F., Zoumpoulakis, P., Soković, M. (2014). Different extraction methodologies and their influence on the bioactivity of the wild edible mushroom *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food & Function*, 5, 2948-2960.
- Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B. (2009). Organic Acids of Plants and Mushrooms: Are they Antioxidants? *Functional Plant Science and Biotechnology*, 3 (Special Issue 1), 103–113.
- Peterson J.W. (1996). Bacterial Pathogenesis. U: Baron, S. (Eds). *Medical Microbiology*, Chapter 7.
- Petrova, R.D. (2012). New scientific approaches to cancer treatment: Can medicinal mushrooms defeat the curse of the century? *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14 (1), 1–20.
- Phillips, R. (2006). *Mushrooms*, Frith-Macdonald, C.(Ed), Macmillan Publishers Limited.
- Philippoussis, A., Zervakis, G., Diamantopoulou, P. (2001). Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17

(2), 191–200.

- Pleszczyńska, M., Wiater, A., Siwulski, M., Szczodrak, J. (2013). Successful large-scale production of fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill on an artificial substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (4), 753–758.
- Popović, V., Živković, J., Davidović, S., Stevanović, M., Stojković, D. (2013). Mycotherapy of cancer: an update on cytotoxic and antitumor activities of mushrooms, bioactive principles and molecular mechanisms of their action. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13 (21), 2791–806.
- Radić, N., Injac, R., Štrukelj, B. (2009). Sulphur tuft culinary-medicinal mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill (Aphyllophoromycetidae): Bioactive compounds and pharmaceutical effects (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11 (2), 103–116.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2, 219–236.
- Ranadive, K.R., Belsare, M.H., Deokule, S.S., Jagtap, N.V, Jadhav, H.K., Vaidya, J.G. (2013). Glimpses of antimicrobial activity of fungi from World. *Journal on New Biological Reports*, 2 (2), 142–162.
- Rao, U.J.S.P., Ramasarma, P.R., Rao, D.R., Prasad, K.V.S. (1994). Detection of lectin activity on western blots using erythrocytes. *Electrophoresis*, 15 (1), 907–910.
- Rasmussen, T.B., Givskov, M. (2006). Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects. *Microbiology*, 152 (4), 895–904.
- Rathee, S., Rathee, D., Rathee, D., Kumar, V., Rathee, P. (2012). Mushrooms as therapeutic agents. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (2), 459–474.
- Ravi, B., Renitta, R.E., Prabha, M.L., Issac, R., Naidu, S. (2013). Evaluation of antidiabetic potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in alloxan-induced diabetic mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35 (1), 101–109.
- Reis, F.S., Pereira, E., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2011a). Biomolecule profiles in inedible wild mushrooms with antioxidant value. *Molecules*, 16 (6), 4328–4338.
- Reis, F., Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R.

- (2011b). Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from northeast Portugal. *Journal of Food Science*, 76 (6), 824-30.
- Reis, F.S., Martins, A., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R. (2012a). Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: A comparative study between *in vivo* and *in vitro* studies. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1201-1207.
- Reis, F.S., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2012b). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2), 191–197.
- Rezaeian, S., Saadatmand, S., Sattari, T.N., Mirshamsi, A. (2015). Antioxidant potency of iranian newly cultivated wild mushrooms of *Agaricus* and *Pleurotus* species. *Biomedical Research*, 26 (3), 534–542.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentão, P., Baptista, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2006). Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:8530–8537.
- Ribeiro, B., Guedes de Pinho, P., Andrade, P.B., Baptista, P., Valentão, P. (2009). Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: A comparative study. *Microchemical Journal*, 93 (1), 29–35.
- Ríos, J.L., Andújar, I., Recio, M.C., Giner, R.M. (2012). Lanostanoids from fungi: A group of potential anticancer compounds. *Journal of Natural Products*, 75 (11), 2016–2044.
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P. (2012). The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4 (4), 687–709.
- Rutherford, S.T., Bassler, B.L. (2012). Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2 (11) 1–26.
- Saba, E., Son, Y., Jeon, B.R., Kim, S.E., Lee, I.K., Yun, B.S., Rhee, M.H. (2015). Acetyl eburicoic acid from *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* suppresses inflammation in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Mycobiology*, 43 (2), 131–136.
- Sakuragi, Y., Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189 (14), 5383–5386.

- Sala Uddin, G.M., Hossain, S., Monirul Islam, M., Asaduzzaman, M., Bulbul, J., Amin, R. (2015). Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Property of *Pleurotus ostreatus* mushroom. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4(1), 29-33.
- Sambrook, J. Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. A2.2
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 (5), 1321–1337.
- Sánchez, C. (2017). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2 (1), 13–22.
- Sandy, S.M., Fong-Yee, T. (2012). Anti-quorum sensing and antimicrobial activities of some traditional Chinese medicinal plants commonly used in South-East Asia. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8:11-20.
- Santoyo, S., Ramírez-Anguiano, A.C., Aldars-García, L., Reglero, G., Soler-Rivas, C. (2012). Antiviral activities of *Boletus edulis*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes* extracts and polysaccharide fractions against *Herpes simplex* virus type 1. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51 (4), 225–235.
- Semaming, Y., Pannengpetch, P., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N. (2015). Pharmacological Properties of Protocatechuic Acid and Its Potential Roles as Complementary Medicine. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, doi: 10.1155/2015/593902.
- Serafini, M., Laranjinha, J. A. N., Almeida, L. M., Maiani, G. (2000). Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 585-590.
- Selegean, M., Putz, M. V., Rugea, T. (2009). Effect of the polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* against infectious bursal disease virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (8), 3616–3634.
- Shang, X., Muthu, M., Keum, Y.S., Chun, S., Gopa, J. (2016). An agile, simplified and sonication mediated one-pot aqueous extraction and antibacterial assessment of predominant Korean mushrooms. *RSC Advances*, 6, 12143–12157.

- Sharma, G., Rao, S., Bansal, A., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: Potential therapeutic targets. *Biologicals*, 42 (1), 1–7.
- Shi, S.H., Cai, Y.P., Cai, X.J., Zheng, X.Y., Cao, D.S., Ye, F.Q., Xiang, Z. (2014). A network pharmacology approach to understanding the mechanisms of action of traditional medicine: Bushenhuoxue formula for treatment of chronic kidney disease. *PLoS ONE*, 9 (3), e89123.
- Silva, M.C.C., Santana, L.A., Mentele, R., Ferreira, R.S., De Miranda, A., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L.V. (2012). Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry*, 47 (7), 1049–1059.
- Simpoulos, A.P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70 (3), 560–569.
- Sinanoglou, V.J., Zoumpoulakis, P., Heropoulos, G., Proestos, C., Ćirić, A., Petrović, J., Soković, M. (2015). Lipid and fatty acid profile of the edible fungus *Laetiporus sulphureus*. Antifungal and antibacterial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (6), 3264–3272.
- Singh, R.S., Bhari, R., Kaur, H.P. (2010). Mushroom lectins: Current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30 (2), 99–126.
- Singh, S.S., Wang, H., Chan, Y.S., Pan, W., Dan, X., Yin, C.M., Ng, T.B. (2015a). Lectins from edible mushrooms. *Molecules*, 20 (1), 446–469.
- Singh, V., Pandey, R., Vyas, D. (2015b). Antioxidant potentiality of *Pleurotus ostreatus* (MTCC142) cultivated on different agro wastes. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5 (6), 22-27.
- Smolskaite, L., Venskutonis, P.R., Talou, T. (2014). Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LS - Food Science and Technology*, 60 (1), 462–471.
- Sobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research*, 579, 200–213.
- Soković, M. (2001). Antifungalna aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih i lekovitih biljaka, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
- Soković, M., Ćirić, A., Glamočlija, J., Nikolić, M., Griensven, L.J.L.D. (2014). *Agaricus blazei* hot

- water extract shows anti quorum sensing activity in the nosocomial human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 19 (4), 4189-99.
- Soković, M., Ćirić, A., Glamočlija, J., Stojković, D. (2017). The Bioactive Properties of Mushrooms. U: Ferreira, I.C.F.R., Morales, P. and Barros, L. (Eds). *Wild Plants, Mushroom and Nuts. Functional Food Properties and Applications*, Wiley Blackwell, pp. 83-122.
- Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Petrović, J., Stojković, D. (2018). Mushroom as Sources of Therapeutic Foods. U: Holban, A.M. i Grumezescu, A.M. (Eds). *Therapeutic Foods. Handbook of Food Bioengineering*, Academic Press, pp. 141-170.
- Spoering, A.L., Lewis, K. (2001). Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183 (23), 6746-51.
- Stachowiak, B., Reguła, J. (2012). Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: A review. *European Food Research and Technology*, 234 (3), 369–380.
- Stajić, M., Vukojević, J., Knežević, A., Duletić Laušević, S., Milovanović, I. (2013). Antioxidant Protective Effects of Mushroom Metabolites. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 2660-2676.
- Stajić, M. (2015). Nutritivna svojstva i medicinski potencijal makromiceta, Stanković, S. (Eds). *Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu*.
- Stojković, D., Glamočlija, J., Ćirić, A., Nikolić, M., Ristić, M., Šiljegović, J., Soković, M.D. (2013). Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils. *Archives of Biological Sciences*, 65 (2), 639–644.
- Su, C.H., Laib, M.N., Ng, L.T. (2013). Inhibitory effects of medicinal mushrooms on α -amylase and α -glucosidase – enzymes related to hyperglycemia. *Food & Function*, 4, 644-649.
- Sullivan, R., Smith, J. E., Rowan, N. J. (2006). Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 49 (2), 159–170.
- Sulkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B., Motyl, P., Pasko, P., Ekiert, H. (2012). Phenolic compounds and Antioxidant Activity in some Species of Polyporoid Mushroom from Poland. *International*

- Journal of Medicinal Mushrooms, 14 (4): 385-393.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. Journal of Biochemical Technology, 76 (4), 548–556.
- Tang, J.L., Liu, B.Y., Ma, K.W. (2008). Traditional Chinese medicine. The Lancet, 372 (9654), 1938–1940.
- Tateno, H., Goldstein, I.J. (2003). Molecular Cloning, Expression, and Characterization of Novel Hemolytic Lectins from the Mushroom *Laetiporus sulphureus*, Which Show Homology to Bacterial Toxins. Journal of Biological Chemistry, 278 (42), 40455–40463.
- Toole, G.O., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm Formation As microbial Development. Annual Review of Microbiology, 54, 49–79.
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Shiga, M., Noguchi, K., Ishiyama, M., Ezoe, T., Matsumoto, K.(2012) Comparison of the WST–8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. Journal of Microbiological Methods, 90: 160–166.
- Turkoglu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, 101 (1), 267–273.
- Ullah, M.I., Akhtar, M., Iqbal, Z., Shahid, M., Awais, M.M. (2015). Immunomodulating and antiprotozoal effects of different extracts of the oyster culinary-medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Higher basidiomycetes) against coccidiosis in broiler. International Journal of Medicinal Mushrooms, 17 (3), 309–317.
- Upadhyaya, J. (2017). Analysis of Nutritional and Nutraceutical Properties of Wild-Grown Mushrooms of Nepal. EC Microbiology, 2 (3), 136-145.
- Uzun, Y., Genççelep, H., Tunçtürk, Y., Demirel, K. (2009). Determination of protein and nitrogen fractions of Wild Edible Mushrooms. Asian Journal of Chemistry, 21 (4), 2769–2776.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M. (2005a). Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:3626–3630

- Valentão, P., Andrade, P., Rangel, J., Ribeiro, B., Silva, B., Seabra, R. (2005b). Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in Chantanelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4925–4931.
- Valverde, M.E., Hernández-Pérez, T., Paredes-López, O. (2015). Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *International Journal of Microbiology*, doi.org/10.1155/2015/376387.
- Vamanu, E. (2012). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109. *Molecules*, 17, 3653–71.
- Vamanu, E. (2013). Studies on the antioxidant and antimicrobial activities of *P. ostreatus* PSI101109 mycelium. *Pakistanian Journal of Botany*, 45 (1), 311-317.
- Vamanu, E., Nita, S. (2013). Antioxidant capacity and the correlation with major phenolic compounds, anthocyanin, and tocopherol content in various extracts from the wild edible *Boletus edulis* mushroom. *BioMed Research International*, doi: 10.1155/2013/313905
- Vamanu, E. (2013). Antioxidant Properties and Chemical Compositions of Various Extracts of the Edible Commercial Mushroom, *Pleurotus ostreatus*, in Romanian Markets. *Revista De Chimie*, 64 (1), 49–54.
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R.C., Crous, P.W., Thomma, B.P.H.J. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: How do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS*, 31 (3), 239-277.
- Van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–27.
- Vannucci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F., Rajsiglova, L., Saieh, M. (2013). Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). *International Journal of Oncology*, 43 (2), 357-364.
- Varrot, A., Basheer, S. M., Imberty, A. (2013). Fungal lectins: Structure, function and potential applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (5), 678–685.
- Vasudewa, N.S., Abeytunga, D.T.U., Ratnasooriya, W.D. (2007). Antinociceptive activity of *Pleurotus*

- ostreatus*, an edible mushroom, in rats. *Pharmaceutical biology*, 45 (7), 533–540.
- Vaz, A.J., Heleno, S.A., Martins, A., Almeida, M.G., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: *In vitro* tumor cell lines. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2881-2884.
- Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M.H., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126 (2), 610–616.
- Vaz, J.A., Almeida, G.M., Ferreira, I.C.F.R., Martins, A., Vasconcelos, M.H. (2012). *Clitocybe alexandri* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in a lung cancer cell line: Identification of phenolic acids with cytotoxic potential. *Food Chemistry*, 132, 482-486.
- Huis in't Veld J.H.J., (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33 (1), 1–18.
- Voet, D., Voet, J.G. (2004). *Biochemistry*, 3rd edn. New York: Wiley and Sons.
- Vujičić, Z. (2002): Eksperimentalna biohemija, Praktikum. Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Wang, H.X., Ng, T.B. (2000). Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhibitory, and ribonuclease activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276 (2), 587–593.
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M. (2001). Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, 78 (3), 293–300.
- Wang, X.M., Zhang, J., Wu, L.H., Zhao, Y.L., Li, T., Li, J.Q., Liu, H.G. (2014). A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. *Food Chemistry*, 151, 279–285.
- Wang, J., Sun, W., Luo, H., He, H., Deng, W., Zou, K., Huang, W. (2015). Protective effect of eburicoic acid of the chicken of the woods mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Higher Basidiomycetes), against gastric ulcers in mice. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17 (7), 619–626.
- Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms : current perspectives (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31–62.

- Wasser, S. (2002). Review of Medicinal Mushrooms Advances: Good News from Old Allies. *Americal Botanical Council*, 56, 28–33.
- Wasser, S. (2003). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (3), 258–274.
- Wasser, S. (2011). Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (5), 1323–1332.
- Wasser, S. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*, 37 (6), 345–356.
- Weber, R.W.S., Mucci, A., Davoli, P. (2004). Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Polyporales, Fungi). *Tetrahedron Letters*, 45 (5), 1075–1078.
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilson, J.W., Schurr, M.J., LeBlanc, C.L., Ramamurthy, R., Buchanan, K.L., Nickerson, C.A. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgraduate Medical Journal*, 78, 216–224.
- Woldegiorgis, A.Z., Abate, D., Haki, G.D., Ziegler, G.R. (2014). Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chemistry*, 157, 30–36.
- Wong, J.H., Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Ye, X.J., Wang, H.X., Lam, S.K., Liu, F. (2010). Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (4), 1221–1235.
- Wright, T. (2004). Medicinal mushrooms. *Nutraceuticals World*, Ramsey, N.J. Roman publishing, p. 26–9.
- Xia, F., Fan, J., Zhu, M., Tong, H. (2011). Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42 (3), 402–407.
- Yang, N., Tong, X., Xiang, Y., Zhang, Y., Liang, Y., Sun, H., Wang, D.C. (2005). Molecular character of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Biochemistry*, 138 (2), 145–150.
- Yang, N., Li, D.F., Feng, L., Xiang, Y., Liu, W., Sun, H., Wang, D.C. (2009). Structural Basis for the

- Tumor Cell Apoptosis-Inducing Activity of an Antitumor Lectin from the Edible Mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Molecular Biology*, 387 (3), 694–705.
- Yoshikawa, K., Bando, S., Arihara, S., Matsumura, E., Katayama, S. (2001). A benzofuran glycoside and an acetylenic acid from the fungus *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49 (3), 327–329.
- Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Uysal, S., Ceylan, R., Anwar, F., Solak, M.H. (2015). A Comparative fatty acid compositional analysis of different wild species of mushrooms from Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27 (7), 532–536.
- Zhang, J.W., Wen, G.L., Zhang, L., Duan, D.M., Ren, Z.H. (2015). Sulphureuine B, a drimane type sesquiterpenoid isolated from *Laetiporus sulphureus* induces apoptosis in glioma cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 10 (4), 844–853.
- Zhao, C., Sun, H., Tong, X., Qi, Y. (2003). An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *The Biochemical Journal*, 374 (2), 321–327.
- Zhao, K., Li, Y., Yue, B., Wu, M. (2014). Genes as early responders regulate quorum-sensing and control bacterial cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 9 (7), 1–8.
- Zhu, W., Xie, D.Y. (2011). Antiviral activity of recombinant galectin AAL. *Chinese Journal of Biologicals*, 24 (7), 815–817.
- Zhu, H., He, C.C., Chu, Q.H. (2011). Inhibition of Quorum-Sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments from *Auricularia auricular*. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 269-274.
- Zjawiony, J.K. (2004). Biologically Active Compounds from Aphylllophorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67 (2), 300–310.
- Zhong, J.H.X. (2009). Secondary metabolites from higher fungi: Discovery, Bioactivity and Bioproduction. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 113, 79–150.

BIOGRAFIJA

Jovana D. Petrović je rođena 03.03.1985. godine u Zemunu. Osnovnu školu je završila u Novoj Pazovi, a gimnaziju društveno-jezičkog smera u Zemunu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003. godine, smer Biologija, a diplomirala je 22.04.2009. godine sa prosečnom ocenom 8,88. Doktorske studije je upisala 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Eksperimentalna mikologija. Od 01.06.2009. godine angažovana je na projektima: „Taksonomska, biohemijska i molekularna istraživanja gljiva i biološki aktivnih supstanci“ (ON 143041) i „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ (ON 173032). Od 01.06.2009. je zaposlena kao istraživač pripravnik u Mikološkoj laboratoriji, Odeljenja za fiziologiju biljaka, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, a od 12.07.2011. je nastavila angažovanje u istom odeljenju kao istraživač saradnik. Dosadašnji naučno-istraživački rad Jovane D. Petrović je iz oblasti mikologije i eksperimentalne botanike. Kao prvi autor/koautor je objavila 21 naučnih radova u časopisima od međunarodnog i nacionalnog značaja (11 u kategoriji M21, 2 u kategoriji M22, 7 u kategoriji M23, 1 u kategoriji M51), a učestvovala je i sa saopštenjima na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima (9 u kategoriji M34, 2 u kategoriji M64). Jovana Petrović je i koautor poglavlja u kategoriji M13. Ovo čini ukupno 33 bibliografske jedinice. Član je Mikološkog društva Srbije i Društva mikrobiologa Srbije.