

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Dunja K. Duvnjak

**AKUMULACIJA SELENA U
SUBMERZNO I INDUSTRIJSKI GAJENOJ
GLJIVI *CORIOLUS VERSICOLOR***

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Dunja K. Duvnjak

**SELENIUM ACUMULATION IN
SUBMERGED AND INDUSTRIAL
CULTIVATED *CORIOLUS VERSICOLOR*
MUSHROOM**

doctoral dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr Viktor Nedović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Ljubinko Jovanović, redovni profesor
Univerzitet Educons, Fakultet ekološke poljoprivrede

dr Milena Pantić, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Steva Lević, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

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

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Zahvaljujem se prof. dr Miomiru Nikšiću na ukazanoj podršci prilikom upisa na doktorske studije čime mi je omogućio ulazak u svet nauke, kao i na datim savetima i sugestijama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Veliko hvala prof. dr Viktoru Nedoviću na datim preporukama i pomoći koju mi je ukazao prilikom uključivanja na projekat III 46010 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru koga su urađeni eksperimenti prikazani u radu. Hvala na korisnim savetima i podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Ljubinku Jovanoviću na ukazanoj pomoći pri izvođenju dela eksperimenata prikazanih u ovom radu i na sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Posebno se zahvaljujem doc. dr Mileni Pantić na višegodišnjoj saradnji, na svim stručnim i prijateljskim savetima koje mi je dala a koji su mi umnogome pomogli pri proučavanju tematike prikazane u ovom radu. Takođe, zahvaljujem se na podršci i datim preporukama za konkurisanje za FEMS-ovu stipendiju.

Posebno se zahvaljujem doc. dr Stevi Leviću koji je bio uključen u veliki deo eksperimenata prikazanih u ovoj disertaciji na izuzetnoj saradnji, savetima i znanju koje je nesebično prenosio.

Prof. dr Aniti Klaus se zahvaljujem na savetima i sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr Jadwigi Turlo, šefu Katedre za sintezu lekova i biotehnologiju Medicinskog Univerziteta u Varšavi, svim kolegama sa Katedre, a posebno mr Piotreku Podsadnom, na velikoj pomoći tokom izrade dela eksperimenata prikazanih u ovoj disertaciji, na strpljenju i ukazanom poverenju tokom realizacije FEMS-ove stipendije i tromesečnog boravka u Varšavi.

Srdačno hvala laboratoriji Abiotech Univerziteta Educons i dipl.inž.teh.-master Milani Lazović na pomoći prilikom izvođenja ICP-OES analiza.

Hvala svim mojim prijateljima na podršci i razumevanju svih ovih godina što nisam uvek imala vremena za njih.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, na bezrezervnoj podršci, finansijskoj i emotivnoj, na razumevanju i pomoći kad god mi je bila potrebna.

Najveću zahvalnost dugujem svom vereniku Goranu, na ljubavi, strpljenju, motivaciji i velikoj podršci. Hvala, jer bez toga uloženi trud i rad ne bi bio toliko vredan.

AKUMULACIJA SELENA U SUBMERZNO I INDUSTRIJSKI GAJENOJ GLJIVI *CORIOLOUS VERSICOLOR*

SAŽETAK

Poslednjih godina postoji veliko interesovanje za razvoj novih nutraceutika i funkcionalne hrane na bazi gljiva. Gljive poseduju svojstvo da akumuliraju teške metale iz supstrata na kome rastu. U ovoj disertaciji ispitana je sposobnost rasta i akumulacije selena iz čvrstog supstrata i tečne podloge od strane *C. versicolor* medicinske gljive. Kao izvori selena upotrebljeni su neorganske soli, natrijum selenat i natrijum selenit i organski izvori u obliku selenskog kvasca (Sel-Plex®-a) i selenouree. Primenjene su koncentracije od 10 mg Se L⁻¹ i 25 mg Se L⁻¹ za gajenje u šaržnom bioreaktoru i 10 mg Se kg⁻¹, 25 mg Se kg⁻¹ i 50 mg Se kg⁻¹ računato na suhu masu supstrata za gajenje na čvrstoj podlozi.

Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da postoji srednja, negativna, statistički značajna korelacija ($p \leq 0.05$, $r = -0.54$), između sadržaja neorganskog selena i prinosa plodonosnih tela i veoma jaka, negativna, statistički značajna, ($p \leq 0.05$, $r = -0.89$) korelacija između sadržaja organskog selena u podlozi i prinosa plodonosnih tela. Koncentracija od 10 mg Se kg⁻¹ suvog supstrata nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticala na prinos gljive u poređenju sa kontrolnim uzorkom, bez obzira na izvor selena za obogaćenje supstrata. Međutim, dodatkom 50 mg Se kg⁻¹ suvog supstrata u obliku Sel-Plex®-a, fruktifikacija je potpuno izostala, a primenom iste koncentracije selena dodatkom selenouree su dobijena plodonosna tela izmenjene morfologije.

Optimalno vreme gajenja gljive od osam dana ustanovljeno je merenjem potrošnje glukoze (HPLC metodom) tokom rasta u tečnoj podlozi. Gljiva je rasla u obliku sferičnih peleta kada je tečna podloga obogaćena selenoureeom. Gljiva je formirala ugruške dispergovanih filamenata kada je tečnoj podlozi dodat Sel-Plex®, rast gljive je bio potpuno raspršen kada je upotrebljen natrijum selenit, a oba oblika rasta otežavaju separaciju dobijene biomase od podloge. Analiza skenirajućom elektronskom mikroskopijom nije potvrdila prisustvo egzopolisaharida na površini micelijuma. Znatno bolja akumulacija selena u

plodonosna tela gljive je utvrđena kada su primenjeni organski izvori selena. Nisu primećene statistički značajne razlike ($p \leq 0.05$) između sadržaja selena u plodonosnim telima gljive i vrste organskog izvora selena, poređenjem istih koncentracija dodatih u supstrat. Tako je pri dodatku organskih jedinjenja u koncentraciji selena od 25 mg kg^{-1} suve mase čvrstog supstrata, sadržaj selena u plodonosnim telima bio između 93.39 i $97.85 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ suve mase. Submerznim gajenjem gljive usvojene su znatno više koncentracije selena. Najefikasnije usvajanje selena je postignuto primenom natrijum selenita, ali je dobijen statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži prinos biomase. Dodatkom selenouree takođe je ostvarena visoka akumulacija selena (između 1028.65 i $2084.00 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ suve biomase, u zavisnosti od dodate koncentracije), a viša koncentracija (25 mg Se mL^{-1}) nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticala na prinos biomase.

Aminokiselinski sastav je određen HPLC metodom. Primećen je statistički značajan ($p \leq 0.05$) uticaj izvora selena dodatog u čvrsti supstrat za gajenje na ukupan aminokiselinski profil plodonosnih tela gljive. Odnos sadržaja esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina (EAA/NEAA) nije se statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao kod različitih uzoraka i zadovoljavao je FAO/WHO preporučenu referentnu vrednost od 0.6 (Ohtsuka et al., 1973). Primećen je negativan uticaj natrijum selenita na sadržaj aminokiselina, gde je EAA/NEAA odnos bio najniži i statistički značajno ($p \leq 0.05$) različit u poređenju sa svim ostalim uzorcima. Takođe, Sel-Plex® je veoma povoljno uticao na sadržaj aminokiselina, pa su tako uzorci micelijuma gajeni u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex®-a imali najviši odnos EAA/NEAA (0.71 - 0.79) i najviši procenat udela esencijalnih u ukupnim aminokiselinama (EAA/TAA (%)) između 41.36 i 44.16% . Dodatkom viših koncentracija selena u podlogu za gajenje sadržaj selenometionina u gljivi je rastao. Za uzorke rasle na čvrstom supstratu, najbolji stepen konverzije dodatog selena u selenometionin (83.68%) postignut kada je dodata selenourea u koncentraciji od 10 mg Se kg^{-1} . Utvrđeno je da sa povećanjem koncentracije selena dodatog u supstrat za gajenje, procenat selena usvojenog u obliku selenometionina u odnosu na ukupan usvojen selen opada. Kod uzoraka dobijenih submerznim gajenjem stepen konverzije je išao čak do 95% , kod gljive rasle u tečnoj podlozi kojoj je dodat Sel-Plex® (10 mg Se L^{-1}). Značajan procenat selena usvojenog u obliku

selenometionina u odnosu na ukupan selen (31.23 %) postignut je dodatkom selenouree (10 mg Se L⁻¹), a kao najnepovoljniji izvor selena se pokazao natrijum selenit. Gljiva gajena u tečnoj podlozi sadržala je i male količine Se-metil-seleno-L-cisteina.

Od dobijenih selenom obogaćenih plodonosnih tela i micelijuma pripremljeni su metanolni ekstrakti, izvršena je njihova hemijska karakterizacija a zatim i analiza njihovih antioksidativnih i antimikrobnih svojstava. FTIR spektroskopijom (Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom) je utvrđeno prisustvo veza karakterističnih za jedinjenja glikozidne strukture, uglavnom β -glukana. Takođe, primećeno je prisustvo proteina i kompleksa proteina sa polisaharidima. Kod svih selenom obogaćenih uzoraka detektovana je široka traka na oko 667 cm⁻¹ koja se najverovatnije javlja kao rezultat Se-O-C simetričnih vibracija istezanja. Utvrđen je različit stepen uticaja načina gajenja gljive i izvora selena na sadržaj selena, polisaharida, proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima. Utvrđene su razlike u monosaharidnom sastavu ekstrakata micelijuma i plodonosnih tela, što najverovatnije ukazuje na uticaj dodatka različitih jedinjenja selena na građu ćelijskog zida gljive.

Antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata je testirana u odnosu na osam Gram-pozitivnih i deset Gram-negativnih ATCC sojeva bakterija kao i dva ATCC soja kvasca mikrodilucionom metodom. Nijedan uzorak nije ispoljio antifungalno delovanje. Metanolni ekstrakti plodonosnih tela gljive obogaćene selenouream (SU 10 PT_{eks}) i Sel-Plex[®]-om (SP 25 PT_{eks}) ispoljili su letalni efekat na sve testirane Gram-negativne bakterije, osim na *Escherichia coli* H7:O157. Od svih testiranih uzoraka jedino su ekstrakti micelijuma gljive gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream (SU 10 sub_{eks} i SU 25 sub_{eks}) i natrijum selenitom (SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}) delovali smrtonosno na ovu bakteriju. Takođe, zapaženo je da je uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} delovao letalno na sve testirane bakterije uključujući i *Listeria* sojeve u koncentracijama od 5 do 40 mg mL⁻¹.

Selenom obogaćeni ekstrakti su pokazali poboljšana antioksidativna svojstva. Metanolni ekstrakt plodonosnih tela gljive obogaćene selenouream u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT_{eks}) vezivao je čak 99.42 % slobodnih DPPH radikala. Sličnu efikasnost su imali i ekstrakti micelijuma SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}

(96.00 %) i SU 10 sub_{eks} (95.3 %). Najbolju sposobnost heliranja jona gvožđa pokazao je uzorak SP 10 PT_{eks} (efektivna koncentracija pri kojoj je helirano 50 % jona gvožđa, EC₅₀=1.16 mg mL⁻¹), a u okviru ekstrakata micelijuma uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}, koji helirao oko 88.98 % jona. Ekstrakti plodonosnih tela su pokazali nešto nižu sposobnost redukcije (Fe³⁺) jona u odnosu na ekstrakte micelijuma. Zapažena je redukciona sposobnost ekstrakta SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}, koji je dostigao isti nivo pri najvišoj testiranoj koncentraciji kao i askorbinska i limunska kiselina. Ni jedan ekstrakt nije doveo do smanjenja lipidne peroksidacije za 50 % u testiranom opsegu koncentracija (0.1-10 mg mL⁻¹).

Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal gljive *C. versicolor* za usvajanje i biotransformaciju selena u selenometionin iz različitih izvora tokom rasta na čvrstom supstratu i u tečnoj podlozi. Obogaćenje gljive selenom je generalno poboljšao antibakterijska i antioksidativna svojstva analiziranih metanolnih ekstrakata. Sve to *C. versicolor* gljivu zajedno sa primenjenim izvorima selena i načinima gajenja kvalifikuje za potencijalanu proizvodnju suplemenata na bazi organskog selena.

Ključne reči: Gljive, *Coriolus versicolor*, Selen, Submerzno gajenje, Antimikrobna aktivnost, Antioksidativna aktivnost, Selenometionin, Metilselenocistein, Aminokiselinski sastav.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK: 561.284:543.632.462(043.3)

SELENIUM ACUMULATION IN SUBMERGED AND INDUSTRIAL CULTIVATED *CORIOLUS VERSICOLOR* MUSHROOM

ABSTRACT

In recent years there has been great interest for the development of new nutraceuticals and functional foods based on mushrooms. Mushrooms are able to accumulate heavy metals from the growing substrate. In this dissertation, the ability of growth and accumulation of selenium from the solid substrate and liquid medium by *C. versicolor* medicinal mushrooms was analysed. As selenium sources inorganic salts such as sodium selenate and sodium selenite and organic sources in the form of selenium yeast Sel-Plex® and selenourea were used. Concentration that were applied were 10 mg Se L⁻¹ and 25 mg Se L⁻¹ for the cultivation in a batch bioreactor, and 10 mg Se kg⁻¹, 25 mg Se kg⁻¹ and 50 mg Se kg⁻¹ based on the dry weight of the solid substrate for solid state cultivation.

According to obtained results, there is a negative, medium and statistically significant correlation, ($p \leq 0.05$, $r = -0.54$) between the content of inorganic selenium and fruit body yield, and very strong, negative and statistically significant ($p \leq 0.05$, $r = -0.89$) correlation between the content of organic selenium in the growing substrate and biomass yield of the fruit body. Selenium concentration of 10 mg Se kg⁻¹ of dry substrate did not statistically significantly ($p \leq 0.05$) affected mushroom yield compared to the control sample, regardless of the selenium source used for enrichment. However, after addition of 50 mg Se kg⁻¹ in form of Sel-Plex®, there was no fructification at all, while the addition of the same selenium concentration using selenourea obtained fruiting bodies had altered morphology.

The optimal eight day period for the submerged mushroom cultivation was established by measuring the glucose consumption (HPLC method) during mushroom growing in liquid culture. Mushrooms growing in a liquid medium enriched with selenourea formed spherical pellets. Mushroom formed clumps of dispersed filaments when Sel-Plex® was added to the liquid medium, growth was fully dispersed when sodium selenite was used, and both forms impeded separation of the biomass from the liquid medium. Analysis by scanning electron

microscopy did not confirm the presence of exopolysaccharides on the mycelium surface. When organic selenium sources were used, much better accumulation of selenium in mushroom fruiting bodies was found. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were not observed between the selenium content in fruiting bodies and type of organic selenium source, by comparing the same concentrations added to the substrate. Thus, supplementation with organic compounds at the selenium concentration of 25 mg kg^{-1} of dry weight, content of selenium in fruiting bodies was between 93.39 and 97.85 mg g^{-1} dry weight. Significantly higher concentrations of selenium were adopted by submerged mushroom cultivation. The greatest efficiency was achieved when sodium selenite was applied, but biomass yield was statistically significantly ($p \leq 0.05$) lower. High selenium accumulation degree was also achieved, by applying of selenourea very (between 1028.65 and $2084.00 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ of dry biomass, depending on the added concentration), and higher concentration (25 mg Se mL^{-1}) did not statistically significantly ($p \leq 0.05$) affect the biomass yield.

The amino acid composition was determined by HPLC method. The statistically significant ($p \leq 0.05$) effect of the form of selenium added to the solid substrate on the total amino acid profile of mushroom fruiting bodies was found. The essential and non-essential amino acid content ratio (EAA/NEAA) was not statistically significant ($p \leq 0.05$) different between different samples, and its value was in the range of 0.6 recommended by FAO/WHO (Ohtsuka et al., 1973). Negative effect of sodium selenite on amino acid content was observed *i.e.* EAA/NEAA ratio was the lowest, statistically significantly ($p \leq 0.05$) different, compared to all other samples. Also, Sel-Plex[®] had a positive effect on amino acid content, thus, mycelium samples obtained from the liquid culture with addition of Sel-Plex[®] had the highest EAA/NEAA ratio (0.71 - 0.79) as well as the highest percentage of essential in total of essential amino acids (EAA/TAA (%)) between 41.36 and 44.16% . The selenomethionine content in mushroom fruiting bodies increased with selenium content increasing in the solid state substrate. For samples grown on a solid state substrate, the best conversion rate of added selenium into selenomethionine (83.68%), was achieved when selenourea was added at the concentration of 10 mg Se kg^{-1} . It was found that by increasing the

concentration of the selenium in the cultivation medium, the percentage of selenium incorporated in the form of selenomethionine, regarding the total selenium, decreased. For samples obtained by submerged cultivation, that percentage went up to 95 %, when mushrooms was growing in a liquid medium enriched with Sel-Plex® (10 mg Se L⁻¹). A significant percentage of the total selenium incorporated as selenomethionine (31.23 %), was achieved with the addition of selenourea (10 mg Se L⁻¹), while the most unfavorable source of selenium was proved to be sodium selenite. Mushroom cultivated in the liquid medium contained small amounts of Se-methyl-seleno-L-cysteine.

Methanol extracts were prepared from obtained selenium enriched mushroom fruiting bodies and mycelia, followed by the chemical characterization, and their antioxidant and antimicrobial properties were examined. FTIR spectroscopy showed the presence of the bonds characteristic for the presence of the glycoside structures, mainly β -glucans. Also, the presence of proteins and protein-polysaccharide complexes was noticed. In all the selenium-enriched samples the wide band at around 667 cm⁻¹ were detected, as the, most probably result of Se-O-C symmetrical stretching vibrations. Different level and form of impact of applied mushroom cultivation technique and selenium source used for supplementation on the selenium content, polysaccharides, proteins, lipids, and phenolic compounds content in methanol extract was observed. The differences in monosaccharide composition of mycelium and fruiting bodies extracts were determined which most probably indicates the impact of the various selenium compounds used for supplementation on the mushroom cell wall structure.

Antimicrobial activity of methanol extracts was tested against eight Gram-positive and ten Gram-negative bacteria ATCC bacterial strains, as well as two ATCC yeast strains, using broth microdilution method. No one sample showed antifungal activity. Methanol extracts from mushroom fruiting bodies enriched with selenourea (SU 10 PT_{eks}) and Sel-Plex® (SP 25 PT_{eks}) had lethal effect on all tested Gram-negative bacteria except *Escherichia coli* H7:O157. Among all analyzed samples, only extracts of mycelia obtained from liquid enriched with selenourea (SU 10 sub_{eks} and SU 25 sub_{eks}) and sodium selenite (SeO₃²⁻ sub_{eks} 10) acted lethal on this bacteria. Also, the lethal effect against all tested bacteria including *Listeria*

strains was determined for sample SeO_3^{2-} sub_{eks} 10 in the concentration range from 5 to 40 mg mL⁻¹.

Selenium enriched extracts showed improved antioxidative activities. The methanol extract of mushroom fruit body enriched with concentration of selenourea of 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT_{eks}) reduced the percentage of DPPH free radicals of up to 99.42 %. Similar efficacy exhibited mycelia extracts SeO_3^{2-} sub_{eks} 10 (96.00 %) and SU sub_{eks} 10 (95.3 %). The best chelating ferrous ion effect showed sample SP 10 PT_{eks} (the effective concentration at which the ferrous ions were chelated by 50 %, EC₅₀ = 1.16 mg mL⁻¹), and within the mycelium extracts sample SeO_3^{2-} sub_{eks} 10, which chelated around 88.98 % of ions. Fruiting bodies extracts had slightly lower capacity of reduction (Fe³⁺) ions compared to mycelium extracts. The reducing power of the SeO_3^{2-} sub_{eks} 10 was observed, which reached the same level of reducing capacity at the highest tested concentration, and equal to ascorbic and citric acid. None of the tested extracts had the capability to reduce lipid peroxidation for 50 % in tested concentration range (0.1-10 mg mL⁻¹).

The obtained results suggest the great potential of *C. versicolor* mushroom for uptake and biotransformation of selenium to selenomethionine from different sources during growth on a solid substrate and in liquid medium. Enrichment of mushroom with selenium generally improve the antibacterial and antioxidant properties of tested methanol extracts. Together with applied selenium sources and cultivation methods, *C. versicolor* mushroom is good candidate for a potential production of supplements based on organic selenium.

Keywords: Mushrooms, *Coriolus versicolor*, Selenium, Submerged cultivation, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Selenomethionine, Methylselenocysteine, Amino acid composition.

Scientific field: Biotechnological Sciences

Scientific subfield: Food and Industrial Microbiology

UDC number: 561.284:543.632.462(043.3)

SKRAĆENICE:

AAS: Atomska apsorpciona spektrofotometrija

ALA: Alanin

ARG: Arginin

ASP: Asparaginska kiselina

BSA: Bovine serum albumine, Albumin iz goveđeg seruma

Cov-1: Soj gljive *Coriolus versicolor*

CM-101: Soj gljive *Coriolus versicolor*

DMSO: Dimetil sulfoksid

DPPH: 2,2-difenil-1 pikrilhidrazil

DRI: Dietary Reference Intake

DIO1: Jodtironin dejodinaza, tip 1

DIO2: Jodtironin dejodinaza, tip 2

FDA: Food and Drug Administration. Administracija za Hranu i Lekove

FeCl₃: Gvožđe III hlorid

EC: European Commission; Evropska komisija

EPS: Ekstracelularni polisaharidi

ER: Endoplazmatični retikulum

GAE: Ekvivalent galne kiseline

GLU: Glutaminska kiselina

GLY: Glicin

GOPOD: glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin

GPx: Glutation peroksidaza

HIS: Histidin

HPLC: High performance liquid chromatography; Tečna hromatografija visokih performansi

HSD: Honesty significant defference test

H₂SeO₃: Selenasta kiselina

H₂SeO₄: Selenova kiselina

ICP-OES: Optička emisiona spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom

ICP-MS: Masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom

KH₂PO₄: Kalijum dihidrogen fosfat

LDL: Low density lipoprotein, Lipoproteini niske gustine

LD₅₀: Lethal Dose, Smrtonosna Doza

LSD: Least significant difference, Najmanja značajna razlika

MBC: Minimalna baktericidna koncentracija

MeSeCys: Metil-selenocistein, (selenometil-seleno-L-cistein)

MET: Metionin

MgSO₄·7H₂O: Magnezijum sulfat heptahidrat

MIC: Minimalna inhibitorna koncentracija

Na₂CO₃: Natrijum karbonat

Na₂SeO₃: Natrijum selenit

OPA: *o*-ftalaldehid

PMP: 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on

PSK: Polisaharid krestin

PSP: Polisaharid peptid

PT: Plodonosno telo

ROS: Reactive oxygen spaces, Reaktivne kiseonikove vrste

SCF: Scientific Committee on Food, Naučni odbor za hranu

SeCys: Selenocistein

SeMet: Selenometionin

SePP: Selenoprotein P

SER: Serin

SeIM: Selenoprotein M

SeIN: Selenoprotein N

SeIR: Selenoprotein R

SeIS: Selenoprotein S

SeIW: Selenoprotein W

SEM: Skenirajuća elektronska mikroskopija

MeSeCys: Seleno-metil-seleno-L-cistein

SeMet: Selenometionin

SM: Suva masa

SmF: Submerzni postupak gajenja gljiva

SSF: Solid state fermentacija, gajenje gljiva na čvrstom supstratu

Sub: Submerzno odgajena gljiva

TCA: Trihlorsirćetna kiselina

TFA: Trifluoro sirćetna kiselina

THR: Treonin

TRxR: Tireodoksin reduktaza

TTC: 2,3,5-trifenil-tetrazolijum hlorid

TYR: Tirozin

T3: Trijod tironin

T4: Tiroksin

USEPA: United States Enviromental Protection Agency

WHO: World Health Organization, Svetska zdravstvena organizacija

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1	Više gljive-pečurke	3
2.1.1	Biološka aktivnost medicinskih gljiva.....	5
2.1.2	Medicinska gljiva <i>Coriolus versicolor</i>	7
2.1.3	Submerzno gajenje gljiva	9
2.1.3.1	Morfologija peleta	11
2.1.4	Gajenje gljiva na čvrstom supstratu.....	13
2.2	Selen	13
2.2.1	Fizičko hemijska svojstva selena	13
2.2.2	Selen u zemljištu i vodama	14
2.2.3	Hemijski element selen: između toksičnosti i esencijalnosti.....	16
2.2.4	Selen u namirnicama biljnog i životinjskog porekla.....	17
2.2.5	Gljive kao izvor selena.....	19
2.2.6	Značaj selena u očuvanju zdravlja ljudi.....	21
2.2.7	Biološka uloga selena	22
2.2.7.1	Selen zavisni enzimi	22
2.2.7.2	Selenoprotein P.....	25
2.2.7.3	Selenoprotein W.....	25
2.2.7.4	Ostali selenoproteini.....	25
2.2.8	Uticaj selena na zdravlje.....	26
2.2.8.1	Selen i kardiovaskularne bolesti	26
2.2.8.2	Selen i imunološki sistem.....	27
2.2.8.3	Selen i dijabetes	28
2.2.8.4	Selen i reproduktivna funkcija	28
2.2.8.5	Selen i autoimune bolesti štitne žlezde	29
2.2.8.6	Selen i neurološke bolesti	29
2.2.8.7	Selen u prevenciji kancera.....	30

2.2.9	Suplementi na bazi selena	30
2.2.9.1	Neorganske soli selena.....	34
2.2.9.2	Selenourea	34
2.2.9.3	Selenski kvasac.....	35
3.	CILJEVI.....	37
4.	MATERIJAL I METODE.....	40
4.1	Gajenje gljive <i>Coriolus versicolor</i>	40
4.1.1	Jedinjenja upotrebljena za obogaćenje supstrata za gajenje gljive.....	40
4.1.2	Gajenje gljive <i>C. versicolor</i> na čvrstoj podlozi.....	40
4.1.3	Submerzno gajenje gljive <i>C. versicolor</i>	41
4.1.3.1	Priprema inokuluma	41
4.1.3.2	Šaržna fermentacija u bioreктору.....	42
4.1.4	Određivanje prinosa biomase i promene pH tokom submerznog gajenja gljive <i>C. versicolor</i>	43
4.1.5	Kvantitativno određivanje potrošnje glukoze HPLC metodom	43
4.1.6	Mikroskopska analiza micelije gljive <i>C. versicolor</i>	44
4.1.7	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) micelije gljive <i>C. versicolor</i>	44
4.2	Priprema metanolnih ekstrakata gljive <i>Coriolus versicolor</i>	44
4.3	Kvantitativna i kvalitativna analiza plodonosnih tela i micelijuma gljive <i>Coriolus versicolor</i>	45
4.3.1	Određivanje sadržaja selena u dobijenim uzorcima	45
4.3.2	Analiza aminokiselinskog sastava dobijenih uzoraka micelije i plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i>	45
4.3.2.1	Određivanje ukupnog aminokiselinskog sastava i sadržaja L-selenometionina u uzorcima plodonosnih tela i micelijuma gljive <i>C. versicolor</i>	45
4.3.2.2	Određivanje sadržaja Se-metil-seleno-L-cisteina u uzorcima micelijuma submerzno gajene gljive <i>C. versicolor</i>	47
4.4	Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma gljive <i>Coriolus versicolor</i>	48
4.4.1	FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	48

4.4.2	Kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	48
4.4.2.1	Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida u metanolnim ekstraktima gljive <i>C. versicolor</i>	48
4.4.2.2	Određivanje sadržaja ukupnih, α - i β -glukana u metanolnim ekstraktima gljive <i>C. versicolor</i>	49
4.4.2.3	HPLC analiza monosaharidnog sastava metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	50
4.4.2.4	Određivanje sadržaja ukupnih proteina u metanolnim ekstraktima gljive <i>C. versicolor</i>	52
4.4.2.5	Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima gljive <i>C. versicolor</i>	52
4.4.2.6	Određivanje sadržaja ukupnih lipida u metanolnim ekstraktima gljive <i>C. versicolor</i>	53
4.5	Određivanje biološke aktivnosti dobijenih metanolnih ekstrakata gljive <i>Coriolus versicolor</i>	53
4.5.1	Određivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	53
4.5.1.1	Ispitivani sojevi bakterija i priprema kulture.....	53
4.5.1.2	Određivanja antimikrobnog delovanja ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> mikrodilucionom metodom.....	54
4.5.2	Određivanja antimikrobnog delovanja ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> merenjem optičke gustine (<i>Optical Density</i>)-kinetika rasta.....	55
4.5.3	Određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	56
4.5.3.1	Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih DPPH radikala ...	56
4.5.3.2	Određivanje sposobnosti heliranja Fe^{2+} jona.....	57
4.5.3.3	Određivanje sposobnosti redukcije Fe^{3+} jona.....	57
4.5.3.4	Određivanje antioksidativne aktivnosti u model sistemu linoleinske kiseline.....	58
4.6	Statistička analiza.....	59
5.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	60
5.1	Sposobnost akumulacije selena iz različitih izvora od strane gljive <i>Coriolus versicolor</i>	60

5.1.1	Uticaj neorganskih soli i organskih jedinjenja na usvajanje selena i prinos plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i>	61
5.2	Submeržno gajenje gljive <i>Coriolus versicolor</i>	64
5.2.1	HPLC analiza potrošnje glukoze, određivanje promene pH vrednosti i prinosa biomase tokom submerznog gajenja gljive <i>C. versicolor</i>	64
5.2.2	Svetlosna mikroskopija micelije gljive <i>C. versicolor</i> dobijene submerznim gajenjem.....	66
5.2.3	Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) micelije gljive <i>C. versicolor</i> dobijene submerznim gajenjem.....	69
5.2.4	Uticaj neorganskih soli i organskih izvora selena na usvajanje selena i prinos biomase micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> dobijene submerznim gajenjem.....	72
5.3	Određivanje aminokiselinskog sastava gljive <i>Coriolus versicolor</i> obogaćene selenom.....	77
5.3.1	Aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena ...	79
5.3.1.1	Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	79
5.3.1.2	Sadržaj L-selenometionina plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	81
5.3.2	Aminokiselinski sastav micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	83
5.3.2.1	Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	83
5.3.2.2	Sadržaj L-selenometionina u micelijumu submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	87
5.3.2.3	Sadržaj selenometil-seleno-L-cisteina u micelijumu submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	89
5.4	Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata gljive <i>Coriolus versicolor</i>	91
5.4.1	FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	91

5.4.1.1	FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	92
5.4.1.2	FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	95
5.4.1.3	Kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	99
5.4.1.3.1	Određivanje prinosa i ukupnog sadržaja selena u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> dobijenih gajenjem na čvrstom supstratu.....	100
5.4.1.3.2	Određivanje prinosa i ukupnog sadržaja selena u metanolnim ekstraktima micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> dobijenog submerznim gajenjem.....	101
5.4.2	Hemijska karakterizacija polisaharidnih komponenti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> raslih na supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	103
5.4.2.1	Sadržaj ukupnih polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i>	104
5.4.2.2	Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim izvorima selena.....	106
5.4.3	Ukupan sadržaj proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	107
5.4.4	Hemijska karakterizacija polisaharidnih komponenti metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i>	109
5.4.4.1	Sadržaj ukupnih polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i>	109
5.4.4.2	Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim izvorima selena.....	111
5.4.5	Određivanje ukupnog sadržaja proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima micelijuma submeržno gajene gljive <i>C. versicolor</i> u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	113
5.5	Određivanje biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive <i>Coriolus versicolor</i>	115

5.5.1	Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu i u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena	115
5.5.1.1	Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena	116
5.5.1.2	Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	120
5.5.1.3	Antibakterijski potencijal metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> određen merenjem optičke gustine (<i>Optical Density</i>)-kinetika rasta.....	128
5.5.2	Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu i u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena	131
5.5.2.1	Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih DPPH radikala	132
5.5.2.1.1	Sposobnost vezivanja slobodnih DPPH radikala metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	132
5.5.2.1.2	Sposobnost vezivanja slobodnih DPPH radikala metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	136
5.5.2.2	Određivanje sposobnosti heliranja Fe ²⁺ jona	139
5.5.2.2.1	Sposobnost heliranja Fe ²⁺ jona metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	139
5.5.2.2.2	Sposobnost heliranja Fe ²⁺ jona metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena	141
5.5.2.2.3	Sposobnost redukcije Fe ³⁺ jona metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	144
5.5.2.3	Sposobnost redukcije Fe ³⁺ jona ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	146
5.5.2.4	Određivanje antioksidativne aktivnosti u model sistemu linoleinske kiseline.....	148

5.5.2.4.1	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive <i>C. versicolor</i> rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.....	148
5.5.2.4.2	Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.....	149
6.	ZAKLJUČCI.....	152
7.	LITERATURA.....	166
8.	PRILOG	199
8.1	Prilog A. Hromatogrami ukupnih aminokiselina plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive <i>C. versicolor</i>	199
8.2	Prilog B. Hromatogrami L-selenometionina, L-metionina i Se-metil-seleno-L-cisteina micelijuma selenom obogaćene gljive <i>C. versicolor</i>	205
8.3	Prilog C. FTIR spektri metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive <i>C. versicolor</i>	213
8.4	Prilog D. Hromatogrami monosaharida metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i>	217

1. UVOD

Do današnjeg dana identifikovan je veliki broj gljiva iz prirode, a mnoge od njih poseduju različita medicinska svojstva. Medicinske gljive se vekovima koriste za lečenje i prevenciju mnogih bolesti. Njihovo terapijsko dejstvo potiče od prisustva visokog sadržaja bioaktivnih komponenata kao što su polisaharidi, β -glukani, kompleksi polisaharida i proteina kao i sekundarnih metabolita (terpena, polifenola, seskviterpena alkaloida, laktona, vitamina). Današnja moderna medicina priznaje potencijal medicinskih gljiva za lečenje i prevenciju raznih bolesti, pa tako postoje primeri upotrebe raznih komercijalnih preparata gljiva u kliničkoj praksi. Jedna od gljiva koja spada u grupu medicinskih, sa već potvrđenim lekovitim svojstvima je i gljiva *Coriolus versicolor*. Ova gljiva sadrži biološki aktivne polisaharide i proteine za koje je pokazano da zaustavljaju rast tumorskih ćelija i podstiču imuni odgovor.

Moderan način života, često dovodi do raznih poremećaja u ishrani i nedovoljnog unošenja svih potrebnih mikroelemenata od kojih zavisi pravilan razvoj i funkcionisanje čovekovog organizma. Jedan od esencijalnih mikroelemenata čiji unos često nije dovoljan je selen. Većina prehrambenih proizvoda ne sadrži dovoljnu količinu ovog elementa, budući da sadržaj selena u hrani prevashodno zavisi od njegovog sadržaja u zemljištu na kome se ta hrana i proizvodi. S obzirom da je sadržaj selena u hrani uglavnom nizak, uobičajena ishrana ne može da zadovolji potrebe organizma za ovim esencijalnim mikroelementom. Ishrana deficitarna selenom dovodi do opšteg pada imuniteta i pojave velikog broja bolesti kao što su na primer obstruktivna kardiomiopatija, kancer, poremećaji rada štitne žlezde itd. Kao jedno od potencijalnih rešenja za ovaj problem je korišćenje dodatka ishrani tj. dijetetskih suplemenata na bazi selena.

Gljive obogaćene selenom mogu biti potencijalan izvor selena, budući da imaju sposobnost usvajanja mikroelemenata iz supstrata na kome rastu. Selen u gljivama može biti prisutan kao selenocistein (SeCys), selenometionin (SeMet), S-metil-selenocistein (MeSeCys) i selenit. Smatra se da se izvori organskih oblika

selena bolje usvajaju u organizmu, i da ispoljavaju manju toksičnost u poređenju sa izvorima neorganskih oblika selena. Visok sadržaj proteina u gljivama, omogućava visok potencijal biotransformacije selena iz podloge u organski oblik.

U ovoj disertaciji, izabrana je medicinska gljiva *C. versicolor* kao potencijalni izvor selena i biološki aktivnih komponenata od interesa za prehrambenu industriju i ishranu ljudi. Činjenica da ova gljiva može da raste kako na čvrstom supstratu, ali i u tečnoj podlozi (submerzno) je iskorišćena za ispitivanje njene sposobnosti da usvoji selen iz podloge tokom gajenja na ova dva, potpuno različita načina. Ovakvoj postavci eksperimenata ide u prilog i činjenica da na tržištu postoje komercijalni preparati gljive *C. versicolor*, na bazi polisaharida i kompleksa polisaharida i peptida dobijenih iz micelijuma gljive gajene submerznim postupkom. Submerzni postupak gajenja gljiva generalno omogućava dobijanje biomase za znatno kraće vreme u odnosu na proces gajenja gljiva na čvrstom supstratu.

Takođe, poznato je da su gljive dobar izvor antioksidativnih jedinjenja i komponenata koje ispoljavaju znatnu antimikrobnu sposobnost. Antimikrobni i antioksidativni potencijal metanolnih ekstrakata selenom obogaćenih plodonosnih tela i biomase micelijuma gljive *C. versicolor* je veoma značajan. Do sada su sprovedena brojna istraživanja uticaja ekstrakata različitih gljiva na velikom broju Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Njihov zajednički cilj je pronalaženje jedinjenja koja poseduju antimikrobna svojstva, kao odgovor na sve češću pojavu antibiotski rezistentnih sojeva bakterija. Otuda je bilo interesantno utvrditi kako dodatak selena u medijum za gajenje, odnosno kako akumulacija selena u plodonosna tela i micelijum gljive utiču na antimikrobna svojstva testiranih ekstrakata.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Više gljive-pečurke

Gljive su eukariotski mikroorganizmi koji pripadaju carstvu *Fungi* i čine odvojenu filogenetsku liniju od biljnog i životinjskog sveta (Đurovka i sar., 2001). Procenjuje se da na zemlji raste oko 140 000 različitih vrsta gljiva od čega je možda tek oko 14 000 (10 %) imenovano. Od oko 14 000 poznatih vrsta, oko 50 % su jestive, a oko 700 vrsta poseduje značajne farmakološke karakteristike (Wasser, 2002). I pored ovako velikog broja vrsta gljiva, u ishrani ljudi se koristi manje od 25 vrsta, a još manji broj je stekao komercijalni status (Tang et al., 2007).

Gljive ne poseduju fotosintetske pigmente, pa zbog toga spadaju u heterotrofne mikroorganizme. Za razliku od životinja koje se hrane ingestijom, gljive obezbeđuju potrebne nutrijente ekstraćelijskim varenjem, pomoću enzima koje luče, a zatim apsorbuju razložene hranljive materije (Dix i Webster, 1995). Osvajanje novih staništa olakšano je produkcijom velikog broja spora. Kada spora padne na hranljivu podlogu, dolazi do klijanja i formiranja sistema razgranatih cevastih ćelija-hifa koje potpuno obavijaju hranljivu materiju, čime se postiže najveća moguća efikasnost u iskorišćenju hranljivih materija. Splet hifa čini micelijum odnosno vegetativno telo gljive. Hife su uglavnom uniformne građe kod različitih taksonomskih grupa gljiva (Webster i Weber, 2007). U zavisnosti od vrste, dužina pojedinačnih ćelija hifa se kreće od 1 do 15 mm (Waites et al., 2001). Jedna od retkih odlika po kojim se micelije gljiva razlikuju je prisustvo odnosno odsustvo poprečnih pregrada, odnosno septi (Webster i Weber, 2007).

Prema građi hife, kao osnovne jedinice, gljive se dele na:

1. Niže gljive – *Syphomycota* - hife im nisu septirane
2. Više gljive – *Septomycota* - hife su im septirane (Stojanović i Nikšić, 2003).

Hife septiranih gljiva su podeljene na ćelije pomoću poprečnih zidova koje se zovu septe, koje imaju otvore, odnosno pore koje omogućuju strujanje protoplazme i protok organela i drugog ćelijskog materijala od jedne do druge ćelije. S obzirom da su gljive eukariotski organizmi od organela imaju jedro,

mitohondrije, ribosome i vezikule. Takođe, sadrže i vakuole koje im služe za skladištenje rezervnih hranljivih materija, uglavnom glikogena, lipida i polimera metafosfata. Ćelijski zid gljiva je uglavnom sastavljen od polisaharida (80-90 %), a sadrži i nešto lipidnih i proteinskih konstituenata. Sa izuzetkom nekih nižih gljiva, polisaharidi u ćelijskom zidu su mikrofibrili hitina, linearnih lanaca *N*-acetilglukozamina povezanih β -(1,4) glikozidnim vezama (Waites et al., 2001). Njih sintetiše ćelijska membrana uz pomoć enzima hitin sinteze i izlučuje u prostor rastućeg ćelijskog zida. Ćelijski zid postaje čvrst nakon što se vlakna hitina fiksiraju umrežavanjem razgranatih polimera glukana koje takođe sintetiše ćelijska membrana, posebno onih povezanih β -(1,3) i β -(1,6) vezama. Hitin čini od 1 % (kvasci) do 15 % (filamentozne gljive) mase ćelijskog zida (Webster i Weber, 2007; Free, 2013).

Gljive mogu stvarati različite vrste spora za seksualno razmnožavanje i na osnovu toga se gljive svrstavaju u četiri grupe, odnosno klase: Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes. Gljive klase Deuteromycetes nemaju sposobnost stvaranje polnih spora, već se razmnožavaju samo bespolno. Gljive koje spadaju u klasu Basidiomycetes se polno razmnožavaju uz pomoć haploidnih bazidiospora koje se formiraju na bazidijumu u kojima diploidno jedro podleže mejozi (Carlile et al., 2001). Kalsifikacija gljiva je izvršena na osnovu građe himenijuma, sloja koji stvara spore, odnosno himenofora-strukture na kojoj se himenijum nalazi (Moore, 2005). Prema građi himenofora gljive se dele na:

1. Lističavke - red Agaricales, plodonosno telo se sastoji od klobuka (šešira) i drške, a himenofor je u obliku radijalno poređanih listića odnosno lamela;
2. Rupičavke - red Polyporales, kod kojih je himenium u obliku kraćih ili dužih cevčica u kojima su smešteni bazidi (Stojanović i Nikšić, 2003).

2.1.1 Biološka aktivnost medicinskih gljiva

Osim u ishrani, gljive su vekovima korišćene i za prevenciju mnogih bolesti, kao lek, zbog čega je veliki broj njih svrstan u kategoriju medicinskih gljiva (Cheung et al., 2003). Vreli vodeni ekstrakti medicinskih gljiva koji su se sastojali uglavnom iz polisaharida su se koristili u tradicionalnoj medicini Dalekog Istoka odakle poznavanje i praksa korišćenja medicinskih gljiva i potiče. Gljive kao što su *Ganoderma lucidum* (Reiši), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Čaga) i mnoge druge su sakupljane i korišćene stotinama godina unazad u Koreji, Japanu, Kini i istočnoj Rusiji (Wasser, 2002). Gljive se smatraju funkcionalnom hranom bilo da se koriste u obliku plodonosnih tela, micelijuma ili njihovih različitih ekstrakata. Biološka aktivnost ekstrakata gljiva najčešće se vezuje za sadržaj polisaharida i polifenola (Cheung et al., 2003). Naime, polisaharidi pripadaju strukturno raznovrsnoj klasi makromolekula. Za razliku od nukleotida u nukleinskim kiselinama i aminokiselina u proteinima, koji se mogu vezati samo na jedan način, monosaharidi koji predstavljaju monomerne jedinice polisaharida se mogu vezati na više lokacija i na taj način mogu da formiraju širok spektar linearnih ili razgranatih struktura. Polisaharidi prisutni u gljivama su uglavnom glukani povezani β -(1,3) i β -(1,6) vezama i α -(1,3) vezama, a mnogi od njih su heteroglukani (Kaviyarasan et al., 2014). Izolaciju polisaharida iz gljiva je moguće izvršiti na različite načine, tako da se ekstrakcijom, separacijom i prečišćavanjem dobiju polisaharidi, polisaharopeptidi ili proteoglukani (Lin et al., 2008). Ove hemijske komponente izolovane iz gljiva su ključne za ispoljavanje zdravstvenih efekata koje gljive imaju, na primer poboljšavaju funkciju makrofaga i povećavaju imunološki odgovor ljudi koji ih konzumiraju (Manzi i Pizzoferrato, 2000; Savić et al., 2012; Zaidi et al., 2013). Veliki broj polisaharidnih frakcija izolovanih iz gljiva je proučavano u cilju određivanja njihove potencijalne primene u medicini. Tako su na primer Chihara i saradnici (1969) izolovali polisaharid iz plodonodnih tela gljive shiitake, koji poseduje antitumorno delovanje i nazvali ga lentinan. Po hemijskom sastavu lentinan je β -(1,3)-d-glukan koji se nalazi u ćelijskom zidu micelijuma gljive (Zhang et al., 2011). Istraživanja na miševima kojima je ubrizgana

vakcina protiv hepatitisa B su pokazala da lentinan ispoljava biološko dejstvo kroz stimulaciju produkcije antitela. Eksperimenti na ćelijskim kulturama su pokazali da lentinan stimuliše ćelije imunološkog sistema koje napadaju ćelije raka i ćelije inficirane virusima (Ina et al., 2013).

Poslednjih godina, pojava rezistencije patogenih mikroorganizama na postojeće lekove je sve učestalija. Neselektivna upotreba komercijalnih antimikrobnih preparata u lečenju infektivnih bolesti dovodi do mutacija u genomu bakterija, odnosno genima koji omogućavaju njihovo preživljavanje. Budući da evoluciju mikroorganizama ne mogu da spreče, naučnici su primorani da traže nove antimikrobne supstance iz različitih izvora (Turkoglu et al., 2007; Ren et al., 2014).

Gljive, bilo da su u obliku plodonosnih tela ili micelijuma sadrže metabolite koji poseduju antibakterijska svojstva, a koja im omogućavaju da prežive u prirodnom okruženju (Manjunathan i Kaviyaran, 2010; Alves et al., 2012). Istraživanjima je potvrđeno da više od 2000 vrsta pečurki poseduje antimikrobna i antioksidativna svojstva (Turkoglu et al., 2007; Manjunathan i Kaviyaran, 2010; Alves et al., 2012). Antimikrobna aktivnost gljiva se uglavnom pripisuje prisustvu različitih niskomolekularnih i visokomolekularnih jedinjenja. U niskomolekulana jedinjenja spadaju sekundarni metaboliti, kao što su seskviterpeni i drugi terpeni, steroidi, antrahinon i derivati benzoeve kiseline, ali i primarni metaboliti kao što su isparljive kiseline, fenoli, oksalna kiselina, galna kiselina, slobodne masne kiseline i njihovi derivati. U visokomolekularna jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem spadaju uglavnom peptidi i proteini (Ramesh i Pattar, 2010; Alves et al., 2012; Bala et al., 2012).

Još jedan od faktora rizika po ljudsko zdravlje predstavlja stres kojem je čovekovo telo izloženo. Grupa jedinjenja koja sadrže nesporene elektone, što ih čini veoma reaktivnim, su jaka oksidaciona sredstva i nazivaju se slobodnim radikalima. Oni nasumično oštećuju komponente ljudskog tkiva, kao što su lipidi, proteini, DNK, šećeri i na taj način dovode do mutacija i pojave raka. Prekomerna produkcija slobodnih radikala dovodi do oksidativnog stresa (Wani et al., 2010). Faktori kao što su starenje, gojaznost i nezdrave životne navike vrlo često dovode

do oksidativnog oštećenja tkiva. Superoksid radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($\cdot OH$) i vodonik peroksid (H_2O_2) oštećuju DNK, narušavaju strukturu enzima i proteina i dovode do lančanih reakcija, uključujući i lipidnu peroksidaciju, koje je nemoguće kontrolisati (Ren et al., 2014).

Skoro svi organizmi imaju prirodnu zaštitu protiv negativnog dejstva slobodnih radikala. U to spadaju enzimi superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza (YouGuo et al., 2009). Međutim, ovi enzimi nisu dovoljni da spreče oštećenja, pa zato antioksidansi služe kao dopuna prirodnom odbrambenom sistemu. Antioksidansi se definišu kao jedinjenja koja poseduju sposobnost da zaštite biološke sisteme od potencijalnih štetnih procesa i reakcija koji mogu dovesti do preterane oksidacije (Krinsky, 1989). Butil hidroksianizol (BHA) i butil hidroksitoluol (BHT) koji su veoma zastupljeni u prehrambenoj industriji su sintetički antioksidansi za koje se sumnja da su odgovorni za oštećenja jetre i pojavu kancera (Öztürk et al., 2011). Sa druge strane jedinjenja prirodno prisutna u biljkama i pečurkama kao što su polisaharidi, fenoli, flavonoidi, vitamini i terpenoidi deluju kao antioksidansi i štite ćeliju od oštećenja izazvanim reaktivnim kiseonikovim vrstama (ROS) (Niki, 2010). Cheung i saradnici (2003) su pokazali da postoji direktna korelacija između antioksidativne aktivnosti ekstrakata gljiva i ukupnih fenola. Utvrđeno je da prečišćeni proteoglukani izolovani iz plodonosnih tela *Pleurotus ostratus* gljive predstavljaju potencijalne nove antioksidanse (Xia et al., 2011). Prečišćeni polisaharidi izolovani vodenom ekstrakcijom i etanolnom precipitacijom iz devet vrsta gljiva pokazali su značajnu sposobnost vezivanja DPPH radikala (Ren et al., 2014).

2.1.2 Medicinska gljiva *Coriolus versicolor*

Coriolus versicolor (*Trametes versicolor* (L.: Fr) Lloyd, 1920.), ili gljiva belog truljenja, kako je često nazivaju, spada u medicinske gljive koje poseduju širok spektar fizioloških svojstava, kao što su na primer antimikrobna i antioksidativna aktivnost, što je značajno za metabolizmaam gljiva jer na taj način štite svoja plodonosna tela od štetnih uticaja sredine i toksičnih komponenti. U literaturi se

može naći pod različitim imenima: *Agaricus versicolor*, *Boletus versicolor*, *Polyporus versicolor*, *Polystictus versicolor*, *Poria versicolor* i *Trametes versicolor*. U Japanu je prepoznaju pod imenom *Kawaratake* što u bukvalnom prevodu znači „gljiva koja raste na obali reke“ dok je u Kini poznata kao *Yun-Zhi* što u prevodu znači „gljiva nalik oblaku“, verovatno zbog talasastog rasta i površine koja podseća na paperje. U Evropi i Americi, *C. versicolor* gljivu nazivaju i „ćuranov rep“ zbog specifičnog izgleda plodonosnih tela (Chu et al., 2002; Cui i Chisti 2003). Stanište su joj šume Azije, Evrope i Severne Amerike sa umerenom klimom (Cui i Chisti 2003). Plodonosna tela gljive rastu u skupinama koje se preklapaju, i to na mrtvom ili oštećenom drveću, stablima, panjevima i trupcima. (Chu et al., 2002). Osim što se *C. versicolor* može naći u prirodi, ova gljiva se može gajiti na čvrstom supstratu (Slika 1), gde formira plodonosna tela na isti način kao kad raste u prirodi i u tečnoj kulturi, gde ne prelazi stadijum micelijuma (Cui i Chisti 2003). „Solid state“ fermentacija (SSF) odnosno gajenje gljive *C. versicolor* na čvrstom supstratu se najčešće koristi u takozvanim zelenim tehnologijama u procesima bioremedijacije, zbog sposobnosti gljive da produkuje veliku količinu ekstracelularnih enzima koji razgrađuju lignin (Kadhim et al., 1999; Nigam et al., 2000; Ullah et al., 2000; Robinson et al., 2001). S druge strane, gljiva *C. versicolor* predstavlja dobar izvor komponenti sa antioksidativnim i antibakterijskim karakteristikama kao što su ekstraćelijski i intraćelijski polisaharopeptidi (Chu et al., 2002; Kozarski et al., 2012b; Ma et al., 2013).

Morfološke karakteristike plodonosnih tela gljive opisali su Soothill i Fairhurst (1978). Plodonosna tela su veličine od 3 do 5 cm, polukružnog su oblika, tanka ali čvrsta, sa uglavnom talasastim ivicama. Mlada plodonosna tela su savitljiva, a tokom rasta se često grupišu i preklapaju. Gornja površina je baršunasta i na njoj se mogu uočiti koncentrične zone različitih boja. Uglavnom su to braon, žuta, razne nijanse zelene i crna. Spore gljive su bele boje, duguljaste i cilindrične (4-6 mm x 2-2.5mm).



Slika 1. Gljiva *Coriolus versicolor* - rast na čvrstom supstratu.

Prema taksonomskoj klasifikaciji gljiva *Coriolus versicolor* je svrstana u sledeće taksonomske kategorije (Justo i Hibbett, 2011):

Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: Basidiomycota

Klasa: Agaricomycetes

Red: Polyporales

Familija: Polyporaceae

Rod: Trametes

Vrsta: *Trametes versicolor*

2.1.3 Submerzno gajenje gljiva

Submerzni procesi su procesi koji se koriste u industriji za proizvodnju različitih makromolekula, antibiotika, enzima i biomase, a karakteriše ih to što što su reaktivne komponente tokom trajanja procesa potopljene u tečnoj podlozi čiji sastav zavisi od vrste procesa. Submerzna fermentacija gljiva (SmF) i gajenje gljiva na čvrstom supstratu su dve tehnike pogodne za industrijsko dobijanje biomase gljiva i njihovih metabolita. Industrijska proizvodnja bioaktivnih komponenata

izolovanih iz gljiva ponekad može biti otežana. Proizvodnja plodonosnih tela gljiva u komercijalne svrhe vrlo često može trajati dugo, i do nekoliko meseci. Takođe, tokom gajenja gljiva na čvrstom supstratu potrebno je uložiti dosta fizičkog rada, što otežava i poskupljuje proizvodnju. Ishod gajenja takođe je vrlo često nepredvidiv zbog velike verovatnoće da dođe do kontaminacije supstrata i poteškoća koje se javljaju prilikom kontrolisanja parametara procesa proizvodnje. Kao posledica svega toga, vrlo često je prinos biomase smanjen, a samim tim je smanjen i prinos bioaktivnih komponenata čija je izolacija uglavnom cilj. Sa druge strane, postoje i neke vrste gljiva koje su specifične za gajenje i vrlo retke u prirodi. U takvim situacijama proizvodnja biomase submerznim postupkom je najbolja opcija za dobijanje bioaktivnih jedinjenja (Kim et al., 2005; Tang et al., 2007; Borràs et al., 2008). Glavne prednosti submerznog gajenja gljiva su što se na ovaj način obezbeđuje konstantan kvalitet biomase dobijene u definisanom prostoru za kraće vreme sa smanjenom mogućnošću kontaminacije. Sa druge strane, na rast bazidiomiceta u tečnoj kulturi utiču uslovi pod kojima se fermentacija izvodi, kao na primer temperatura, brzina i način mešanja, količina rastvorenog kiseonika, sastav supstrata za gajenje, metaboliti koje proizvodi sama gljiva, pH medijuma za gajenje. Promene u pH vrednosti tokom fermentacije, obogaćivanje medijuma za gajenje različitim ekstraktima biljaka, upotreba različitih izvora ugljenika i azota su samo neki od pokušaja da se unaprede sistemi za submerzno gajenje. Uticaj svih navedenih faktora na rast biomase bazidiomiceta proučavan je od strane velikog broja autora (Cui i Chisti, 2003; Borràs et al., 2008; Yang et al., 2012; Ma et al., 2013). Procesi submerznog gajenja gljiva u cilju dobijanja bioaktivnih komponenata se uvek optimizuju podešavanjem gore navedenih parametara da bi se postigao maksimalni prinos a minimalizovali troškovi (Lübbert, 2003).

Prema Kineskoj tradicionalnoj medicini, veruje se da *Coriolus* sp. može biti koristan za uklanjanje toksina, jačanje organizma, povećanje energije i poboljšanje imunološkog sistema kod ljudi (Chu et al., 2002). Danas na tržištu postoje brojni komercijalni preparati na bazi različitih vrsta gljiva i njihovih ekstrakata, uključujući i preparate na bazi gljive *C. versicolor*. Najpoznatiji komercijalni preparati gljive *C. versicolor* su Krestin (PSK) i polisaharopeptid (PSP). Oba

preparata su dobijena ekstrakcijom micelijuma gljive dobijene šaržnom fermentacijom. Krestin je dobijen vrelom vodenom ekstrakcijom micelijuma i taloženjem amonijum sulfatom japanske gljive *C. versicolor* soja Cov-1, i komercijalizovan od strane japanske firme Kureha Chemicals, gde je 1977 godine odobren za upotrebu. PSP je dobijen vrelom vodenom ekstrakcijom i alkoholnom precipitacijom micelijuma kineske gljive *C. versicolor* i to soja CM-101 (Cui i Chisti, 2003). Ovi preparati ispoljavaju antitumorno, hepatoprotektivno i analgetičko dejstvo (Chu et al., 2002; Cui i Chisti, 2003; Tsang et al., 2003; Chan et al., 2009). Takođe, primećeno je da ova jedinjenja ispoljavaju značajnu imunomodulatornu aktivnost i imaju potencijalna antidijabetska svojstva kao inhibitori α -glukozidaze (Lin et al., 2008; Yang et al., 2012). Dokazano je da PSK povećava petogodišnje preživljavanje pacijenata sa rakom želuca, nazofaringsa, debelog creva i pluća u Japanu (Yeung i Or, 2007). PSP je korišćen kao dodatak hemoterapiji i radioterapiji kod kliničkih ispitivanja onkoloških pacijenata. Dodatak PSP-a je doveo do smanjenja neželjenih efekata primenjenih terapija kao što su mučnina, povraćanje, gubitak apetita, umora i bola kod testiranih pacijenata. Čak 85.8 % testiranih pacijenata je primetilo pomenuta poboljšanja u odnosu na kontrolu grupu kod koje je taj procenat iznosio 41.9 % (Liu et al., 1999). Novija istraživanja su pokazala da PSP inhibira rast ćelija raka dojke (Chow et al., 2003). Obzirom na značajan doprinos polisaharida i polisaharopeptida izolovanih iz gljive *C. versicolor* zdravlju ljudi, nekoliko studija je sprovedeno u cilju poboljšanja produkcije njenih polisaharida (Lin et al., 2008; Bolla et al., 2010; Yang et al., 2012; Ma et al., 2013; Que et al., 2014).

2.1.3.1 Morfologija peleta

U submerznoj kulturi, gljive mogu rasti u vidu dva morfološka oblika: kao peleti ili kao dispergovani filamenta (Cui i Chisti, 2003). Dobra kontrola morfologije rasta micelijuma je važna sa stanovišta performansi bioreaktora, posebno na industrijskom nivou. Dispergovani rast gljiva povećava viskoznost što dovodi do smanjenog transporta kiseonika i nutrijenata a samim tim i smanjenja

produktivnosti i efikasnosti procesa (Cui i Chisti, 2003; Couto i Toca-Herrera, 2007; Borràs et al., 2008). Bermek i saradnici (2004) su pokazali da rast gljive *Trichophyton rubrum* u tečnoj kulturi u obliku filamenata smanjuje produkciju lignoceluloznih enzima. Sa druge strane, rast u obliku peleta je povoljniji zbog toga što je ponašanje takvog fluida približno njutnovskom, i ne dolazi do adhezije gljive ni na jednom delu bioreaktora. Takođe, izolacija biomase gljive iz tečne podloge u kojoj raste je mnogo lakša kada gljiva raste u obliku peleta. Zbog toga je dobijanje uniformnih peleta poželjno. Međutim, takvu strukturu biomase u uslovima bioreaktora nije lako postići. Kada se jednom uspostave uslovi koji omogućavaju formiranje takvih peleta, to predstavlja potvrdu dobro dizajniranog sistema za submerzno gajenje (Cui i Chisti, 2003; Couto i Toca-Herrera, 2007; Borràs et al., 2008). Istraživanja su pokazala da je submerzan način gajenja gljiva pogodniji za dobijanje jedinjenja kao što su polisaharopeptidi u poređenju sa proizvodnjom plodonosnih tela na čvrstom supstratu (Cui i Chisti, 2003). Postoji nekoliko faktora koji su limitirajući, a tiču se industrijske proizvodnje bioaktivnih komponenata prisutnih u plodonosnim telima gljiva. Glavni nedostaci, osim sporog rasta, su visoki troškovi prečišćavanja i promenljiv, nestandardni kvalitet proizvoda. Izolacija i prečišćavanje bioaktivnih komponenata koje se mogu upotrebiti kao farmaceutski proizvodi i kao funkcionalna hrana su mnogo lakši i brži kada je upitanju micelijum gljive u poređenju sa plodonosnim telom, zbog manjeg sadržaja balasta u fungalnoj biomasi (Turło, 2014). Vrlo često je gotovo nemoguće razdvojiti biomasu od supstrata tokom SSF fermentacije zbog toga što se micelijum vrlo čvrsto vezuje za supstrat. Takođe, gljive koje rastu na supstratima koji potiču iz industrijskih područja mogu da akumuliraju toksične doze teških metala (Mitchell i Berović, 2003). S druge strane, primenom submerznog postupka gajenja, bioaktivne materije kao što su polisaharidi se mogu ekstrahovati iz micelijuma ili izolovati iz tečne podloge zaostale nakon gajenja (Cui i Chisti, 2003; Sánchez et al., 2015). Stvaranje sekundarnih metabolita se dešava u stacionarnoj fazi rasta, i zbog toga je diskontinualni submerzni proces u bioreaktoru idealan za produkciju egzopolisaharida (Duvnjak et al., 2016).

2.1.4 Gajenje gljiva na čvrstom supstratu

Gajenje gljiva na čvrstom supstratu je proces koji se odvija na čvrstom supstratu, u potpunom ili skoro potpunom odsustvu slobodne tečnosti (Pandey et al., 1999). Pri gajenju gljiva na čvrstom supstratu koriste se dva tipa nosača: sintetički materijal, koji služe samo kao nosači za gljivu, i organski supstrat, koji osim što ima ulogu nosača, služi i kao izvor hranljivih materija (Rosales et al., 2004). Materijali koji se koriste kod gajenja na čvrstom supstratu su najčešće poljoprivrednog porekla (različit otpad) koji je najčešće nerafinisan. Na primer, za gajenje gljiva se koriste pšenična slama, hrastova piljevina, ljuske kikirikija, pamučni otpad, kukuruzni otpad iz destilerija, mlevena soja, pirinčane mekinje (Le et al., 1999; Philippoussis et al., 2001; Estrada et al., 2009). Zbog toga je zadovoljenje određenih traženih karakteristika i određivanje kvaliteta takvog materijala vrlo često veoma teško sprovesti. Samim tim, teško je postići uniformnost krajnjeg proizvoda (Robinson i Nigam, 2003). Sa druge strane, ovakav vid gajenja gljiva se pokazao pogodnim zbog toga što omogućava viši prinos proizvoda i lakše procesuiranje nakon fermentacije u poređenju sa submerznim gajenjem (Robinson i Nigam, 2003). Takođe, SSF fermentacija poseduje veliki potencijal za produkciju sekundarnih metabolita kao što su enzimi. Pored toga, ponovno korišćenje otpada iz poljoprivredne i prehrambene industrije je veoma značajno kako sa ekonomskog tako i sa ekološkog stanovišta (Rosales et al., 2004).

2.2 Selen

2.2.1 Fizičko hemijska svojstva selena

Hemijski element selen (Se) je otkrio švedski hemičar Jens Jakob Berzelijus 1817. godine, kada je analizirao tragove crvenog praha sa zida olovne komore nastalog tokom proizvodnje sumporne kiseline. Selen je dobio ime po grčkoj boginji Meseca Seleni. Hemijski pripada VIa grupi i IV periodu periodnog sistema elemenata (zajedno sa kiseonikom, sumporom, telurom i polonijumom) i spada u nemetale. Molekulska masa selena iznosi $78.96 \text{ mol dm}^{-3}$ a tačka topljenja mu je

217 °C. Upravo pripadnost istoj grupi periodnog sistema elemenata je razlog zbog koga selen ispoljava veoma slične hemijske karakteristike u poređenju sa sumporom, i u nešto manjoj meri sa telurom. U prirodi se nalazi u četiri oksidaciona stanja, u obliku selenida (-2), elementarnog selena (0), selenita (+4) i selenata (+6) (Barceloux, 1999; Chasteen i Bentley, 2003; El-Ramady et al., 2015). Elementarni selen je stabilan, i u prirodi se javlja u obliku tri alotropske modifikacije: tamno crvenih kristala (tačka topljenja 144 °C), crvenog amorfno praša i crne staklasto kristalne forme (Barceloux, 1999). Postoji šest stabilnih izotopa selena: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se i ^{79}Se . U poslednje vreme posebna pažnja se posvećuje problemu odlaganja nuklearnog otpada, odnosno izotopu ^{79}Se koji nastaje nuklearnom fisijom ^{235}U (Fernández-Martínez i Charlet, 2009). Ovaj element je našao primenu u industriji u proizvodnji keramike i stakla, fotoelektričnih ćelija, poluprovodnika, u kserografiji, pri proizvodnji guma (pri procesu vulkanizacije) itd. (Chasteen i Bentley, 2003).

2.2.2 Selen u zemljištu i vodama

Primarni izvori selena u prirodi su vulkanske stene i sulfidi teških metala kao što su srebro, bakar, olovo, živa i nikel formirani vulkanskom aktivnošću. Selen se u njima osim u obliku sulfida može naći i umesto sumpora u kristalnoj mreži minerala (Adriano, 1986; Čuvarđić, 2003). Řezanka i Sigler (2008) su objavili da je sadržaj selena u Zemljinoj kori relativno nizak i da se kreće u opsegu od 0.05 do 0.09 mg kg⁻¹. Budući da sadržaj selena u zemljištu odražava njegov status u hrani, ovaj podatak ukazuje na njegov nizak sadržaj u hrani u globalu. U kiselim zemljištima prisutan je uglavnom u obliku selenita (Se⁺⁴) koji su slabo rastvorni i slabo dostupni biljkama. U alkalnom zemljištu selen je oksidovan do selenata koji je rastvorljiviji i dostupniji usevima (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Najnovija istraživanja su pokazala da postoji negativna korelacija između sadržaja organske materije u zemljištu i sadržaja u vodi rastvorljivih oblika selena. Organska materija prisutna u zemljištu služi kao izvor elektrona koji redukuju selenate do selenita (Se⁺⁴), koji pak formiraju jake unutrašnje komplekse sa

oksidima gvožđa. Sa druge strane selenati (Se^{+6}) se slabo adsorbuju na površini oksida i kao takvi predstavljaju najdostupniji oblik selena biljkama. Zbog toga se selen u ispranom zemljištu bogatom organskom materijom i oksidima gvožđa, niske pH vrednosti nalazi uglavom vezan u nerastvornom obliku zbog čega je njegova dostupnost biljkama koje rastu na takvom zemljištu ograničena (Johnson et al., 2000; Hartikainen, 2005; Spadoni et al., 2007). Delovi regiona u kojima je primećen značajno niži sadržaj selena u zemljištu je nečernozemska zona koja se proteže od severoistočnih granica SAD-a, a zatim ide dalje preko Evrope i pokriva severnu Nemačku, Dansku i Poljsku, kao i Baltik i centralnu Rusiju, i dalje ide preko celog Sibira do istočnih granica Rusije (Ermakov i Jovanović, 2010). Zemljišta određenih regiona Kine, Finske i Novog Zelanda sadrže čak i niže koncentracije selena od 0.05 mg kg^{-1} , što za posledicu ima pojavu bolesti kod životinja i ljudi čiji je uzrok nedovoljan unos selena (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Istraživanja su pokazala da je i vulkanski region koji obuhvata područje bivše Jugoslavije takođe deficitaran selenom (El-Ramady et al., 2015). Istraživanja sprovedena u Srbiji su pokazala da je sadržaj selena u metamorfnim stenama veoma nizak, i da iznosi 28 ng g^{-1} . To ukazuje na činjenicu da procesi metamorfoze istiskuju selen iz stena (Jovic et al., 1995). Niske koncentracije vodorastvorljivog selena (od tragova, do $0.014 \text{ } \mu\text{g Se g}^{-1}$ uzorka) su detektovane u Vojvodini i to u sedam različitih tipova ispitivanog zemljišta (Čuvarđić, 2000).

Sa druge strane, postoji zemljište koje je veoma bogato selenom gde koncentracija selena ide i do 10 mg kg^{-1} pa čak i 1200 mg kg^{-1} (Mayland et al., 1989). Toksičan nivo selena u zemljištu u Evropi je registrovan na nekoliko lokacija u Velsu i Irskoj (Čuvarđić, 2003).

Selen je u vodi prisutan u obliku selenata i selenita, uglavnom kao posledica ispiranja zemljišta i stena bogatih selenom (Fan i Kizer, 1990). Generalno, podzemne vode sadrže viši nivo selena od površinskih, zbog kontakta sa stenama. Voda za piće, ali i vode mora i okeana posredstvom morske hrane imaju značajnu ulogu u izloženosti ljudi selenu (Santos et al., 2015). Svetski proseka sadržaja selena u slatkim vodama iznosi $0.02 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, dok je u morskoj vodi nešto viši i iznosi manje od $0.08 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (Fernández-Martínez i Charlet, 2009; Mitchell et al., 2012). Svetska

zdravstvena organizacija je dala privremene smernice za sadržaj selena u vodi za piće i postavila granicu na 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2011). U Evropskoj uniji maksimalan dozvoljeni sadržaj selena iznosi 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ (European Commission, 1998), dok je u SAD-u 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2009).

2.2.3 Hemijski element selen: između toksičnosti i esencijalnosti

Selen je prvobitno bio poznat po toksičnim svojstvima (Barceloux, 1999; Thiry et al., 2012; Yu et al., 2014). Prva trovanja selenom zabeležio je Marko Polo, još 1295. godine. Tada je tokom putovanja kroz Kinu uočio tipične nekrotične promene na kopitama konja koji su jeli biljke za koje se danas zna da su „akumulatori selena“. Budući da se kod intoksikacija velikom koncentracijom selena javlja karakterističan izgled kopita konja, sa velikom sigurnošću se može reći da je to bio prvi opis selenozisa (Birringer et al., 2002). Krajem devetnaestog, početkom dvadesetog veka, pažnja naučnika je bila usmerena ka identifikovanju uzroka pojave takozvane alkalne bolesti goveda, koja se javljala kod goveda u zapadnom delu SAD-a, na području na kojem zemljište sadrži velike količine selena. Bolest je u literaturi poznata i kao „slepo posrtanje“, a karakterišu je gastrointestinalni bolovi, dezorijentisanost i paraliza koja se završava smrću (Hartikainen, 2005; Statwick i Sher, 2017). Posledice hronične intoksikacije selenom su primećene kod ljudi koji žive na geografskim područjima sa zemljištem bogatim selenom i simptomi su opisani takođe mnogo pre nego što je selen identifikovan kao uzročnik (Birringer et al., 2002). Kao prvi simptomi hroničnog trovanja selenom uočavaju se promene na kosi, noktima i koži. Kosa postaje krta i lomljiva. Na koži glave dolazi do pojave osipa koji počinje da svrbi. Nokti postaju krta i lomljivi i dolazi do diskoloracije, tj. pojave uzdužnih ili poprečnih linija beložućkaste ili crvene boje na površini. Kožne lezije se javljaju prvo na udovima. Karakterističan je zadah na beli luk, koji je indikator prekomernog izlaganja selenu, a javlja se kao rezultat ekshalacije dimetilselenida. U simptome hroničnog trovanja selenom (selenozisa) kod ljudi ubrajaju se depresija, umor, razdražljivost, mučnina i povraćanje. Toksični efekat selena se može delimično objasniti formiranjem

selenovih derivata glutationa koji funkcionišu kao redoks agensi koji cirkulišu i grade reaktivne kiseonikove vrste (ROS). Embriotoksično ili teratogeno dejstvo selena na ptice, stoku i eksperimentalne životinje je dobro poznato (Combs i Combs, 1986; Stewart et al., 1997; Barceloux, 1999; Beers i Berkow, 1999). Akutno ili hronično udisanje isparenja selena u topionicama bakra predstavlja ozbiljan hazard (Clinton, 1947). Prvi podaci o kancerogenim efektima selena na čovekov organizam pojavili su se još 1943 godine, što je uticalo na dalje stvaranje negativne slike o ovom elementu (Dumont i Cornelis, 2006). Tek su 1957. godine objavljeni prvi podaci o potencijalnoj esencijalnoj prirodi selena (Schwarz i Foltz, 1957). Švarc i Folc su serijom laboratorijskih eksperimenata dokazali da je selen kritičan faktor koji sprečava pojavu nekroze jetre kod pacova (Hartikainen, 2005). Zbog prethodnih istraživanja koja su govorila o toksičnosti ovog elementa, ovakvo istraživanje je dočekano sa skepticizmom. Međutim, kasnija istraživanja na domaćim životinjama su pokazala da je nedostatak selena u ishrani uzrok pojave nekoliko bolesti koje su do tada smatrane neizlečivim, kao što su na primer bolest „belih mišića“ koja se javlja kod teladi i oštećenja jetre kod svinja (Moir i Masters, 1970). Godine 1972. utvrđeno je da je selen kofaktor enzima glutation peroksidaze (Wu et al., 2013). Ne samo da je utvrđeno da je nedostatak selena u ishrani štetan za zdravlje životinja, već su se istraživanja razvila u pravcu ispitivanja uticaja suplementacije životinja selenom u cilju postizanja bolje produktivnosti. Dokazano je da suplementacija selenom dovodi do poboljšanja rasta i razmnožavnja (Oldfield et al., 1960; Andrews et al., 1968).

2.2.4 Selen u namirnicama biljnog i životinjskog porekla

Postoji hrana koja je prirodno bogata selenom. U selenom bogate namirnice spadaju kako one biljnog tako i one životinjskog porekla: jaja, žitarice (pšenica, kukuruz, pirinač), riba (87.6-737 ng g⁻¹), mesa (pileća džigerica), voće, povrće (beli i crni luk, brokoli), kvasac, kokos, brazilski orah, morski plodovi (Kieliszek i Błażej, 2013). Nedostatak upotrebe žitarica kao izvora selena je što se preradom

u fina brašna gubi od 10 do 50 % selena. Takođe, termička obrada hrane dovodi do gubitka selena od 10 do 45 % (Maksimović et al., 1992).

Dobar primer uticaja selena u zemljištu na njegov sadržaj u biljkama je drveće brazilskog oraha koje raste u blizini basena Amazona, uglavnom u Brazilu, ali i u Peruu, Boliviji, Kolumbiji, Venecueli i Ekvadoru. Naime, primećeno je da koncentracija selena može biti 10 puta veća u biljkama iz centralnog Brazila u odnosu na one iz zapadnih delova zemlje (Dumont et al., 2006). Sadržaj selena u brazilskom orahu kao selenom najbogatijoj namirnici iznosi od 2.35 do 43.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Thomson, 2011). Varijacije u sadržaju mogu postojati čak i kod plodova ubranih sa istog drveta, od 0.03 do čak 512 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Dumont et al., 2006; Thomson, 2011). Meso, piletina, riba i jaja spadaju u namirnice proteinske prirode koje su veoma bogate selenom. Najveće razlike u sadržaju selena su kod mesa, budući da koncentracija selena u mesu zavisi od hrane koju životinje konzumiraju (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Rezultati nekoliko istraživanja su pokazali da je biološka dostupnost selena iz mesa veoma visoka, iz razloga što se selen u namirnicama životinjskog porekla nalazi u obliku selenocisteina i selenometionina (Van Der Torre et al., 1991; Dumont et al., 2006). Selenometionin se apsorbuje u tankom crevu i deponuje u dugoročne telesne rezerve (Reyes et al., 2006). Díaz-Alarcón i saradnici (1996) su zaključili da su meso i proizvodi od mesa zajedno sa žitaricama, i to uglavnom hlebom daju najznačajniji doprinos dnevnom unosu selena ljudi koji žive u jugoistočnoj Španiji. Čak 55 % dnevnog unosa selena potiče od ove dve grupe namirnica, delom zahvaljujući visokoj koncentraciji selena u njima, a delom zbog unosa ovih namirnica u velikim količinama. Sadržaj selena u ribi je visok, međutim u nekim slučajevima riba i nije baš dobar izbor, zbog toga što može sadržati velike količine žive koja se vezuje za selen i formira neorganski nerastvorljiv kompleks čime ga čini nedostupnim za čovekov organizam (Van Der Torre et al., 1991; Pappa et al., 2006).

Primećeno je da se koncentracija selena u mleku poreklom od različitih vrsta životinja smanjuje prema sledećem redosledu: humano mleko > ovčije > kozije > kravlje mleko. Poznato je da je sadržaj selena u mleku u negativnoj

korelaciji sa sadržajem masti u njemu. Mleko i mlečni proizvodi predstavljaju značajan izvor selena za novorođenčad (Pappa et al., 2006).

Voće sadrži takođe male količine selena, što je rezultat niskog sadržaja proteina i visokog sadržaja vode u njemu (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Iz istog razloga se povrće smatra slabim izvorom selena (Sirichakwal et al., 2005). Međutim, povrće iz familije kupusa (rod Brassica) kao što su brokoli, kupus, karfiol, kelj, keleraba kao i beli luk, vlašac i crni luk imaju viši sadržaj selena, i u zavisnosti od obima konzumiranja njihova upotreba se može odraziti na status selena u telesnim tečnostima i tkivu kod čoveka (Ip i Ganther, 1994; Dumont et al., 2006; Kápolna i Fodor, 2007). Većina biljaka ne poseduje mogućnost da akumulira velike količine selena, pa koncentracija ovog elementa u njima uglavnom ne prelazi $100 \mu\text{g g}^{-1}$ suve mase. Čak i inkorporacija malih količina selena u proteine biljaka može biti toksična i redukovati rast biljaka (Bell i Cowey, 1989). Ove biljke sadrže veće frakcije aminokiselina koje sadrže sumpor i njihovih derivata, ali i druge hemijske komponente sa sumporom, što omogućava inkorporaciju selena na mesto sumpora.

2.2.5 Gljive kao izvor selena

Gljive predstavljaju važan izvor selena, budući da imaju sposobnost da usvajaju i akumuliraju mineralne elemente iz supstrata na kome rastu (Tinggi, 2008). Sposobnost gljive da akumulira selen zavisi od vrste gljive, staništa, količine padavina i faze rasta u kojoj se nalazi (Zaidman et al., 2005). Proučavanje sposobnosti gljiva da akumuliraju pripodno prisutan selen datira unazad više od 30 godina (Stijve i Besson, 1976; Piepponen et al., 1983). Prema podacima koje je dao Falandysz (2008), sadržaj selena u plodonosnim telima jestivih gljiva se kreće u opsegu između 1 i $20 \mu\text{g}$ po gramu. Gljive roda *Boletus* mogu sadržati značajne količine selena u svojim plodonosnim telima: *Boletus edulis* ($1-10 \text{ mg kg}^{-1}$), *Boletus luridus* ($0.5-5 \text{ mg kg}^{-1}$), računato na svežu masu. *Lycoperdon pyriforme* sadrži između 0.4 i 0.9 mg kg^{-1} sirove biomase. Koncentracija selena u drugim vrstama gljiva je značajno niža i kreće se između 50 i $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ sirove biomase. U procesu

sušenja veliki deo selena iz pečuraka preko isparljivih jedinjenja selena ispari. Selen iz gljiva se apsorbuje u želucu, ulazi u krvotok i učestvuje u metabolizmu (Ermakov i Jovanović, 2010). Podaci o proizvodnji gljiva na supstratu obogaćenom selenom datiraju još od devedesetih godina prošlog veka (van Elteren et al., 1998; Spolar et al., 1999). Gljive mogu biti odličan izbor za produkciju organski vezanog selena zbog visokog sadržaja proteina (16.5 % do 39 %) i sposobnosti da apsorbuju teške metale iz supstrata na kome rastu (Maseko et al., 2013). Na primer, gljiva *G. lucidum* apsorbuje 20-30 % neorganskog selena iz supstrata na kome raste i inkorporira ga uglavnom u proteine 56-61 %. Selenom obogaćene gljive gajene na supstratu kome je dodat selen, (najčešće neorganske soli) su predložene za selenom obogaćenu funkcionalnu hranu, budući da se pokazalo da je *in vivo* biološka dostupnost selena iz ovakvog izvora veoma dobra (Rayman et al., 2007; Falandysz, 2008; da Silva et al., 2010). Takođe, apsorbcija organskog selena je sporija u odnosu na neorganski, a ujedno organski selen nije toksičan kada se unosi u većim dozama (Ahsan et al., 2014). Dosadašnja istraživanja su pokazala da se, vrsta jedinjenja u kome se selen javlja, menja u zavisnosti od vrste gljive i jedinjenja selena koje je upotrebljeno za obogaćenje kultivacionog medijuma (Bhatia, 2013). Selen u gljivama može biti prisutan kao selenocistein, selenometionin (SeMet), Se-metilselenocistein i selenit. Takođe, postoji i nekoliko još uvek neidentifikovanih oblika selena. Odnos prisutnih oblika selena zavisi od vrste gljive (Kalač, 2010). U protekloj deceniji, veliki broj studija je sproveden na velikom broju različitih vrsta gljiva gajenih na podlozi obogaćenoj selenom (Turlo et al., 2007; Milovanović et al., 2014). Ispitivanja na jednoj od najpopularnijih gljiva u istočnoj Aziji, gljivi shiitake (*Lentinus edodes*) su pokazala da vodeni ekstrakti ove gljive sadrže SeMet kao glavnu komponentu selena. Autori tvrde da se ne radi o SeMet koji nije inkorporiran u proteine, već o SeMet koji je vezan za proteine (Ogra et al., 2004). Rezultati istraživanja koje su sproveli Dernovics i saradnici (2002) su pokazali da gljiva *Agaricus bisporus* bolje usvaja selen iz organskih izvora u poređenju sa neorganskim. Budući da su gljive vekovima korišćene kao vredan izvor različitih mikronutrijenata, potencijalni korisnici selenovih suplemenata na bazi gljiva su uglavnom već upoznati sa blagotvornim dejstvom koje pečurke imaju

na zdravlje ljudi. Plodonosna tela gljiva, micelijum ili njihovi ekstrakti mogu ispoljavati biološku aktivnost kao što su antimikrobna, antitumorna i antioksidativna (Duvnjak et al., 2016).

2.2.6 Značaj selena u očuvanju zdravlja ljudi

Budući da je selen esencijalan za pravilno funkcionisanje čovekovog organizma preporučeni dnevni unos se kreće između 55 $\mu\text{g dan}^{-1}$ i 70 $\mu\text{g dan}^{-1}$ za zdrave žene i muškarce, redom (Barceloux, 1999; Amoako et al., 2009). Nedovoljni unos selena dovodi do opšteg pada imuniteta i pojave mnogih bolesti, kao što su na primer obstruktivna kardiomiopatija i kancer (Du et al., 2007). Rezultati nekih istraživanja ukazuju na to da nedostatak selena dovodi do pojave skoro 40 vrsta bolesti (Wang et al., 2011a). Istraživanja sprovedena na beogradskim opštinama Stari grad i Barajevo, kojima su obuhvaćeni ljudi sa progresivnim malignim oboljenjima i koronarnim bolestima su pokazala da je sadržaj selena u serumu ispitanika na nivou najnižih zabeleženih koncentracija u svetu (Backović et al., 1999). Klark i saradnici (Clark et al., 1996) objavili su da unos selena u obliku selenskog kvasca u većim koncentracijama (200 μg dnevno) može dovesti do smanjenja smrtnosti od raka pluća, debelog creva i raka prostate i do 50 %. Takođe, dokazano je da je suplementacija selenom (u koncentraciji od 600 μg dnevno u obliku selenskog kvasca obogaćenog vitaminom E) kod pacijenata obolelih od reumatoidnog artritisa u trajanju od 8 meseci dovela do značajnog umanjenja bolova u zglobovima, a sporedni efekti nisu uočeni (Rayman, 2004). Zbog dualne prirode koju selen ima važno je održati njegov optimalan unos, budući da unošenje, kako visoke, tako i niske koncentracije ovog elementa u organizam predstavlja rizik po zdravlje ljudi. Prema Naučnom odboru za hranu (Scientific Committee on Food) maksimalan tolerantni dnevni unos selena u Evropi iznosi 300 μg (SCF, 2000). Gornja granica tolerantnog dnevnog unosa u SAD-u je 400 μg dnevno, budući da postoje dokazi da unos iznad ove koncentracije može dovesti do pojave dermatitisa, alopecije i dijabetesa tipa dva (Dietary Reference Intake (DRI), 2000; Goldhaber, 2003; Rayman, 2012a). Svakodnevni unos selena u koncentraciji

koja prelazi 800 µg je označen kao toksičan, dok unos ispod 20 µg dovodi do pojave simptoma koji prate deficitaran unos (Ebert i Jakob, 2007). Smatra se da konzumacija hrane koja sadrži manje od 0.1 µg Se po gramu rezultira njegovim nedovoljnim unosom dok konzumiranje hrane koja sadrži više od 1 µg Se po gramu dovodi do pojave toksičnosti (Dumont i Cornelis, 2006). Nedostatak selena pogađa najmanje milijardu ljudi na planeti (Bhatia, 2013).

2.2.7 Biološka uloga selena

Selen ispoljava svoju biološku ulogu preko selenoproteina. Godine 1967. došlo je do revolucionarnog otkrića. Tada je otkriveno da stop kodon UGA ne kodira samo završetak translacije selenoproteina, već i specifičnu ugradnju aminokiseline selenocistein. Selenocistein je tada označena kao 21. esencijalna aminokiselina (Gladyshev et al., 1999). Selenometionin (SeMet) i selenocistein (SeCys) su aminokiseline identične metioninu i cisteinu, sa tom razlikom što obe aminokiseline sadrže selen na mestu sumpora. SeMet je esencijalna aminokiselina i mogu je sintetisati jedino biljke, kvasci i neke bakterije (Pappas et al., 2008). U ljudskom genomu je identifikovano 25 gena koji kodiraju selenoproteine (Kipp et al., 2015). Ovi selenoproteini regulišu niz hemijskih reakcija u organizmu čoveka važnih za inaktivaciju reaktivnih oblika kiseonika, redoks regulaciju i metabolizam tiroidnih hormona (Metanis i Hilvert, 2014).

2.2.7.1 Selen zavisni enzimi

Glutation peroksidaze pripadaju grupi homologih enzima koji dele nekoliko zajedničkih osobina kao što su kataliza glutacion-zavisne degradacije hidroperoksida i neophodnost prisustva selena kao komponente aktivnog centra enzima (Gladyshev et al., 1999; Zachara et al., 2001; Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Iako pripadaju istoj grupi, ovi enzimi se razlikuju prema nekim karakteristikama i svrstani su u šest grupa.

1. Citosolna glutacion peroksidaza (GPx1) je jedan od najviše proučavanih i najbolje opisanih selenoproteina (Gladyshev et al., 1999). Prvi je otkriven

selenoprotein kod sisara (Steinbrenner et al., 2016). Naime, Rotruck i saradnici (1973) su identifikovali selen kao jednu od esencijalnih komponenti (kofaktor) enzima glutation-peroksidaze (GSH-Px). Kasnije je otkriveno da je GPx1 glavni antioksidativni činilac u uslovima ozbiljnog oksidativnog stresa (Steinbrenner et al., 2016). Budući da je otkrivena snažna linearna veza između sadržaja selena u eritrocitima i aktivnosti enzima GPx1, ovaj enzim je postao prvi biomarker za utvrđivanje statusa selena u organizmu (Brown i Arthur, 2001).

2. Gastrointestinalna glutation-peroksidaza (GPx2) je najvažniji selenoprotein koji se nalazi u debelom crevu. Ovaj enzim suzbija oksidativni stres i može da potisne upalu crevne sluznice. Budući da se zna da je oksidativni stres jedan od najznačajnijih činilaca koji dovodi do razvoja tumora, najverovatnije je da GPx2 svojom antioksidativnom aktivnošću pruža ranu odbranu od raka debelog creva (Brown i Arthur, 2001; Wu et al., 2013).
3. Ekstracelularna glutation peroksidaza (GPx3) je tetramerni protein koji se stvara uglavnom u bubrezima i izlučuje u ekstraćelijski prostor. Druga tkiva (pluća, srce, tiroidna žlezda itd.) proizvode ovaj enzim u manjoj meri. Takođe je pronađen u ekstraćelijskim tečnostima kao što su krvna plazma, mleko, amnionska tečnost (Gromadzińska et al., 2008).
4. Fosfolipidna hidroperoksidna ili intracelularna glutation peroksidaza (GPx4) inhibira lipidnu peroksidaciju masnih kiselina i esterifikuje ih do stuktturnih fosfolipida koji se ugrađuju u ćelijske membrane. Ovaj enzim takođe redukuje hidroperokside holesterola i njegovih estara do LDL-a (Zachara et al., 2001).
5. Glutation peroksidaza locirana u testisima sisara (GPx5) (Surai, 2006).
6. Olfaktorna glutation peroksidaza (GPx6) je pronađena do sada samo u mirisnom epitelu i kod embriona ali mu je funkcija još uvek nepoznata (Kryukov et al., 2003; Vaishnav et al., 2008).

Enzimi kao što su tireodoksin reduktaza (TRxR) i trijod tironin dejodinaza takođe sadrže selen (Kipp et al., 2015). Tamura i Stadtman (1996) su identifikovali i prvi put opisali novi selenoprotein, enzim tireodoksin reduktazu. Ovaj enzim

redukuje oksidovani tireodoksin. Takođe, TRxR redukuje određena jedinjenja niske molekulske mase kao što su oksidovani glutation, dehidroaskorbinska kiselina, vitamin K, lipidne perokside i vodonik peroksid (Kieliszek i Błażej, 2013). Postoje tri oblika enzima tireodoksin reduktaza (TRxR): citosolna (TRxR1), mitohondrijalna (TRxR2) i tireodoksin-glutation reduktaza (TRxR3) visoko eksprimirana u testisima. TRxR1 je visoko eksprimirana u neurološkom tkivu (Soerensen et al., 2008). U okolnostima smanjenog unosa selena, ekspresija TRxR enzima je najveća u mozgu, što ukazuje na njihovu ključnu ulogu u funkcionisanju mozga. Smanjena aktivnost TRxR enzima je povezana sa akumulacijom reaktivnih vrsta kiseonika (ROS, reactive oxygen species) i etiologijom Alchajmerove i Parkinsonove bolesti. Sa druge strane, ćelije tumora, ukoliko su prisutne, mogu uzimati elektrone iz sistema tireodoksin reduktaza. Zbog toga, razvoj novih antikancerogenih lekova je usmeren i ka izučavanju ovih enzima. Tireodoksin reduktaze mogu optimizovati rast malignih ćelija tokom tumorigeneze i otkriveno je da su oni prekomerno eksprimirani u mnogim agresivnim tumorima (Park et al., 2006). Selen ispoljava nekoliko značajnih uloga u štitnoj žlezdi i to preko grupe enzima jodtironin dejodinaza, koja obuhvata tri enzima. Selen-zavisna jodtironin dejodinaza (DIO1) proizvodi aktivni tiroidni hormon trijod tironin (T3) od neaktivnog prekursora tiroksina (T4) u štitnoj žlezdi. U procesu nastanka T3 hormona od T4 hormona od jodida i tireoglobulina dolazi do stvaranja vodonik peroksida, a selen u obliku GPx3 štiti ćelije štitne žlezde od njih (Rayman, 2012b). Jodtironin dejodinaza (DIO2) se eksprimira u štitnoj žlezdi, centralnom nervnom sistemu, hipofizi i skeletnim mišićima u kojima on reguliše sintezu i cirkulaciju T3 hormona (Azevedo et al., 2010). Nedostatak selena u kombinaciji sa nedostatkom joda dovodi do stanja poznatog kao miksodem (kretenizam) koji dovodi do povećanog oksidativnog oštećenja i izmenjenog metabolizma tiroidnih hormona (Azevedo et al., 2010). Nekoliko studija je pokazalo da je suplementacija selenom i to 80 µg do 200 µg dnevno u obliku natrijum selenita ili selenometionina efikasna protiv autoimune bolesti Hašimoto tireoiditisa (Negro et al., 2007; Nacamulli et al., 2010).

2.2.7.2 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP), gde slovo P označava plazmu, je glikoprotein molekulske mase 57 kDa i glavni je selenoprotein u plazmi sisara (Hill i Burk, 1997). Svaki molekul ovog proteina sadrži deset selenocisteinskih (SeCys) ostataka. Od ukupnog selena koji se nalazi u plazmi 40-50 % pripada selenoproteinu P, a zajedno SePP i GPx1 čine 90 % selena prisutnog u plazmi. To ukazuje na činjenicu da je suštinska uloga i jednog i drugog selenoproteina transport selena kroz organizam (Motsenbocker i Tappel, 1982; Reeves i Hoffmann, 2009). Esencijalan je za distribuciju i transport selena posebno do mozga i testisa (Kipp et al., 2015). U slučaju nedostatka, mozak nadoknađuje selen na račun drugih tkiva i organa, budući da nedostatak ovog elementa dovodi do nepovratnog oštećenja mozga. Selenoprotein P ima specijalnu ulogu u prenošenju selena do mozga, vezivanjem za površinu lipoproteinskog receptora. Rezultati istraživanja na ljudima ukazuju na značajnu ulogu selena u koordinaciji, pojavama napada, Parkinsonovoj bolesti i opadanju kognitivnih funkcija (Schweizer et al., 2004; Burk i Hill, 2009).

2.2.7.3 Selenoprotein W

Selenoprotein W (SelW) je intraćelijski protein veličine 8 kDa. Nalazi se u mnogim tkivima i u većoj količini u mišićima i mozgu (Gladyshev et al., 1999). Smatra se da je neophodan za funkcionisanje mišića, ali njegova funkcija još uvek nije sasvim poznata (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Budući da je njegova ekspresija veoma visoka tokom proliferacije mioblasta, smatra se da je njegova uloga u formiranju mišića zaštita mioblasta od oksidativnog stresa (Loflin et al., 2006).

2.2.7.4 Ostali selenoproteini

Selenoprotein 15 kDa se nalazi u endoplazmatičnom retikulumu (ER) i veruje se da učestvuje u formiranju proteina. Selenoprotein M (SelM) je strukturno

sličan prethodnom i najverovatnije služi za formiranje proteina u ER. Selenoprotein R (SelR) redukuje metionin-R-sulfokside što predstavlja važan korak u regulaciji oksidativnog stresa u ćeliji. Selenoprotein N (SelN) je veličine 70 kDa i takođe se nalazi u ER. Njegova funkcija je i dalje nepoznata, ali mutacije u genu dovode do distrofije mišića kičmenog stuba. Ovo je jedini selenoprotein kod koga je do sada utvrđeno da mutacije izaziva pojavu bolesti. Selenoprotein S (Sels) je membranski protein ER koji se povezuje sa procesima eliminacije pogrešno konfigurisanih proteina (Gromadzińska et al., 2008).

2.2.8 Uticaj selena na zdravlje

2.2.8.1 Selen i kardiovaskularne bolesti

Nedostatak selena u ishrani ljudi i životinja dovodi do pojave velikog broja patoloških stanja organizma. Jedno od njih je Kešanska bolest, endemska kardiomiopatija prisutna kod dece i žena u reproduktivnom periodu u pojedinim delovima Kine sa zemljištem siromašnim selenom. Istraživanja na miševima su pokazala da odsustvo selena u ishrani omogućava mutaciju koksaki B3 virusa do veoma virulentnog fenotipa koji izaziva kardiomiopatiju. To sugeriše na činjenicu da pojava Kešanske bolesti uključuje dva uzročnika, a to su nedostatak selena u ishrani i infekciju enterovirusima. Takođe, u nekim delovima Kine i Rusije koji imaju nizak sadržaj selena u zemljištu dolazi do pojave Kašin-Bekovog sindroma, endemske osteoatrofije (Rayman, 2000; Beck, 2003). Kao i u prethodnom slučaju, istraživanja su pokazala da nedostatak selena nije dovoljan da prouzrokuje pojavu ove bolesti, već da do pojave bolesti dolazi u slučaju zajedničkog nedostatka selena i joda (Neve, 1999). Nedostatak selena je identifikovan uglavnom kod ljudi koji naseljavaju geografska područja koja su poznata po zemljištu sa niskim sadržajem selena kao što su na primer područje bivše Jugoslavije, Poljska, Kina i Rusija (El-Ramady et al., 2015). Niska koncentracija selena u krvi kod ljudi se dovodi u vezu sa povećanom smrtnošću usled kardiovaskularnih oboljenja. To može biti odraz suboptimalne aktivnosti enzima glutation peroksidaza GPx4 u prevenciji oksidacije lipoproteina male molekulske mase koji se kasnije apsorbuju od strane

endotelnih ćelija i makrofaga u arterijskim krvnim sudovima (Brown i Arthur, 2001). Naime, selen kroz aktivnost GPx4 smanjuje broj fosfolipidnih hidroperoksida i estara holesterola vezanih za lipoproteine, i na taj način ne samo da smanjuje akumulaciju oksidovanih lipoproteina niske gustine i njihovo taloženje na zidovima arterija već i smanjuje agregaciju trombocita i aktivaciju monocita i makrofaga (García, 2013). U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da je smrtnost od bolesti srca u Finskoj smanjena u proseku za 61 % između 1972 godine i 1992 godine. Smatra se da je do značajne promene došlo zbog velikih promena u načinu života, smanjenja unosa masti i snižavanja šećera i holesterola u krvi. Postoji velika verovatnoća da je do smanjenja smrtnosti došlo i usled trostruko višeg unosa selena nastalog zbog korišćenja selenom obogaćenog đubriva od 1985. godine (Brown i Arthur, 2001).

2.2.8.2 Selen i imunološki sistem

Iako mehanizam dejstva još uvek nije utvrđen, dobro je poznata uloga selena u očuvanju imunološkog odgovora. Nedostatak selena dovodi do smanjenja broja T-ćelija i smanjenog odziva proliferacije limfocita. Progresivni pad selena u plazmi je prijavljen kod pacijenata koji imaju sidu, i približno je u korelaciji sa gubitkom T-ćelija ili stadijumom HIV infekcije.

Selen je možda presudan faktor kod osoba inficiranih HIV virusom, budući da je snažan inhibitor replikacije HIV virusa *in vitro* (Sappey et al., 1994). Sadržaj selena u plazmi može poslužiti kao pokazatelj ishoda bolesti kod HIV infekcije. Naime, Baum i saradnici (1997) su pokazali da pacijenti sa HIV-om koji imaju deficit selena ($< 85 \mu\text{g L}^{-1}$) imaju skoro 20 puta veće šanse da umru od uzročnika koji su u vezi sa HIV-om, nego oni kod kojih je status selena adekvatan. Takođe je utvrđeno da je sadržaj selena u plazmi značajniji faktor koji doprinosi smrtnosti nego što je to broj pomoćnih T ćelija (Th ćelije), i da predstavlja značajniji faktor rizika od bilo kog drugog nutrijenta čiji je uticaj istraživan (Baum et al., 1997). Selen takođe igra zaštitnu ulogu kod ljudi inficiranih hepatitis virusima, B i C, i to tako što sprečava napredovanje bolesti i pojavu raka jetre (Yu et al., 1999).

2.2.8.3 Selen i dijabetes

Iako unošenje selena u koncentraciji iznad preporučenog dnevnog unosa može dovesti do brojnih zdravstvenih poboljšanja, takođe je poznato da je koncentracija selena u telu viša kod ljudi koji imaju dijabetes nego kod zdravih ljudi (Wu et al., 2013). Istraživanja su pokazala da postoji povezanost između visokog sadržaja selena u serumu i povećanog rizika od dijabetesa (Bleys et al., 2007; Stranges et al., 2010).

2.2.8.4 Selen i reproduktivna funkcija

Selen igra značajnu ulogu u reprodoktivnoj funkciji i kod žena i kod muškaraca. Za pravilnu spermatogenezu značajna su dva selenoproteina: fosfolipidna hidroperoksidna intracelularna glutation peroksidaza (GPx4) i selenoprotein P (SePP). Selen se u testisima muškaraca nalazi uglavnom u obliku GPx4, mada je u testisima odraslih miševa identifikovan i enzim tireodoksin reduktaza. Selen se u velikim količinama može naći u spermatozoidima koji sazrevaju, dok im je ekspresija smanjena u zrelom semenu. Naučnici su razvili hipotezu da oba ova enzima formiraju sistem koji je u stanju da formira disulfidne mostove koji stabilizuju proteinsku strukturu semena (Rayman, 2011). Kod muškaraca GPx4 se nalazi u mitohondrijama koje se nalaze u srednjem omotaču repa spermatozoidea. U ranoj fazi spermatogeneze, GPx4 štiti spermatozoide od oksidativnog oštećenja, dok u kasnijoj fazi formira unakrsne veze sa srednjim omotačem i postaje strukturna komponenta mitohondrijalnog omotača koji okružuju flagelu spermatozoidea i koja je esencijalna za pokretljivost spermatozoidea (Ursini, 1999). Dokazano je da suplementacija selenom u količini od 100 µg dnevno dovodi do povećanja pokretljivosti spermatozoidea kod muškaraca sa smanjenom plodnošću, što je u 11 % slučajeva dovelo do ostvarivanja očinstva (Rayman, 2000). Međutim visoki unos selena u koncentraciji od 300 µg dnevno je doveo do smanjenja pokretljivosti spermatozoidea (Hawkes i Turek, 2001). Testovi na pacovima koje su sproveli Behne i saradnici ukazuju na mogući uticaj selena na biosintezu i izlučivanje testosterona. Oni su pokazali da se

u slučaju deficitarnog unosa selena, on se prvo transportuje do testisa pa tek onda do drugih tkiva (Behne et al., 1982; Behne et al., 1986).

Značajno niži status selena je zabeležen kod žena koje su imale spontani pobačaj u prvom trimestru i kod onih žena koje su imale više spontanih pobačaja, iako ovi podaci nisu konzistentni (Rayman, 2011).

2.2.8.5 Selen i autoimune bolesti štitne žlezde

Štitna žlezda ima najveću koncentraciju selena od svih tkiva. Uloga selena u štitnoj žlezdi je višestruka. U procesu nastanka T3 i T4 hormona od jodida i tireoglobulina dolazi do stvaranja vodonik peroksida, a selen u obliku GPx3 štiti ćelije štitne žlezde od njih (Rayman, 2012b). Ova funkcija selena je u skladu sa obrnutom korelacijom između statusa selena i obima štitne žlezde, oštećenja tkiva i pojave gušavosti kod Francuskinja i pozitivnom korelacijom između pojave raka štitne žlezde i niske koncentracije selena u serumu kod žena u Norveškoj (Glattre et al., 1989; Derumeaux et al., 2003). Selen zavisna jodtironin dejodinaza stvara aktivni tiroidni hormon, trijodtironin (T3) od neaktivnog prekursora T4 tiroksina (Rayman, 2012b). Selen je takođe efikasan kod autoimunog hipertiroidizma, tj. Bazadovljeve bolesti (Marcocci et al., 2011). Dobro je poznato da selen ima značajnu funkciju u regulaciji imunološkog sistema. Nedostatak selena se dovodi u vezu sa smanjenim imunološkim odgovorom, što je u korelaciji sa antioksidativnom ulogom selena. Hronična upala dovodi do uništavanja šitne žlezde i njene atrofije (Pešić i Radojković, 2015).

2.2.8.6 Selen i neurološke bolesti

U uslovima nedovoljnog unosa, prioritet snabdevanja selenom ima mozak, što ukazuje na veći broj uloga ovog mikroelementa u funkcionisanju nervnog sistema (Rayman, 2000). Uopšteno nivo selena u organizmu sa starenjem opada (Wu et al., 2013). Nizak sadržaj selena u plazmi kod starijih ljudi se dovodi u vezu sa senilnošću i ubrzanim opadanjem kognitivnih funkcija. Sadržaj selena u mozgu pacijenata sa Alchajmerovom bolesti je iznosio samo 60 % u odnosu na zdrave

pacijente (Rayman, 2000). Međutim, intreresantno je da nivo selena u organizmu stogodišnjaka očuvan, što ukazuje na pozitivnu vezu između ekspresije selenoproteina i dugovečnosti. Takođe, povećan nivo reaktivnih oblika kiseonika koji doprinose razvoju Parkinsonove i Alchajmerove bolesti može biti suzbijen antioksidativnim delovanjem selenoproteina, budući da je mozak deficitaran katalaza enzimom. Kao što je već pomenuto, selenoprotein P igra veoma značajnu ulogu u očuvanju normalne funkcije nervnih ćelija (Ramaekers et al., 1994; Wu et al., 2013).

2.2.8.7 Selen u prevenciji kancera

Među različitim antioksidativnim elementima, dokazano je da selen ima najveći uticaj kao profilaktičko sredstvo u borbi protiv raka. Nizak sadržaj selena u krvi i učestalost karcinogeneze su primećeni i u eksperimentima na životinjama i ljudima (García, 2013). Tačan antikancerogeni mehanizam dejstva selena na molekularnom nivou nije još uvek u potpunosti razjašnjen. Pretpostavlja se da selen svoju ulogu ostvaruje preko mehanizma antioksidativne odbrane, smanjujući oksidativni stres i oksidativno oštećenje DNK (Rayman, 2005). Drugi predloženi antikancerogeni mehanizam selena uključuje apoptozu odnosno smrt ćelije (Lü i Jiang, 2005). Subnormalni ukupni moždani sadržaj selena je otkriven kod 70 % pacijenata sa tumorom mozga. Suplementacija selenom u obliku natrijum selenita je dovela do smanjenja simptoma kao što su mučnina, povraćanje, poremećaji govora, glavobolje, nestabilnosti pri hodanju i to u 76 % slučajeva, pa je zaključeno da se selen može koristiti kao dodatak ostalim terapijama pri lečenju (Pakdaman, 1998).

2.2.9 Suplementi na bazi selena

Nedostatak selena u organizmu se može javiti kod: pacijenata sa smetnjama u funkcionisanju gastrointestinalnog trakta, pacijenata koji su na parenteralnoj ishrani, posle gastrointestinalne bajpas operacije, kod ljudi posle životne dobi od 90 godina i kod ljudi koji se hrane namirnicama koje potiču iz oblasti u kojoj je

zemljište siromašno selenom (Nagy et al., 2015). Procenjeno je da je prosečan dnevni unos selena u Srbiji 27 µg, što je ispod svih preporuka o potrebnom dnevnom unosu. U Tabeli 1 prikazane su procenjene vrednosti adekvatnog dnevnog unosa selena, u zavisnosti od starosne dobi i pola. Prema Maksimoviću i saradnicima (1992), stanovništvo Srbije najveći deo selena unosi putem mesa i ribe (41.92 %), mlečnih proizvoda (27.16 %) i žitarica (23.43 %). Iako se možda čini da unos selena u pojedinim delovima Evrope i SAD-a odgovara preporučenom unosu, sa stanovišta sprečavanja pojave bolesti to nije dovoljno (Rayman, 2000). Prilikom proizvodnje i puštanja u promet dijetetskih suplemenata na bazi selena, budući da je već spomenuta njegova dualna priroda, potrebno je voditi računa o određivanju tačne koncentracije selena u njima. U prošlosti su zabeleženi slučajevi trovanja selenom kao posledica unošenja dijetetskih suplemenata. U SAD-u se između 1983. i 1984. godine dogodio incident, kada je 13 osoba imalo toksične efekte trovanja selenom kao posledicu uzimanja dijetetskog suplementa koji je sadržao visok nivo selena što je bio rezultat greške u proizvodnji. U martu 1984. godine tablete dijetetskih suplemenata selena iz 39 objekata u 15 država SAD-a su povučene iz prodaje, jer je ustanovljeno da je sadržaj selena u svakoj tableti iznosio 27.3 mg što je bilo 182 puta više nego što je bilo označeno na pakovanju (Fan i Kizer, 1990). Takođe, nije dovoljno samo preporučiti optimalan dnevni unos ovog elementa da bi se očuvalo zdravlje, već je važan i oblik u kome se taj selen nalazi (Thiry et al., 2012). Biološka dostupnost kao i toksičnost selena zavisi ne samo od koncentracije u kojoj se unosi u organizam, već i od oblika u kome se on nalazi (Savić et al., 2012). Termin „biološka dostupnost“ se definiše kao frakcija komponenata koja se oslobađa iz matriksa u gastrointestinalnom traktu i postaje dostupna za intestinalnu apsorpciju, i može ući u krvotok (Lavu et al., 2016). Na tržištu u Srbiji su dostupni suplementi na bazi selena u neorganskom obliku, (seleniti) u obliku L-selenometionina (SeMet) i selenskog kvasca. Oligogal®-Selen je domaći proizvod, odnosno dijetetski suplement koji je prvobitno sadržao kvasac obogaćen selenom i kao takav bio zaštićen patentom (Vrvić i sar., 1988).

Tabela 1. Procena adekvatnog dnevnog unosa selena (Kipp et al., 2015).

Starost		Selen ($\mu\text{g dan}^{-1}$)	
		Muškarci	Žene
Odojčad	Od 0 do 4 meseca	10	
	Od 4 do 12 meseci	15	
Deca i adolescenti	Od 1 do 4 god.	15	
	Od 4 do 7 god.	20	
	Od 7 do 10 god.	30	
	Od 10 do 13 god.	45	
	Od 13 do 15 god.	60	
	Od 15 do 19 god.	70	60
Odrasli	Od 19 do 25 god.	70	60
	Od 25 do 51 god.	70	60
	Od 51 do 65 god.	70	60
	Preko 65 god.	70	60
Trudne žene		/	60
Žene u laktaciji		/	75

Danas se u tabletama Oligogal®-Selena nalazi neorganska so natrijum selenit. Razlike u obliku selena u dijetetskim suplementima utiču na apsorpciju i usvajanje u organizmu. Uglavnom su neorganske forme suplemenata manje efikasne u poređenju sa organskim, budući da se slabije apsorbuju od organskih i da su toksičnije od njih. Apsorpcija selena iz organskih izvora dostiže i do 90-95 %, dok je apsorpcija neorganskog selena znatno niža i iznosi oko 10 % (Navarro-Alarcon i Cabrera-Vique, 2008). Potrebno je reći i da biološka dostupnost selena raste kada je ishrana bogata niskomolekularnim proteinima, vitaminima, i to uglavnom A, C i E, a da opada ukoliko se ishranom unosi povećana koncentracija teških metala kao što su kadmijum, živa, olovo i arsen (Hurst et al., 2013). Selenometionin i selenocistein spadaju u organske oblike selena koji se ugrađuju u proteine biljaka i ljudi (Kubachka, 2017). Više od 60 jedinstvenih oblika selena je prijavljeno da postoji u

selenskom kvascu, s tim da je SeMet najzastupljeniji (Arnaudguilhem et al., 2012). Selenski kvasac za industrijsku upotrebu mora da sadrži više od 60 % selena u obliku selenometionina i manje od 2 % neorganskog selena od ukupnog sadržaja selena. Trenutna regulativa Agencije za hranu i lekove (FDA, Food and Drug Administration) vezano za aditive za hranu za životinje propisuje da sadržaj neorganskog selena mora biti manji od 2 % od ukupnog sadržaja selena (Selenium, 2015). Sadržaj neorganskog selena veći od 2 % od ukupnog sadržaja selena je indikacija slabijeg kvaliteta selenskog kvasca (Bierla et al., 2012). Najnovija istraživanja su pokazala da veliki broj dijetetskih suplemenata dostupnih na tržištu ne sadrži podatke o količini selena, ili ukoliko ga i sadrži, nije jasno u kom obliku je taj selen prisutan (Bakirdere et al., 2015; Niedzielski et al., 2016).

Razvoj dijetetskih suplemenata na bazi selena koji sadrže selen u obliku Se-metil-seleno-L-cisteina (MeSeCys) je takođe veoma značajan, budući da je ova selenoaminokiselina u srednjim do visokim mikromolarnim koncentracijama efikasno inhibira proliferaciju humanih oralnih skvamoznih ćelija karcinoma, ćelija karcinoma kolona i dojki. Dokumentovana je sposobnosti ove selenoaminokiseline da ubije ćelije raka, a poslednjih godina MeSeCys privlači pažnju zahvaljujući sposobnosti modulacije ćelijskih procesa vezanih za procese metastaze. Antiangiogeni efekat koji ova aminokiselina ispoljava, odgovoran je za inhibiciju rasta tumora, vaskularog sazrevanja i poboljšane distribucije antikancerskih lekova odnosno klašičnih hemoterapeutika, što dovodi do odličnog sinergističkog terapijskog dejstva *in vivo* (Fernandes i Gandin, 2015). MeSeCys je pronađen u nekim biljkama, belom luku, praziluku i brokoliju. Za razliku od SeMet, ova aminokiselina nije inkorporirana u proteine, a pokazano je da je znatno manje toksična u poređenju sa SeMet. Istraživanja na epitelnim ćelijama dojke miševa su ukazala na ključnu ulogu MeSeCys. Naime, da bi MeSeCys bio efikasan agens u borbi protiv raka potrebno je da se MeSeCys transformiše u metilselenol, što je moguće posredstvom enzimske aktivnosti β -liaze (Ip et al., 2000). Da bi MeSeCys bio efikasan, ćelija mora da sadrži ovaj enzim, a budući da je on prisutan u velikim količinama u mnogim tkivima, životinje imaju dovoljan kapacitet za konverziju MeSeCys u metilselenol (Whanger, 2004).

Na osnovu dosadašnjih raspoloživih informacija, na tržištu još uvek ne postoji dijetetski suplement na bazi selenocisteina (SeCys) (Kubacha et al., 2017). Prema podacima koje su prikupili Amoako i saradnici (2009) tržište dijetetskih suplemenata u Americi je u porastu, i od 18.8 milijardi dolara koliko je iznosilo u 2004. godini, do 2007. godine je poraslo na 20.3 milijarde.

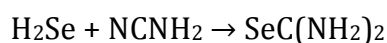
2.2.9.1 Neorganske soli seleno

U kontaktu sa vodom, selen dioksid (SeO_2 , Se^{+4}) formira slabu, selenastu kiselinu (H_2SeO_3), čija je konstanta disocijacije $\text{pK}_{a1}= 2.8$ a $\text{pK}_{a2}= 8.5$. Sa druge strane selen trioksid (SeO_3 , Se^{+6}) u kontaktu sa vodom formira znatno jaču ($\text{pK}_{a1}= -3$ i $\text{pK}_{a2}= 1.7$) selenovu kiselinu (H_2SeO_4). Soli selenaste kiseline (seleniti) i selenove kiseline (selenati) su rastvorljivi u vodi, s tim da su selenati rastvorljiviji od selenita (Barceloux, 1999).

2.2.9.2 Selenourea

Diamidi (urea, tiourea i selenourea) spadaju u važnu klasu jedinjenja. Deo su mnogih organskih jedinjenja i organometalnih kompleksa. Naime, diamidi imaju svojstvo da koordiniraju sa jonima metala preko atoma azota ili kiseonika (kod uree), sumpora (kod tiouree) i seleno kod uree. Ova svojstva su uočena kod metalnih kompleksa uree i tiouree (Loo et al., 1985). Selenourea i njeni derivati su obimno ispitivani kao potencijalni analozi sumpornih jedinjenja (Kronrad i Hladik, 1972). Selenourea [$\text{SeC}(\text{NH}_2)_2$] je organsko jedinjenje koje sadrži seleno u centralnom delu molekula (Danscher i Stoltenberg, 2006).

Svi postupci sinteze selenouree se zasnivaju na metodi koju je opisao Verneuli 1884. godine. Selenourea nastaje kada se vodonik selenid (H_2S) uvodi u vodeni rastvor cijanamida (NCNH_2) (Kronrad i Hladik, 1972).



Selenourea formira heterociklična jedinjenja od kojih neka, između ostalog, ispoljavaju antiinflamatornu i antitumornu aktivnost. Upotreba selenouree kao prekursora je najefikasniji način za sintezu heterocikličnih jedinjenja koja sadrže selen (Ninomiya et al., 2010). Istraživanja su pokazala da selenouree i tiouree efikasne u vezivanju superoksid radikala *in vitro* (Takahashi et al., 2005).

2.2.9.3 Selenski kvasac

Selenski kvasac je dijetetski suplement na bazi kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Budući da ovaj kvasac ima visok sadržaj proteina, može da inkorporira velike količine selena. Prednost korišćenja selenskog kvasca u odnosu na selenom obogaćene biljke je u tome što se sama proizvodnja selenskog kvasca lakše kontroliše. Uglavnom se u podlogu za gajenje dodaje natrijum selenit (Na_2SeO_3). Što više selena se doda u podlogu, rast kvasca je više inhibiran. Sa druge strane, dodatak veće koncentracije selena u podlogu dovodi do povećanja sadržaja selena u ćelijama kvasca (Ponce de León et al., 2002). Kontrola kvaliteta selenskog kvasca treba da obuhvati sledeće parametre: čistoća soja kvasca, procenat kovalentno vezanog selena, sadržaj vlage, nivo toksičnih nečistoća, sadržaj mikrobioloških kontaminanata koji zadovoljavaju zahtevane kriterijume čistoće (Rayman, 2004). Selenski kvasac može da inkorporira i do 3000 μg Se po gramu suve mase, i to uglavnom u obliku selenometionina koji se ugrađuje u proteine ili vezuje za makromolekule ćelijskog zida (Połatajko et al., 2004). Podaci o toksičnosti selenskog kvasca su oskudni. Ispitivanja na laboratoriskim pacovima su pokazala da letalna doza (LD_{50} vrednost) za selenski kvasac iznosi 37.3 mg kg^{-1} telesne mase. Poređenjem sa Na_2SeO_3 kod koga je ta vrednost 5 mg kg^{-1} , može se zaključiti da selenski kvasac ispoljava znatno nižu toksičnost. Istraživanja uticaja ovog izvora selena na ljudima su još uvek u povelju (Dumont i Cornelis, 2006). Na našem tržištu postoji veliki broj suplemenata na bazi selena među kojima je i Sel-Plex®, komercijalni netoksični selenom obogaćeni kvasac *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 (Alltech Inc., Lexington, SAD), koji sadrži organski vezan selen i ima odobrenje od strane Evropske komisije za upotrebu kao aditiva u stočnoj hrani (EC

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

L330/11, 2006). Ukupan sadržaj selena u Sel-Plex®-u 2000-2400 mg Se kg⁻¹, od čega 97-99 % pripada organskom selenu. Sadržaj selenometionina je 63 % a sadržaj niskomolekularnih komponenata selena je između 34 i 36 % (EFSA, 2014).

3. CILJEVI

Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da gljive imaju veliki medicinski značaj. Gljiva *Coriolus versicolor* spada u grupu medicinskih gljiva čije su lekovite karakteristike potvrđene opsežnim istraživanjima. Na tržištu već postoje komercijalni preparati izolovani iz micelijuma ove gljive, na bazi biološki aktivnih polisaharida i polisaharopeptida, što otvara put razvoju novih dijetetskih suplemenata. Budući da gljive poseduju veliki potencijal za usvajanje mikroelemenata iz podloge na kojoj rastu, ova karakteristika je iskorišćena za proizvodnju selenom obogaćene gljive *C. versicolor*. Kako su do sada rađena istraživanja koja ukazuju na prisustvo komponenata koje poseduju antimikrobna i antioksidativna svojstva, interesantno je ispitati kako prisustvo selena utiče na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost ekstrakata obogaćenih plodonosnih tela i micelije gljive.

Na osnovu svega prethodno rečenog postavljeni su sledeći ciljevi ove doktorske disertacije:

1. Gajenje gljive *Coriolus versicolor*

- Dobijanje plodonosnih tela gljive gajenjem na čvrstom supstratu, odnosno mešavini slame, hrastove piljevine i pšeničnih mekinja sa dodatkom organskih i neorganskih izvora selena.
- Proizvodnja micelijuma gljive submerznim gajenjem, odnosno gajenje gljive u tečnoj mineralnoj podlozi sa glukozom kao glavnim izvorom ugljenika i dodatkom organskih i neorganskih izvora selena.

Kao organski izvor selena korišćeni su selenourea i Sel-Plex®, komercijalni netoksični preparat, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060. Kao neorganski izvori selena korišćeni su natrijum selenat (Na_2SeO_4) i natrijum selenit (Na_2SeO_3).

Dodatno u odnosu na plan predviđen prijavom disertacije, konstruisan je šaržni bioreaktor sa mehaničkim mešanjem i postavljen je cilj da se odredi optimalno vreme trajanja submerzne fermentacije gljive, praćenjem potrošnje glukoze (HPLC metodom) tokom rasta kontrolnog uzorka, i da se utvrdi uticaj

dotatih izvora selena na morfologiju rasta gljive snimanjem na svetlosnom i skenirajućem elektronskom mikroskopu.

- U cilju određivanja biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* potrebno je osušiti dobijena plodonosna tela i micelijum gljive, pretvoriti ih u prah i pripremiti metanolne ekstrakte od od njih.

2. Kvalitativna i kvantitativna analiza dobijenih uzoraka.

- Postavljen je cilj da se odredi sadržaj selena u dobijenim plodonosnim telima, micelijumu, kao i metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor* upotrebom optičkog emisionog spektrometra sa indukovano spregnutom plazmom (ICP-OES).
- Radi dobijanja rezultata koji bliže određuju potencijalnu primenu selenom obogaćene gljive *C. versicolor* kao dijetetskih suplemenata na bazi selena, određen je cilj da se izvrši kvalitativna i kvantitativna analiza aminokiselinskog sastava selenom obogaćenih plodonosnih tela i micelijuma HPLC metodom, sa naglaskom na L-selenometionin i S-metil-seleno-L-cistein.
- Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata

U cilju dobijanja informacija o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu uzoraka, određen je cilj da se metanolni ekstrakti podvrgnu FTIR analizi, da se utvrdi ukupan sadržaj polisaharida, sadržaj glukana (ukupnih, β i α), proteina, lipida i fenolnih jedinjenja. Takođe, određen je cilj da se analizira monosaharidni sastav ekstrakata HPLC metodom.

3. Određivanje biološke aktivnosti dobijenih metanolnih ekstrakata

- Da bi se utvrdio uticaj dodatog selena u podlogu za gajenje gljive *C. versicolor* na antimikrobna svojstva njenih metanolnih ekstrakata, postavljen je cilj da se analizira antimikrobna aktivnost ekstrakata u odnosu na ATCC kulture bakterija i kvasaca, utvrde minimalne inhibitorne koncentracije uzoraka, i uticaj ekstrakata na mikroorganizme predstavi pomoću krivih rasta.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

- Da bi se odredio uticaj dodatka selena u podlogu za gajenje gljive postavljen je cilj da se izvrši analiza antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata gljive *in vitro* na osnovu četiri različite metode:
 - sposobnost vezivanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala.
 - sposobnost heliranja jona gvožđa (Fe^{2+}).
 - sposobnost redukcije jona gvožđa (Fe^{3+}).
 - antioksidativna aktivnosti metanolnih ekstrakata u model sistemu linoleinske kiseline.

4. MATERIJAL I METODE

4.1 Gajenje gljive *Coriolus versicolor*

4.1.1 Jedinjenja upotrebljena za obogaćenje supstrata za gajenje gljive

Za dobijanje selenom obogaćenih uzoraka gljive *C. versicolor* (plodonosnih tela i micelijuma) upotrebljeni su različiti izvori selena, i to dva organska i dva neorganska. Kao organski izvori korišćeni su selenski kvasac Sel-Plex®, komercijalni netoksični preparat, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060, (Alltech Inc., Lexington, SAD) koji sadrži organski vezan selen u obliku selenometionina, i selenourea (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD) (EC L330/11, 2006). Kao neorganski izvori korišćeni su natrijum selenit, Na₂SeO₃ i natrijum selenat, Na₂SeO₄ (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD).

4.1.2 Gajenje gljive *C. versicolor* na čvrstoj podlozi

Gljiva *C. versicolor* (*Trametes versicolor* (L.: Fr) Lloyd, 1920.) iz kolekcije Katedre za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, je korišćena u ovoj disertaciji. Inokulum za zasejavanje pšenice je pripremljen zasejavanjem čiste kulture gljive na sladnom agaru (HiMedia, Indija), predhodno izlivenom u petri kutije i inkubiranjem 7 dana na 25 ± 2 °C, do potpunog prorastanja. Nakon toga, pripremljen je micelijum u teglama na zrnima pšenice za zasevanje čvrstog supstrata. Zrna pšenice su skuvana u destilovanoj vodi, pH vrednost je podešena na između 6 i 6.5 dodavanjem CaCO₃ i u svaku teglu je dodato po 200 g pšenice. Tegle su sterilisane na temperaturi od 121 °C u trajanju od 2 h, ohlađene i zasejane pod sterilnim uslovima inokulumom dobijenim na sladnom agaru. Inkubacija je nastavljena pod istim uslovima narednih 20 do 30 dana, do potpunog obavijanja zrna micelijumom. Kao supstrat za dobijanje plodonosnih tela gljive upotrebljena je mešavina pšenične slame, hrastove pljevine i pšeničnih mekinja u odnosu 5:3:2 (Klaus et al., 2009). Supstrat je navlažen vodom

do 70 % vlage, i napunjen u plastične, polipropilenske kese (Mycelia, Sac O2, Microsac, Belgija) koje su potom zatvorene čepom od celulozne vate. Ukupna masa supstrata iznosila je 2 kg. Supstrat je obogaćen selenom tako što je odgovarajuće jedinjenje rastvoreno u vodi koja je korišćena za vlaženje supstrata. Sel-Plex® je dodat direktno u džakove u kojima je i izvršeno mešanje. Jedinjenja su dodata u tri koncentracije: 10 mg Se kg⁻¹, 25 mg Se kg⁻¹ i 50 mg Se kg⁻¹, računato na suhu masu supstrata. Kontrolni uzorci su pripremljeni bez dodatka selena. Nakon pripreme, džakovi su sterilisani na temperaturi od 121 °C u trajanju od 2 h, ohlađeni i zasejani micelijumom pripremljenim na zrnima pšenice. Prorastanje džakova je obavljeno u mraku na temperaturi od 25 ± 2 °C tokom 20 dana. Fruktifikacija je sprovedena u industrijskom gajilištu u kontrolisanim uslovima temperature, vlage i strujanja vazduha. Dobijena plodonosna tela su osušena na 40 °C, sprášena i upotrebljena za dalju analizu (Klaus et al., 2009). Utvrđen je prinos suve mase merenjem biomase gljiva nakon sušenja. Svi uzorci su odgajeni u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.1.3 Submerzno gajenje gljive *C. versicolor*

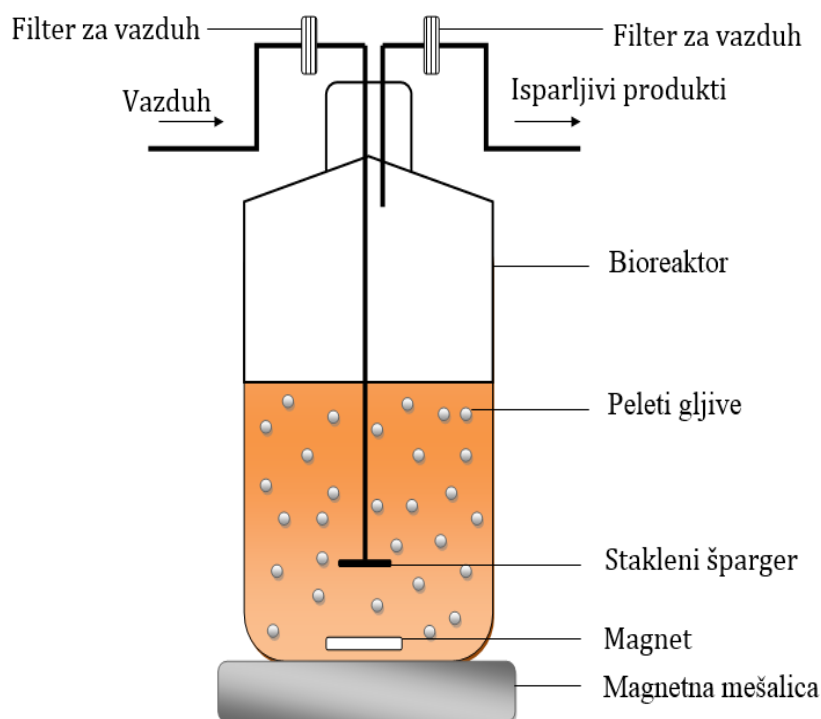
4.1.3.1 Priprema inokuluma

Čista kultura gljive *C. versicolor* je odgajena na sladnom agaru kao što je prethodno opisano. Isečeni su diskovi agara (prečnika 10 mm) proraslog micelijumom pomoću kork-a Br. 5 i prebačeni u sterilnu, tečnu hranljivu podlogu u cilju pripreme inokuluma za zasejavanje bioreaktora. Hranljiva podloga za gajenje gljive se sastojala od: 4.0 % glukoze, 0.15 % peptona (HiMedia, Indija), 0.15 % KH₂PO₄ i 0.15 % MgSO₄·7H₂O (Yang et al., 2012). Gljiva je gajena u Erlenmajerovim tikvicama zapremine 500 mL. Zapremina podloge iznosila je 100 mL, kultura je odgajena na inkubator šejkeru, model SI 600R (Jeio Tech, Koreja) uz 135 obrtaja u minuti na 25 °C (Yang et al., 2012). Nakon pet dana, dobijena biomasa (peleti) je homogenizovana pomoću laboratorijskog blendera pod sterilnim uslovima, izdvojena centrifugiranjem na 5000 g (Eppendorf 5804 R, Hamburg, Nemačka) u

trajanju od deset minuta, isprana destilovanom vodom nekoliko puta i upotrebljena kao inokulum za zasejavanje bioreaktora.

4.1.3.2 Šaržna fermentacija u bioreaktoru

Šaržna fermentacija je izvedena u podlozi istog sastava kao i ona u kojoj je pripremljen inokulum za kontrolni uzorak. Za uzorke obogaćene selenom, selenourea natrijum selenit i natrijum selenat su dodati nakon sterilizacije podloge, dok je kvasac dodat pre sterilizacije (Turlo et al., 2007). Svi oblici selena su dodati u koncentraciji od 25 mg mL⁻¹. Šema šaržnog bioreaktora sa mehaničkim mešanjem ukupne zapremine 2 L je prikazana na Slici 2.



Slika 2. Konstrukcija šaržnog bioreaktora.

Kultura je snabdevana vazduhom pomoću kompresora koji je usmeravao vazduh kroz stakleni šparger. Pritisak vazduha na ulasku u sistem je iznosio 67 mm Hg, a da bi se obezbedila sterilnost, na ulasku vazduha u sistem postavljen je celulozno acetatni filter za špic promera 0.22 µm. Ceo sistem je postavljen na

magnetnu mešalicu (Hot Plate Stirrer T-14 (Lab Companion, Koreja)) da bi se omogućilo konstantno mešanje i ravnomerno snabdevanje kulture vazduhom. Za zasejavanje bioreaktora upotrebljeno je 5 % w/v inokuluma. Fermentacija je obavljena pod sledećim uslovima: radna zapremina 1.5 L, temperatura 25 ± 2 °C, stopa aeracije 1 vvm, brzina mešanja 150 obrtaja u minuti. Nakon osam dana, biomasa je izolovana i liofilizovana do upotrebe (Duvnjak et al., 2016).

4.1.4 Određivanje prinosa biomase i promene pH tokom submerznog gajenja gljive *C. versicolor*

U cilju određivanja prinosa biomase, na svakih 24 h iz tri različita bioreaktora uzeto je po 10 mL fermentacionog medijuma i profiltrirano kroz Whatman No. 1 filter papir. Dobijeni bujon je korišćen za određivanje sadržaja glukoze i merenje pH vrednosti (pH metar Crison, Španija). Prinos biomase je izmeren i izražen u gramima suve mase po litru fermentacionog bujona (g SM L^{-1}) (Kim i et al., 2005). Dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

4.1.5 Kvantitativno određivanje potrošnje glukoze HPLC metodom

Za određivanje sadržaja glukoze u fermentacionom medijumu nakon gajenja korišćen je Dionex Ultimate 3000 Thermo Scientific (Waltham, SAD) HPLC sistem. Upotrebljena je kolona za ugljene hidrate (Hyper REZ XP Carbohydrate Ca^{2+} , 300 mm \times 7.7 mm, 8 μm) zagrejana na 80 °C. Kao mobilna faza korišćena je voda a protok je podešen na 0.6 mL min^{-1} tokom analize. Detekcija je izvršena pomoću RI detektora (RefratcoMax 520, ERC, Nemačka). Svi dobijeni podaci su obrađeni pomoću Chromeleon Softvera. Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a rezultat je izražen kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (Carević et al., 2015).

4.1.6 Mikroskopska analiza micelije gljive *C. versicolor*

Micelija gljive *Coriolus versicolor* je snimljena pomoću Leica DMLS mikroskopa (Leica, Nemačka) opremljenog DC 300 digitalnom kamerom (Leica, Nemačka) i Leica IM 1000 softverom (Leica, Nemačka).

4.1.7 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) micelije gljive *C. versicolor*

Analiza mikrostrukture dobijene micelije i prisustva egzopolisaharida na površini micelijuma je ispitana pomoću JEOL JSM-6390LV skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Analizi je prethodila priprema uzorka nanošenjem čestica zlata pomoću Baltec scd 005 pribora za nanošenje. Uzorci su prethodno liofilizovani (1-4 LSC plus, Christ Alpha, Nemačka).

4.2 Priprema metanolnih ekstrakata gljive *Coriolus versicolor*

Dobijeni uzorci biomase micelijuma dobijenog submerznim gajenjem su prethodno liofilizovani. Glavno sušenje je sprovedeno na temperaturi od -30 °C i pritisku od 0.37 mbara u trajanju od 23 h, a finalno na temperaturi od -76 °C, pritisku od 0.001 mbara u trajanju od 3 h. Plodonosna tela gljive dobijena gajenjem na čvrstom supstratu su osušena u sušnici (Ecocell, LSIS-B2V/EC 111, MMM GmbH, Nemačka) na 40 °C do konstantne mase. Liofilizovani ili osušeni i sprašeni uzorci su podvrgnuti metanolnoj ekstrakciji pod sledećim uslovima: 5 grama biomase micelijuma ili 10 g biomase plodonosnih tela je ekstrahovano u 150 mL metanola na šejkeru na 25 °C pri brzini obrtaja od 100 obrt. min⁻¹ tokom 24 h. Dobijena tečnost je filtrirana kroz Whatman No. 4 filter papir, a ostatak je reekstrahovan još dva puta pod istim uslovima. Dobijena tečnost je sjedinjena i uparena do suva pod sniženim pritiskom u vakuum uparivaču (Buchi, Švajcarska). Određen je prinos ekstrakta iz razlike mase praznog balona za uparavanje i mase balona sa uparenim uzorkom (Barros et al., 2007).

4.3 Kvantitativna i kvalitativna analiza plodonosnih tela i micelijuma gljive *Coriolus versicolor*

4.3.1 Određivanje sadržaja selena u dobijenim uzorcima

Sadržaj ukupnog selena u uzorcima plodonosnih tela, micelijuma i metanolnih ekstrakata određen je upotrebom optičkog emisijonog spektrometra sa indukovano-spregnutom plazmom (ICP-OES sistem Thermo iCAP 6500 Duo, Thermo Fisher Scientific, Kembridž, Velika Britanija). Za kiselinsku digestiju korišćen je zatvoren sistem mikrotalasne pećnice „Berghof MWS-3+”. Uzorci koji su prethodno osušeni i usitnjeni (300 mg) digestovani su u teflonskim kivetama uz dodatak 6 mL koncentrovane HNO₃ (65 %) i 2 mL H₂O₂ (30 %). Digestija u sistemu mikrotalasne pećnice podešena je na sledeće uslove: 160 °C u trajanju od 5 minuta, 5 minuta na 190 °C i još 25 minuta na 210 °C. Snaga mikrotalasa u svakoj fazi bila je do 80 %. Za pripremu reagenasa, standarda i uzoraka korišćena je ultra čista voda provodljivosti 0.55 μS cm⁻¹, tj. otporljivosti 18.2 MΩcm na 25 °C. Nakon digestije i hlađenja, uzorci su kvantitativo preneti u normalni sud od 25 mL i razblaženi ultra čistom vodom do crte. Slepa proba je pripremljena na isti način kao i uzorak, ali bez dodatka uzorka. Apsorbansa je očitana na 196.06 nm. Standardna kriva je konstruisana upotrebom standardnog rastvora selena (J.T.Baker, SAD). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.3.2 Analiza aminokiselinskog sastava dobijenih uzoraka micelije i plodonosnih tela gljive *C. versicolor*

4.3.2.1 Određivanje ukupnog aminokiselinskog sastava i sadržaja L-selenometionina u uzorcima plodonosnih tela i micelijuma gljive *C. versicolor*

Uzorci plodonosnih tela i micelijuma su podvrgnuti hidrolizi u cilju određivanja aminokiselinskog sastava. Naime, 20 mg uzorka je izmereno u

staklenim ampulama kojima je dodato 3 mL 5M NaOH (Fluka Analytical) u slučaju bazne hidrolize za određivanje sadržaja metionina i selenometionina, ili 2 mL 6M HCl (kisela hidroliza) za određivanje ukupnog aminokiselinskog sastava. Ampule su zapečaćene i podvrgnute hidrolizi na temperaturi od 110 °C tokom 16 h. Nakon hidrolize i hlađenja, uzorci su kvantitativno prenešeni u normalne sudove gde im je podešena pH vrednost na 9 u slučaju bazne hidrolize, odnosno 7 u slučaju kisele hidrolize. Kao pH indikatori korišćene su indikator trake proizvođača Merck, Nemačka i proizvođača Macherey-Nagel GmbH i Co. KG, Nemačka, sa opsegom merenja od 4.0 do 7.0 i od 4.5 do 10.0. Uzorci su zatim razblaženi vodom HPLC čistoće 25 puta i filtrirani kroz CHROMAFIL® filter za špric promera pora 0.45 µm (Macherey-Nagel GmbH i Co. KG, Nemačka). Pre analize izvršena je derivatizacija u autosempleru pomoću ortoftaldehidnog (OPA) reagensa (50 mg OPA, 50 µL β-merkaptioetanol, 0.5 mL boratnog pufera pH 9.5 i 4.5 mL metanola). U 230 µL uzorka je dodato 100 µL boratnog pufera, 50 µL OPA reagensa i 20 µL 0.75 M HCl. Uzorak je promešan i 20 µL je injektovano u uređaj. Analiza je rađena na Shimadzu NEXERA UHPLC sistemu sa LC-30AD pumpama, SIL-30AC autosemplerom, diodnim detektorom SPD-M20A i CBM-20A kontrolorom. Za analizu je upotrebljena Supelcosil LC-18-DB kolona (5 µm čestica, 25 cm x 4.6 mm) proizvođača Supelco. Mobilna faza je bila faza A (50 mM Na(CH₃COOH) pufer kome je dodato 0.1 % acetonitrila (CH₃CN) pH 7.2) i faza B (metanol). Upotrebljeni gradijent je bio: 0-25 min 25 % B, 32-37 min 63 % B i 42-44 min 100 % B. Brzina protoka je podešena na 1.1 mL min⁻¹, uz zagrevanje kolone na 32 °C. Talasna dužina za analizu je podešena na 338 nm.

Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je aminokiselinski standard (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD), koncentracije 2.5 µmol mL⁻¹. Standard predstavlja mešavinu 15 aminokiselina i to: L-asparaginske kiseline, L-glutaminske kiseline, L-serina, L-histidina, L-glicina, L-triptofana, L-arginina, L-alanina, L-tirozina, L-metionina, L-valina, L-fenilalanina, L-izoleucina, L-leucina, L-lizina. Za konstruisanje krive pripremljene su koncentracije standarda u opsegu od 0.1 do 0.0625 µmol mL⁻¹. Standarni rastvor selenometionina koncentracije 10 µmol mL⁻¹ od koga su pripremljena razređenja u opsegu od 0.1-0.0004 µmol mL⁻¹ korišćen je

za određivanje sadržaja L-selenometionina. Sve upotrebljene hemikalije su HPLC čistoće (Turlo et al., 2007; Malinowska et al., 2009). Uzorci su analizirani u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Sadržaj selena usvojenog u obliku L-selenometionina izračunat je pomoću formule:

$$m_{Se(SeMet)} = \frac{m_{SeMet} \times Ar_{Se}}{Mr_{SeMet}}, \text{ gde je:}$$

$m_{Se(SeMet)}$ - sadržaj usvojenog selena ($\mu\text{g g}^{-1}$) u obliku SeMet,

m_{SeMet} - sadržaj SeMet ($\mu\text{g g}^{-1}$) određen HPLC analizom,

Ar_{Se} - relativna atomska masa Se (g mol^{-1}),

Mr_{SeMet} - relativna molekulska masa SeMet (g mol^{-1}).

Procenat selena usvojenog u obliku L-selenometionina od ukupno usvojenog selena izračunat je prema formuli:

$$\% Se_{(SeMet)} = \frac{m_{Se(SeMet)} \times 100}{Se_{(Total)}}, \text{ gde je:}$$

$\% Se_{(SeMet)}$ - procenat selena usvojenog u obliku SeMet od ukupno usvojenog selena,

$m_{Se(SeMet)}$ - sadržaj usvojenog selena u obliku SeMet ($\mu\text{g g}^{-1}$) određen HPLC analizom,

$Se_{(Total)}$ - ukupan sadržaj selena ($\mu\text{g g}^{-1}$) određen ICP-OES analizom.

4.3.2.2 Određivanje sadržaja Se-metil-seleno-L-cisteina u uzorcima micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*

Za analizu sadržaja seleno-metil-seleno-L-cisteina primenjena je metoda prema Klimaszewska i saradnicima (2016), sa manjim modifikacijama. U staklene ampule je izmereno 75 mg liofilizovane biomase gljive. Nakon toga dodato je 4 mL 50 mM rastvora HCl i uzorci su podvrgnuti ekstrakciji u trajanju od 6 h na magnetnoj mešalici u ledenom vodenom kupatilu na temperaturi od 4 °C. Nakon tog vremena, ekstrakcija je nastavljena narednih 19 h u frižideru na 4 °C bez

mešanja. Uzorci su potom filtrirani pod vakuumom i kvantitativno prenešeni u normalne sudove zapremine 10 mL gde su neutralisani upotrebom 1M NaOH. Nakon neutralizacije, normalni sudovi su dopunjeni vodom HPLC čistoće do crte, i uzorci su filtrirani kroz CHROMAFIL® filter veličine pora 0.45 µm, ø 25 mm (Macherey-Nagel GmbH i Co. KG). Uzorci su zamrznuti u plasičnim eppendorf kivetama do analize. Pre analize, izvršena je derivatizacija uzoraka u autsempleru na isti način kao i kod analize selenometionina i ukupnih aminokiselina. Tehnika derivatizacije podrazumeva reakciju dodavanja neke grupe analitu (hromofore, fluorofore ili redoks grupe) odnosno obeležavanja analita, koja omogućava detekciju supstance od interesa na HPLC-u, a takođe se koristi i radi povećanja selektivnosti i senzitivnosti analize (White, 1984). Za konstruisanje standardne krive, pripremljen je standardni rastvor Se-metil-seleno-L-cisteina (Fluka Analytical) u opsegu koncentracija 10-0.0195 mg mL⁻¹. Uzorci su analizirani na istom uređaju i pod istim uslovima kao i kod određivanja ukupnih aminokiselina i L-selenometionina, u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4 Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma gljive *Coriolus versicolor*

4.4.1 FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

FTIR spektri metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* su snimljeni pomoću ATR-FTIR spektrometra IRAffinity-1 (Schimadzu, Japan). Sva merenja su izvedena u spektralnom opsegu od 4000–600 cm⁻¹ sa rezolucijom od 4 cm⁻¹.

4.4.2 Kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

4.4.2.1 Određivanje sadržaja ukupnih polisaharida u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

Sadržaj ukupnih polisaharida u metanolnim ekstraktima određen je spektrofotometrijski, fenol-sumpornom metodom (DuBois et al., 1956). Uzorci su

rastvoreni u metanolu do koncentracije od 25 mg mL⁻¹. Uzeto je 400 µL uzorka kome je dodatata ista zapremina 5 % (w/v) rastvora fenola, a zatim i 2 mL 96 % (w/v) sumporne kiseline. Tokom dodavanja sumporne kiseline vođeno je računa da kiselina ne dodiruje zidove epruvete. Smeša je ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je izvršeno snažno mešanje na vorteksu. Nakon 20 minuta na 30 °C očitana je apsorbance na talasnoj dužini od 490 nm na spektrofotometru UV-VIS 1800 (Shimadzu, Japan). Slepa proba je pripremljena na isti način, osim što je umesto uzorka u epruvetu odmereno 400 µL mentanola. Standardna kriva je konstruisana merenjem apsorbance serije razređenja D (+) glukoze (Sigma-Aldrich, SAD) koncentracije od 0.0156 mg mL⁻¹ do 0.125 mg mL⁻¹. Analiza je izvršena u tri ponavljanja (n=3) a rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.2.2 Određivanje sadržaja ukupnih, α- i β-glukana u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

Sadržaj glukana u metanolnim ekstraktima određen je pomoću enzimskog kita Yeast and Mushroom β-glucan Assay Kit (Megazyme Int., Wicklow, Irska) prema uputstvima proizvođača. Komponente kita su: egzo-1,3-β-glukanaza, β-glukozidaza, amiloglukozidaza, invertaza, reagens za determinaciju glukoze (GOPOD-glukoza oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) i standardni rastvor glukoze.

Sadržaj ukupnih glukana određen je prema sledećem postupku: odmereno je 50 mg svakog uzorka metanolnog ekstrakta u staklenim epruvetama sa navojem i hidrolizovano pomoću 750 µL 37 % v/v hlorovodonične kiseline. Nakon dodavanja kiseline uzorci su dobro promešani i razblaženi dodatkom 5 mL destilovane vode. Uzorci su preneti u ključalo vodeno kupatilo i inkubirani 2 h. Nakon hidrolize izvršena je neutralizacija pomoću 2M KOH. Dobijeni sadržaj je kvantitativno prebačen u normalne sudove zapremine 50 mL koji su dopunjeni 200 mM acetatnim puferom pH=5.0. Uzorci su centrifugirani (3000 obr. min⁻¹, 15 minuta), uzeto je 100 µL supernatanta kome je dodato 100 µL mešavine enzima: egzo-1,3-β-D-glukanaze i β-glukozidaze. Uzorci su vorteksirani i inkubirani 60

minuta na 40 °C, a zatim im je dodat reagens za determinaciju glukoze. Inkubacija je nastavljena još 20 minuta na istoj temperaturi i nakon toga je očitana apsorbanca na 510 nm na spektrofotometru UV-VIS 1800 (Shimadzu, Japan). Slepa proba je pripremljena tako što je u epruvetu dodato 200 µL acetatnog pufera pH=5.0 i njemu je dodato 3 mL GOPOD-a, bez zagrevanja. Standard je pripremljen odmeravanjem 100 µL D-glukoze koncentracije 1 mg mL⁻¹ i dodavanjem iste zapremine acetatnog pufera pH=5.0 i 3 mL GOPOD-a, takođe bez zagrevanja.

Sadržaj α -glukana je određen na sledeći način: uzorci su odmereni u staklenim epruvetama (50 mg) i u svaku je stavljen mali magnet. Zatim je odmeren 1 mL 2M KOH, epruvete su zatvorene i prebačene na ledeno kupatilo gde su uzorci mešani 20 minuta na magnetnoj mešalici. Nakon toga, svakom uzorku je dodato po 4 mL 1.2 M natrijum acetatnog pufera pH=3.8, uzorci su snažno promešani. Izvršena je hidroliza dodatkom 100 µL mešavine enzima amiloglukozidaze i invertaze. Uzorci su prebačeni na vodeno kupatilo (30 min., 40 °C) i povremeno su promešani. Za određivanje sadržaja α -glukana u uzorcima egzopolisaharida sadržaj epruvete je kvantitativno prebačen u normalni sud od 50 mL koji je dopunjen destilovanom vodom do crte. Uzeto je 100 µL svakog uzorka, prebačeno u epruvetu i dodato je 100 µL 200 mM natrijum acetatnog pufera pH=5.0 i 3 mL GOPOD-a i uzorci su inkubirani na 40 °C, tokom 20 minuta. Apsorbanca je očitana na 510 nm.

Sadržaj β -glukana određen je iz razlike sadržaja ukupnih glukana i α -glukana. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja. Rezultat je izražen kao mg α , β ili ukupnih glukana po gramu suve mase ekstrakta \pm standardna devijacija.

4.4.2.3 HPLC analiza monosaharidnog sastava metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

Analiza monosaharidnog sastava metanolnih ekstrakata urađena je prema proceduri koju su opisali Malinowska i saradnici (2009). Izmereno je 25 mg uzorka u staklenim ampulama i dodato 4 mL 2M trifluorosirćetne kiseline (TFA), Sigma Aldrich. Ampule su zapečaćene i uzorci su podvrgnuti hidrolizi na temperaturi od 70 °C u trajanju od 2 h. Nakon hlađenja, sadržaj je kvantitativno prebačen u balon

za uparavanje, i TFA je uparena na temperaturi od 60 °C pod vakuumom. Voda je dodavana u uzorak i uparavana sve dok pH nije dostigla vrednost 7. Nakon potpunog uklanjanja trifluorosirćetne kiseline, uzorci su kvantitativno prebačeni u normalne sudove zapremine 10 ml. Nakon hidrolize, izvršena je derivatizacija dobijenih hidrolizata. U 120 µL uzorka je dodato 150 µL 0.5 M metanolnog rastvora 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona (PMP) proizvođača Sigma Aldrich i 30 µL 1.5 M NaOH. Smeša je inkubirana 2 h na temperaturi od 70 °C u vodenom kupatilu, a uzorci su obloženi aluminijumskom folijom da bi se uzorak zaštitio od svetlosti. Nakon hlađenja, a da bi se neutralisala baza, u svaki uzorak je dodato 100 µL 0.5 M HCl-a. Da bi se uklonio PMP, dobijeni rastvor je ekstrahovan pet puta intenzivnim mešanjem sa po 1 mL hloroforma (ChemPur, Nemačka). Vodena faza je podvrgnuta analizi na HPLC-u. Sadržaj svakog monosaharida pojedinačno je određen pomoću standardne krive koja je kontruisana propuštanjem mešavine standarda monosaharida. Korišćen je standard kao mešavina: D-ksiloze, D-riboze, D-arabinoze, D-manoze, D-fukoze, D-galaktoze, D-ramnoze, D-glukoze, D-glukozamina, D-galaktozamina. Koncentracija korišćenih standarda je bila u opsegu od 40.5 do 0.64 µg mL⁻¹ za heksoze i od 33.75 do 0.53 µg mL⁻¹ za pentoze.

Monosaharidni sastav je određen korišćenjem Shimadzu HPLC-a (Japan) sa LC-10 Atvp pumpom, SCL-10 Avp kontrolorom, UV SPD-10 Avp UV detektorom i RF-10AxL fluorescentnim detektorom. Uzorci su propušteni kroz Luna C-18 (2) kolonu dimenzije 250 x 4.6 mm, 5 µm veličine pora (Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD) sa brzinom protoka od 1.0 mL min⁻¹ i UV detekcijom na 245 nm. Kao mobilna faza korišćen je 0.1 M fosfatni pufer (pH 7.2) sa 10 % acetonitrila (pufer A) i 25% acetonitrila (pufer B). Za razdvajanje monosaharida upotrebljen je linearni gradijent pufera B: 0 % u nultom minutu, zatim 20 % od 10-og minuta i 100 % od 50-og do 55-og minuta. Injekciona zapremina bila je 50 µL, a temperatura kolone 25 °C.

4.4.2.4 Određivanje sadržaja ukupnih proteina u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

Sadržaj ukupnih proteina u metanolnim ekstraktima micelijuma i plodonosnih tela gljive *C. versicolor* određen je spektrofotometrijski, metodom po Bradfordu (1976). Pripremljeni su uzorci koncentracije 20 mg mL⁻¹ rastvaranjem u metanolu. Zatim je pripremljen Bradfordov reagens rastvaranjem 100 mg Commassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Aldrich) u 50 mL 96 % (v/v) etanola uz dodatak 100 mL 85 % (v/v) fosforne kiseline i destilovane vode do 1 L. U 100 µL uzorka dodato je 5 mL Bradfordovog reagensa. Uzorci su inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi i očitana im je apsorbance na 595 nm. Standardna kriva je konstruisana merenjem apsorbance albumina iz goveđeg seruma (BSA, Carl Roth, GmbH i Co.KG, Karlsruhe, Nemačka) a pripremljene su koncentracije u opsegu od 0.0781 mg mL⁻¹ do 2.5 mg mL⁻¹. Rezultat je izražen kao ekvivalent BSA u mg mL⁻¹. Svi uzorci su analizirani tri puta, a rezultat je izražen kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.4.2.5 Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

Ukupni fenoli određeni su pomoću Folin-Cicolateu reagensa prema proceduri koju su opisali Matijašević i saradnici (2016). Pripremljeni su ekstrakti micelijuma i plodonosnih tela gljive koncentracije 1 mg mL⁻¹ rastvaranjem u metanolu. U 200 µL uzorka dodato je 1.5 mL 10 % (v/v) Folinovog reagensa (Merck, KgaA, Darmstadt, Nemačka), uzorci su vorteksirani, i nakon pet minuta je dodato 1.5 mL 6 % (w/v) rastvora natrijum karbonata. Uzorci su inkubirani u mraku dva sata i nakon toga im je očitana apsorbance na spektrofotometru UV-VIS 1800 (Shimadzu, Japan) na talasnoj dužini od 725 nm. Slepa proba je pripremljen na isti način kao i uzorci, uz dodavanje metanola umesto uzorka. Kao standard uzeta je galna kiselina (Merck, KgaA, Darmstadt, Nemačka) u opsegu koncentracija

od 0.250 mg mL⁻¹ do 0.015 mg mL⁻¹. Svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg g⁻¹ uzorka.

4.4.2.6 Određivanje sadržaja ukupnih lipida u metanolnim ekstraktima gljive *C. versicolor*

Ukupni lipidi u uzorcima metanolnih ekstrakata micelijuma i plodnosnih tela gljive određeni su na bazi sulfo-vanilin-fosforne reakcije (Turlo et al., 2010a). U 50 µL ekstrakta koncentracije 20 mg mL⁻¹ dodato je 2 mL 96 % (w/v) sumporne kiseline. Nakon toga izvršeno je inkubiranje u vodenom kupatilu na 100 °C u trajanju od 20 minuta. Pripremljen je fosfo-vanilin reagens, rastvaranjem vanilina (TCI Europe N.V. Belgija) u 85 % v/v fosfornoj kiselinu (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD) uz dodatak destilovane vode i metanola. U ohlađene uzorke je dodato 4 mL fosfo-vanilin reagensa. Uzorci su vorteksirani i inkubirani još 20 minuta na sobnoj temperaturi. Apsorbanca je očitana na talasnoj dužini od 525 nm na UV-VIS 1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan). Rastvor holesterola (Merck, KgaA, Darmstadt, Nemačka) koncentracije od 0.75 mg mL⁻¹ do 6 mg mL⁻¹ upotrebljen je za konstruisanje kalibracione krive. Rezultat je izražen kao ekvivalent holesterola u mg g⁻¹ suve mase uzorka.

4.5 Određivanje biološke aktivnosti dobijenih metanolnih ekstrakata gljive *Coriolus versicolor*

4.5.1 Određivanje antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

4.5.1.1 Ispitivani sojevi bakterija i priprema kulture

Za analizu antibakterijske aktivnosti izabrani su sledeći sojevi:

- osam Gram pozitivnih sojeva: (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus spizizeni* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Listeria*

monocytogenes ATCC 19111, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria innocua* ATCC 33090).

- deset Gram negativnih sojeva (*Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* H7:O157, ATCC 35150, (*Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729 and *Citrobacter freundii* ATCC 43864).

Ispitivanje antifungalnog delovanja vršeno je na ATCC kulturama kvasaca (*Candida albicans* ATCC 10231 i *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763). Suspenzija bakterije *E. coli* H7:O157 i svih upotrebljenih *Listeria* sojeva je pripravljena u Tripton Soja bujonu (HiMedia, Indija) dok su ostale bakterije pripravljene u Müller Hinton bujonu (HiMedia, Indija). Suspenzije kvasaca su pripravljene u sladnom bujonu (HiMedia, Indija). Sa površine odgovarajućeg agara (Müller Hinton ili Tripton Soja) pikirana je kolonija stara 24 h i prebačena u 5 mL odgovarajućeg bujona i inkubirana 37 °C, 18–24 h. Krajnja koncentracija suspenzije mikroorganizama je podešena na 10⁵ cfu mL⁻¹ i upotrebljena je za inokulisanje mikrotitar ploča (Klančnik et al., 2010).

4.5.1.2 Određivanja antimikrobnog delovanja ekstrakata gljive *C. versicolor* mikrodilucionom metodom

Za određivanje minimalne inhibitorne (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstrakata gljive *C. versicolor* upotrebljena je mikrodiluciona metoda (Klančnik et al., 2010). Uzorci su rastvoreni u 5 % rastvoru DMSO (dimetil sulfoksid) u vodi i nakon toga sterilisani filtracijom kroz celulozno acetatni filter za špric promera 0.22 µm (Sartorius, Nemačka). Pripravljena je serija razređenja uzraka u mikrotitar pločama sa 96 bunarića (Sartorius, Nemačka), a svaki uzorak je analiziran u tri ponavljanja. Ispitivana je antimikrobna aktivnost uzoraka u opsegu koncentracija od 0.3125 mg mL⁻¹ do 40 mg mL⁻¹. Kao indikator rasta bakterijskih ćelija upotrebljene su dve indikator boje: TTC (2,3,5-trifenil-tetrazolijum hlorid, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD) za testiranje osetljivosti Gram-negativnih

bakterija, i so natrijum-resazurin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD), za testiranje Gram-pozitivnih sojeva (Sarker et al., 2007; Klančnik et al., 2010). Rastvor boje je dodat direktno u bakterijsku suspenziju pripremljenu u odgovarajućem bujonu. Tako pripremljena suspenzija je dodata u svaki od bunarića sa odgovarajućom ispitivanom koncentracijom uzorka, tako da je konačna zapremina u svakom bunariću iznosila 100 μL . Kao pozitivna kontrola, u bunarić je dodata samo suspenzija bakterija, a kao negativna kontrola 5 % rastvor DMSO u vodi. Nakon zasejavanja, mikrotitar ploče su inkubirane na 37 °C u trajanju od 18–24 h. Minimalna inhibitorna koncentracija je definisana kao najmanja koncentracija uzorka (mg mL^{-1}) kod koje nije bilo uočljivog rasta, tako da je indikator respiratorne aktivnosti (TTC) ostao bezbojan (Klančnik et al., 2010; Shakeri et al., 2014). U slučaju korišćenja resazurina kao indikatora, promena boje od plave do roze ili potpuno obezbojavanje bujona u bunariću ukazivala je na bakterijski rast. Naime, resazurin je netoksična plava boja koja podleže redukciji do resofurina (roze boje) odnosno bezbojnog hidroresofurina u prisustvu oksidoreduktaza živih ćelija mikroorganizama (Shakeri et al., 2014). Da bi se utvrdila minimalna baktericidna koncentracija, uzorci za koje je utvrđeno da inhibiraju rast bakterija su zasejani na površinu odgovarajućeg agara. U slučaju izostajanja bakterijskog rasta na površini agara, testirana koncentracija se smatra minimalnom baktericidnom koncentracijom (MBC) (Nowacka et al., 2014).

4.5.2 Određivanja antimikrobnog delovanja ekstrakata gljive *C. versicolor* merenjem optičke gustine (*Optical Density*)-kinetika rasta

Za testiranje uticaja metanolnih ekstrakata micelijuma i plodonosnih tela gljive *C. versicolor* na kinetiku rasta bakterija upotrebljene su prethodno određene MIC i MBC koncentracije. Uzorci su pripremljeni na isti način kao i za određivanje antimikrobne aktivnosti mikrodilucionom metodom. Optička gustina bujona je merena pomoću čitača mikrotitar ploča, (microplate reader ELx808, BioTek Instruments, Inc., SAD) kontrolisanog pomoću Gen5™ softvera. Apsorbanca je očitavana na 630 nm, svakih sat vremena tokom 24 h. Pre svakog merenja uzorci

su mešani u trajanju od 10 s, a ambijentalna temperatura je održavana na 37 °C (Matijašević et al., 2016). Prilikom upotrebe resazurina kao indikatora bakterijskog rasta, promena boje od ljubičaste do roze ukazuje na mikrobni rast i dovodi do smanjenja apsorbance. Zbog toga su vrednosti dobijenih apsorbanci na y-osi predstavljeni obrnutim redosledom kod uzoraka za koje je korišćen ovaj indikator. Rezultati su predstavljeni grafički kao zavisnost optičke gustine (OD vrednosti) u funkciji vremena.

4.5.3 Određivanje antioksidativnog potencijala metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

4.5.3.1 Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih DPPH radikala

Pripremljena su dva seta uzoraka koncentracije 10 mg mL⁻¹ rastvaranjem u metanolu i mešanjem na vorteksu. Nakon rastvaranja uzorci su centrifugirani (8000 obrt. min⁻¹, 10 min) da bi se uklonile eventualno nerastvorene čestice. Nakon toga su pripremljene dve serije razređenja koncentracije od 0.01 mg mL⁻¹ do 10 mg mL⁻¹. Pripremljen je 0.2 mM rastvor DPPH (2,2-difenil-1 pikrilhidrazil, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD) u dimetilsulfoksidu (DMSO). U svaku epruvetu serije 1 je dodato po 1 mL DPPH, a u seriju 2 je dodato po 1 mL DMSO. Nakon 40 minuta u mraku, merena je apsorbanca uzoraka iz serije br. 1 na UV-VIS 1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) na 517 nm. Apsorbanca serije br. 2 je izmerena odmah, na istoj talasnoj dužini. Serije standarda su pripremljene na isti način kao i uzorci osim što su rastvoreni u DMSO. Sposobnost vezivanja DPPH radikala je određena pomoću formule:

$$\left[1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \right] \times 100, \text{ gde je:}$$

A_i - izmerena apsorbanca za uzorak/standard kome je dodat DPPH,

A_j - izmerena apsorbanca za uzorak/standard kome je dodat DMSO,

A_c - izmerena apsorbanca slepe probe uzorka/standarda.

4.5.3.2 Određivanje sposobnosti heliranja Fe²⁺ jona

Pripremljeni su uzorci metanolnih ekstrakta selenom obogaćene gljive *C. versicolor* koncentracije 20 mg mL⁻¹. Nakon toga pripremljena je serija razređenja u epruветama tako da je najmanja ispitivana koncentracija uzorka iznosila 0.1 mg mL⁻¹ a najveća 20 mg mL⁻¹. U svaku epruветu je zatim dodato po 1.85 mL metanola, 50 μL 2 mM gvožđe (II) hlorida (FeCl₂, Betahem, Beograd, Srbija) i 100 μL 5 mM ferozina (HiMedia, Indija). Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je očitana apsorbancа na 562 nm, na UV-VIS 1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan). Uređaj je kalibrisan metanolom, a slepa probа je pripremljena na isti način kao i uzorci, osim što je umesto uzorkа u epruветu dodat metanol. Rezultat je izražen u %, a izračunat je pomoću formule:

$$\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100, \text{ gde je:}$$

A_0 - apsorbancа slepe probe, a A_1 - apsorbancа uzorkа.

Kao standard je korišćena limunska kiseline (Kozarski et al., 2011).

4.5.3.3 Određivanje sposobnosti redukcije Fe³⁺ jona

Pripremljeni su uzorci koncentracije 20 mg mL⁻¹ u metanolu mešanjem na vorteksu do rastvaranja i centrifugiranjem na 3000 obrtaja min⁻¹, 10 minuta. Potom je pripremljena serija razređenja u epruветama zapremine 10 mL. U svaku epruветu je dodato po 250 μL uzorkа, 250 μL fosfatnog pufera pH 6.6 i 250 μL 1 % rastvora fericijanida (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, SAD). Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 50 °C u trajanju od 2 minuta. Zatim je smeši dodato 250 μL 10 % rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) i uzorci su ponovo centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja min⁻¹. Nakon centrifugiranja u svaku epruветu je dodato po 1 mL ultra čiste vode i 0.2 mL 0.1 % rastvora gvožđe III hlorida (FeCl₃). Neposredno pre merenja apsorbance na 700 nm (UV-VIS spectrophotometer 1800, Shimadzu, Japan) uzorci su promešani. Slepa probа je pripremljena na isti način kao i uzorci, uz dodatak

metanola umesto uzorka. Kao standard je upotrebljena askorbinska kiselina (Kozarski et al., 2011).

4.5.3.4 Određivanje antioksidativne aktivnosti u model sistemu linoleinske kiseline

Od početne koncentracije metanolnog ekstrakta (10 mg mL^{-1}) pripremljena je serija razređenja do 0.1 mg mL^{-1} u epruvetama zapremine 10 mL. Potom je u normalnom sudu zapremine 100 mL pripremljena 10 mM emulzija linoleinske kiseline na sledeći način: u normalni sud je prvo dodato 10 mL metanola, a zatim na analitičkoj vagi izmereno tačno 200 mg linoleinske kiseline (TCI Europe N.V. Belgija) i normalni sud je postepeno dopunjen fosfatnim puferom pH 6.5 do crte. Nakon toga, sadržaj normalnog suda je mešan na magnetnoj mešalici 30 minuta, a potom i 15 minuta tretiran na ultrazvučnom kupatilu. Tako pripremljena emulzija je uvijena u aluminijumsku foliju i čuvana na hladnom u mraku do upotrebe. Pripremljena je serija epruveta sa po 100 μL uzorka (koncentracije uzorka od 0.1 do 10 mg mL^{-1}), u koje je dodato po 2 mL 10 mM emulzije linoleinske kiseline i mali magnet. Epruvete su inkubirane 20 h na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ u mraku, a tokom čitavog perioda inkubacije uzorci su mešani na magnetnoj mešalici. Nakon inkubacije, iz svake epruvete je odmereno po 120 μL i prebačeno u epruvetu sa 3.6 mL metanola. Uzorci su mešani na vorteksu i centrifugirani na $3000 \text{ obrtaja min}^{-1}$, 10 minuta. Nakon toga uzorcima je izmerena apsorbanca u kvarcnim kivetama na 234 nm (UV-VIS spectrophotometer 1800, Shimadzu, Japan). Kalibracija uređaja je izvršena metanolom, a slepa proba je bila 120 μL emulzije linoleinske kiseline u 3.6 mL metanola. Kao standardi upotrebljene su askorbinska kiselina (VWR Prolab, Leuven, Belgija) i α -tokoferol (TCI Europe N.V. Belgija). Sva testirana razređenja uzoraka su pripremljena u tri ponavljanja. Antioksidativni efekat (AE) je izračunat za svaki uzorak posebno pomoću formule:

$$AE = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 (\%), \text{ gde je:}$$

A_0 - apsorbanca slepe probe,

A_1 - apsorbanca uzorka (Kozarski et al., 2011).

4.6 Statistička analiza

Svi eksperimenti su rađeni u tri ponavljanja, osim kada je određivana morfologija rasta gljive u tečnoj podlozi, kada je za merenje veličine dobijenih oblika rađeno 30 ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Dobijeni podaci su podvrgnuti jednofaktorijalnoj analizi varijanse (ANOVA). Statistička obrada podataka je rađena u statističkom programu Origin Pro 9.0. Za određivanje statističke značajnosti između dobijenih vrednosti korišćeni su Tukey's HSD (honesty significant defference) test odnosno Takijev test, i Fisher's LSD (least significant difference) test (Fišerov test najmanje značajne razlike) na nivou značajnosti od $p < 0.05$. Efektivna koncentracija ispitivanih ekstrakta gljive pri kojoj je antioksidativna aktivnost 50 % dobijena je interpolacijom vrednosti pomoću linearne regresione analize, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Linearne regresione analize je korišćena za utvrđivanje korelacije između promenljivih od značaja.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1 Sposobnost akumulacije selena iz različitih izvora od strane gljive *Coriolus versicolor*

U ovoj disertaciji analizirana je sposobnost gljive *C. versicolor* da usvoji, transformiše i akumulira selen iz različitih organskih i neorganskih izvora. Svi analizirani uzorci su podeljeni u dve velike grupe. Prva grupa obuhvata uzorke plodonosnih tela, dobijenih industrijskim postupkom gajenja na čvrstom supstratu koji je obogaćen organskim i neorganskim izvorima selena. Druga grupa obuhvata uzorke biomase, odnosno micelijuma dobijenog gajenjem u tečnoj kulturi, koja je takođe obogaćena organskim i neorganskim izvorima selena. Budući da ova dva načina gajenja daju morfološki i fiziološki potpuno različit rast, očekivalo se da dobijeni uzorci pokažu značajne razlike u sposobnosti akumulacije i transformacije dodatog selena.

Dostupnost analitičkih metoda, u prvom redu atomske apsorpcione spektrofotometrije (AAS), optičke emisije spektrometrije sa indukvano spregnutom plazmom (ICP-OES) i masene spektrometrije sa indukvano spregnutom plazmom (ICP-MS) omogućava detekciju veoma niskih nivoa mnogih elemenata koji se u uzorcima nalaze u tragovima uključujući i selen (Kalač, 2010). ICP-OES tehnika poseduje brojne prednosti u odnosu na AAS koja se takođe često koristi za kvantitativnu analizu velikog broja elemenata. Neke od njih su: sposobnost multielementarne analize, veliki dinamički opseg, redukcija interferencije matriksa ispitivanog uzorka, povećan limit detekcije za elemente koji podležu refrakciji i povećanje produktivnosti (Kula et al., 2011). Takođe, glavni nedostatak upotrebe AAS tehnike za određivanje sadržaja selena u uzorcima je nedovoljan limit detekcije za ovaj element, pa zbog toga određivanje sadržaja selena u biološkim uzorcima primenom ove metode nije uobičajena (Falandysz, 2013). Elementarnoj analizi upotrebom pomenutih tehnika prethodila je priprema uzorka koja podrazumeva mineralizaciju organske materije. Uzorci su mineralizovani primenom mikrotalasne digestije, budući da ona ne zahteva dosta

vremena u poređenju sa drugim metodama, kao što su mokro i suvo spaljivanje (Altundag i Tuzen, 2011).

5.1.1 Uticaj neorganskih soli i organskih jedinjenja na usvajanje selena i prinos plodonosnih tela gljive *C. versicolor*

U Tabeli 2. prikazani su rezultati prinosa biomase plodonosnih tela i sposobnosti gljive *C. versicolor* da usvoji selen iz čvrstog supstrata na kome raste.

Tabela 2. Prinos biomase i usvajanje selena iz neorganskih soli u plodonosna tela gljive *C. versicolor*.

Neorganska so	Koncentracija mg Se kg ⁻¹ suvog supstrata	Oznaka uzorka	Sadržaj selena (µg g ⁻¹ suve mase)*	Prinos biomase (g kg ⁻¹ suvog supstrata)*
Kontrola		K PT**	4.90±0.14 ^{a***}	12.19±0.43 ^a
Na₂SeO₃	10	SeO ₃ ²⁻ 10 PT	42.55±3.45 ^b	11.79±2.67 ^a
	25	SeO ₃ ²⁻ 25 PT	72.28±3.88 ^c	9.38±1.64 ^b
	50	SeO ₃ ²⁻ 50 PT	158.80±5.21 ^d	4.11±0.57 ^c
Na₂SeO₄	10	SeO ₄ ²⁻ 10 PT	34.87±2.85 ^e	13.31±3.38 ^d
	25	SeO ₄ ²⁻ 25 PT	74.80±2.32 ^c	15.7±1.87 ^d
	50	SeO ₄ ²⁻ 50 PT	150.60±3.74 ^g	11.65±1.94 ^{a,b}

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT - kontrolni uzorak; SeO₃²⁻ 10 PT, SeO₃²⁻ 25 PT, SeO₃²⁻ 50 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10, 25 i 50 mg Se kg⁻¹); SeO₄²⁻ 10 PT, SeO₄²⁻ 25 PT, SeO₄²⁻ 50 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom natrijum selenatom (10, 25 i 50 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher's LSD.

Sva plodonosna tela su ubrana istog dana i morfološke razlike u izgledu plodonosnih tela između različitih uzoraka nisu uočene. Sadržaj selena u kontrolnom uzorku iznosio je oko 4.90 µg g⁻¹ suvog supstrata (Tabela 2). Dobijeni

rezultat ukazuje na činjenicu da su sirovine koje se koriste za pripremu supstrata za gajenje gljiva siromašne selenom, što ukazuje na potrebu dodavanja dodatnih izvora Se u podlogu za gajenje gljiva. Primećena je srednja, negativna statistički značajna ($p \leq 0.05$) korelacija ($r = -0.54$) između sadržaja selena u podlozi i prinosa biomase plodonosnih tela. Niže koncentracije neorganskih soli (10 i 25 mg kg⁻¹) nisu uticale na prinos biomase plodonosnih tela (Tabela 2). Tek je dodatak natrijum selenita u koncentraciji od 50 mg kg⁻¹ suvog supstrata značajno inhibirao rast gljive. Sa druge strane, ni jedna testirana koncentracija natrijum selenata nije uticala na prinos biomase plodonosnih tela. Rezultati analize sadržaja selena su pokazali da je gljiva uspešno usvojila dodati selen iz podloge i akumulirala ga u plodonosna tela. Sa porastom koncentracije u supstratu sadržaj selena u gljivi je rastao. Primenjeno jedinjenje nije uticalo na uspešnost akumulacije selena samo kada je primenjena koncentracija selena od 25 mg kg⁻¹. Gljiva je usvojila selen iz podloge na kojoj je rasla, a uspešnost usvajanja je varirala. Na osnovu podataka o masi upotrebljenog supstrata za gajenje (2 kg), koncentraciji selena dodatog u podlogu (10, 25 ili 50 mg kg⁻¹) i eksperimentalno dobijenih vrednosti za prinos biomase plodonosnih tela gljive (g) i sadržaj selena u plodonosnim telima (μg g⁻¹) izračunat je procenat usvojenog u odnosu na dodati selen, prema formuli:

$$\% \text{ usvojenog selena} = \frac{m_{PT} \times C_{SePT}}{C_{Se\text{sup}s} \times m_{\text{sup}s}} \times 100, \text{ gde je:}$$

m_{PT} - prinos biomase plodonosnih tela (g),

C_{SePT} - koncentracija selena (μg g⁻¹) u plodonosnom telu određena ICP-OES analizom,

$C_{Se\text{sup}s}$ - koncentracija selena (μg g⁻¹) dodata u supstrat za gajenje,

$m_{\text{sup}s}$ - masa supstrata za gajenje (g).

Dobijeni rezultati su ukazali na relativno nizak procenat usvojenog u odnosu na dodati selen. Tako je tek oko 5.02 % dodatog selena u obliku natrijum selenita (10 mg Se kg⁻¹) usvojeno, a taj procenat je pao na 2.54 odnosno 1.31 % kada su primenjene više koncentracije. Gljiva je usvojila selen iz natrijum selenata u procentu između 3.51 i 4.69 %.

Tabela 3. Prinos biomase i usvajanje selena iz organskih izvora u plodonosna tela gljive *C. versicolor*.

Organski izvor Se	Koncentracija mg Se kg ⁻¹ suvog supstrata	Oznaka uzorka	Sadržaj selena (µg g ⁻¹ suve mase)*	Prinos biomase (g kg ⁻¹ suvog supstrata)*
Kontrola		K PT**	4.90±0.14 ^{a***}	12.19±0.43 ^{a**}
Selenourea	10	SU 10 PT	36.52±1.56 ^b	12.87±1.74 ^a
	25	SU 25 PT	97.85±2.99 ^c	5.39±3.31 ^b
	50	SU 50 PT	198.4±5.31 ^d	1.27±0.64 ^b
Sel-Plex®	10	SP 10 PT	36.83±2.14 ^b	12.06±1.42 ^a
	25	SP 25 PT	93.39±1.89 ^c	3.94±3.41 ^b
	50	SP 50 PT	i.f. ^{****}	i.f. ^{****}

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT - kontrolni uzorak; SU 10 PT, SU 25 PT, SU 50 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom selenouream (10, 25 i 50 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT, SP 25 PT, SP 50 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10, 25 i 50 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. ****Izostala fruktifikacija.

Analizom rezultata dobijenih upotrebom organskih izvora selena za obogaćenje supstrata za gajenje dobijeni su nešto drugačiji rezultati (Tabela 3). Gljiva je takođe pokazala sposobnost da usvoji i akumulira selen u plodonosna tela. U poređenju sa kontrolnim uzorkom najniža testirana koncentracija selenouree i Sel-Plex®-a (10 mg Se kg⁻¹) nije statistički značajno uticala na prinos biomase. Takođe, poređenjem rezultata nije utvrđena razlika u sadržaju selena između uzoraka gajenih na supstratu obogaćenom organskim, odnosno neorganskim jedinjenima pri pomenutoj koncentraciji. Dodatak organskog jedinjenja selena u koncentraciji od 25 mg kg⁻¹ doveo je do smanjenja prinosa za oko 60 do 80 %, ali i do oko 2.5 puta veće akumulacije selena u plodonosna tela (Tabela 3). Utvrđena je statistički značajna razlika u sadržaju selena u gljivi između dva organska izvora pri pomenutoj koncentraciji. Primećena je jaka, statistički značajna (p≤0.05),

negativna korelacija ($r=-0.89$) između sadržaja selena i prinosa biomase plodonosnih tela pri primeni organskih izvora selena. Viša koncentracija selena (50 mg kg^{-1}) delovala je veoma inhibitorno (Tabela 3), čak se može reći i toksično na rast gljive. Tako je kod Sel-Plex[®]-a kao izvora selena fruktifikacija u potpunosti izostala, dok je kod primene selenouree dobijeno nekoliko nerazvijenih plodonosnih tela. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Savić i saradnika (2012), koji su takođe uočili značajne razlike u akumulaciji selena između različitih vrsta gljiva roda *Pleurotus*, pri upotrebi istog jedinjenja za obogaćenje supstrata. Naime, gljiva *C. versicolor* je pokazala znatno bolji kapacitet usvajanja/akumulacije selena pri nižim koncentracijama Sel-Plex[®]-a, ali sa druge strane, testirane *Pleurotus* vrste su uspešno odgajene i pri primeni znatno viših koncentracija ovog jedinjenja. Međutim, pomenuti autori su takođe uočili potencijalno inhibitorno dejstvo Sel-Plex[®]-a na rast gljiva roda *Peurotus*, budući da je dodatkom Sel-Plex[®]-a u koncentraciji višoj od 75 mg Se kg^{-1} fruktifikacija kasnila, i plodonosna tela su ubrana 3 do 5 dana kasnije.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da gljiva *C. versicolor* poseduje različitu sposobnost rasta na supstratu obogaćenom selenom, u zavisnosti od primenjene koncentracije i oblika selena dodatog u supstrat za gajenje. Ovakvi rezultati ukazuju na to da treba voditi računa pri odabiru izvora i koncentracija Se za obogaćenje supstrata za gajenje selenom obogaćene gljive *C. versicolor*.

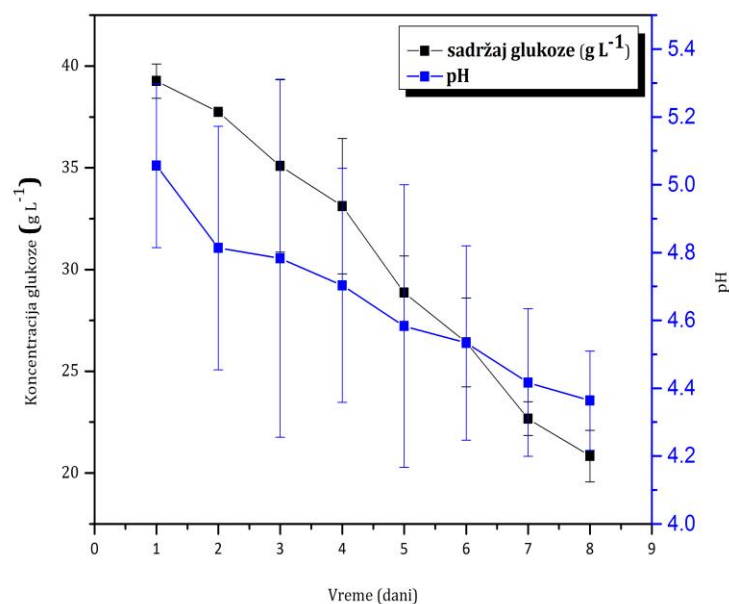
5.2 Submerzno gajenje gljive *Coriolus versicolor*

5.2.1 HPLC analiza potrošnje glukoze, određivanje promene pH vrednosti i prinosa biomase tokom submerznog gajenja gljive *C. versicolor*

Rezultati analize potrošnje glukoze od strane gljive *C. versicolor* praćeni su u periodu od osam dana i prikazani su na Grafiku 1. Primećeno je da je nakon 48 h, koncentracija glukoze počela značajno da opada, da bi na kraju fermentacije njen sadržaj iznosio $20.83 \pm 1.27 \text{ g L}^{-1}$, što predstavlja 52.07 % od polazne koncentracije gukoze. Prema literaturnim podacima, submerzno gajenje gljiva može trajati i

preko 30 dana, u cilju postizanja maksimalne iskorišćenosti glukoze iz podloge (Shih et al., 2007). Rau i saradnici (2009) su pokazali da je gljiva *C. versicolor* dostigla maksimalnu specifičnu brzinu rasta nakon 7.9 dana gajenja, a da je glukoza potrošena nakon 11 dana.

Međutim, tokom izvođenja ovog eksperimenta, potrošnja glukoze nakon sedmog dana je usporena, i u cilju postizanja veće efikasnosti procesa gajenja (štednje energije i vremena) proces je zaustavljen i micelijum je izolovan. Na ovaj način je ostvaren relativno visok prinos biomase (6.63 ± 0.31 g SM L⁻¹). Prema podacima Xu i saradnika (2003), optimizacija submerznog postupka gajenja je kritična za veći prinos biomase. Izgleda da se variranjem parametara procesa i sastava medijuma za gajenje može postići veća produktivnost pri submerznom gajenju gljiva. U ovoj disertaciji je testirana relativno visoka koncentracija glukoze u medijumu za gajenje od 40 g L⁻¹, i postignut je dobar stepen konverzije u biomasu gljive. U odeljku 5.2.4 (Tabela 4 i Tabela 5) prikazan je prinos biomase micelijuma kontrolnog uzorka gljive *C. versicolor*, kao i prinos gljive dobijen gajenjem u medijumu obogaćenom selenom. Na efikasnost samog procesa gajenja utiču i konstrukcija upotrebljenog bioreaktora i uslovi koji u njemu vladaju. Mao i Zhong (2004) su pokazali da optimalan transfer kiseonika zajedno sa adekvatnim sistemom za mešanje mogu biti kritični parametri koji određuju maksimalnu produkciju metabolita gljive. Na osnovu ovih saznanja primenjeno je blago mešanje da bi se obezbedila homogena distribucija kiseonika i nutrijenata u čitavoj zapremini bioreaktora. Zhou i saradnici (1994) su prijavili da je fermentacioni bujon gljive *C. versicolor* veoma viskoznan usled prisustva ekstracelularnih polisaharida i filamenata biomase. Upravo zbog raznih promena kojima fermentacioni bujon podleže tokom rasta micelijuma neophodno je obezbediti konstantno mešanje. U ovom eksperimentu je nakon prva dva dana gajenja uočen značajan rast peleta koje su počele da formiraju kompaktnu biomasu. U isto vreme sa rastom micelijuma, pH fermentacionog bujona (Grafik 1) je počela da opada, sa približno 5.1 (prvog dana) do približno 4.3 (osmi dan).



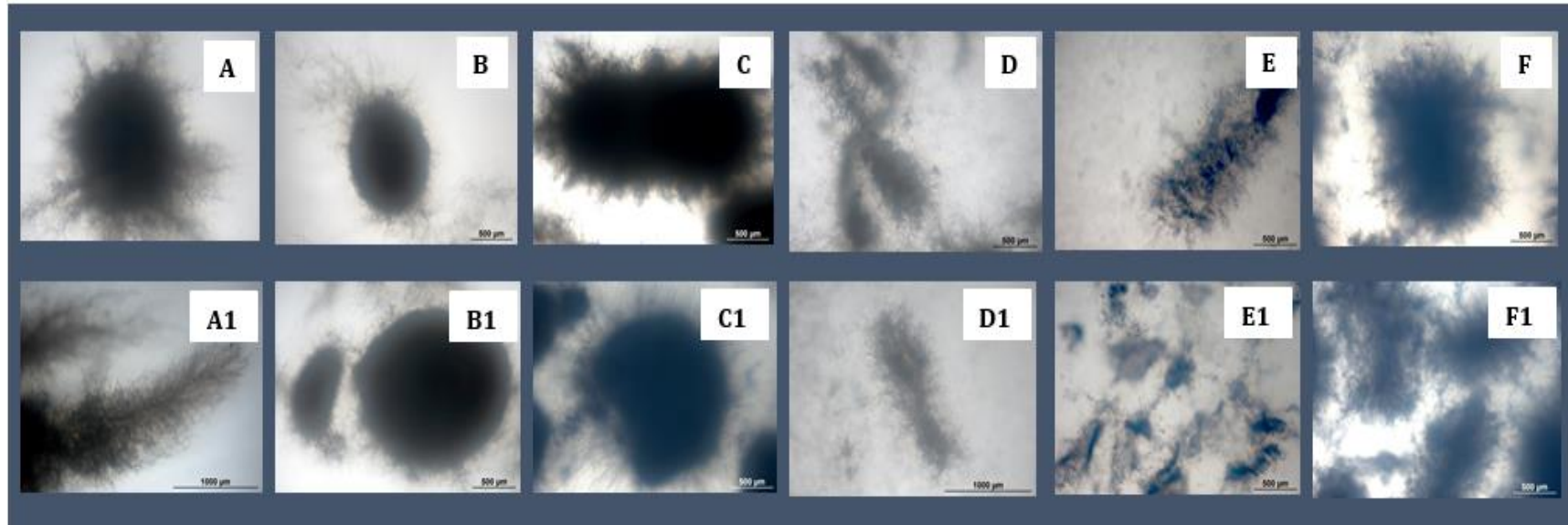
Grafik 1. Potrošnja glukoze i promena pH vrednosti tokom submerzne fermentacije gljive *C. versicolor*.

Rezultati ukazuju da intenzivni rast micelijuma dovodi do smanjenja pH vrednosti bujona. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili Que i saradnici (2014). Prema njihovim istraživanjima optimalna pH vrednost koja odgovara maksimalnoj produkciji egzopolisaharida gljive *C. versicolor* je nešto niža nego kod ostalih gljiva i kreće se između 4.0 i 6.0. U eksperimentu u ovoj disertaciji, optimalna pH vrednost je postignuta bez dodatnog podešavanja tokom procesa.

5.2.2 Svetlosna mikroskopija micelije gljive *C. versicolor* dobijene submerznim gajenjem

Rezultati mikroskopske analize morfologije rasta gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi sa i bez dodatka selena prikazani su na Slici 3. Kao što se može videti, gljiva gajena bez dodatka selena (Slike 3A i 3A1), je rasla pretežno u obliku paperjastih peleta uz prisustvo velikog broja filamenata na površini. Postoje značajne razlike u načinu i obliku rasta micelijuma gljive *C. versicolor* pri upotrebi različitih jedinjenja

kao izvora selena u tečnom medijumu. Dobro je poznato da u submerznoj kulturi gljive mogu rasti u obliku peleta ili u obliku slobodnih filamenata dispergovanih u podlozi, a uobičajeno je da jedan oblik tokom rasta prevlada (Cui et al., 1997). Pelete se mogu definisati kao stabilni sferični ili ovalni aglomerati koji se sastoje od razgranate i isprepletane mreže hifa (Braun i Vecht-Lifshitz, 1991). Gljiva koja je rasla u tečnoj podlozi sa dodatkom selenouree (Slike 3B i 3B1, 3C i 3C1) je formirala pelete sferičnog oblika. Nije utvrđena razlika u obliku i prosečnoj veličini pri upotrebi veće koncentracije selenouree, pa su dobijene pelete prosečne veličine SU 10 sub (1.55 ± 0.39) x (1.06 ± 0.35) mm i SU 25 sub (1.56 ± 0.47) x (1.03 ± 0.38) mm. Takođe, na Slikama 3B, 3B1 i 3C, 3C1 se može uočiti da je centralni deo hifa veoma taman, što ukazuje na gusto pakovane hife koje formiraju pelete. Sa druge strane, peleti izolovani nakon gajenja na natrijum selenatu (SeO_4^{2-} 10 sub) su nešto drugačije morfologije (Slike 3F i 3F1), budući da je gljiva formirala paperjaste pelete (dimenzije uzorka SeO_4^{2-} 10 sub su (1.35 ± 0.47) x (0.89 ± 0.36) mm) što ukazuje na rastresitije pakovane hife (Papagianni, 2004). Gljiva rasla u tečnoj podlozi kojoj je dodat Sel-Plex® (uzorak SP 10 sub) je formirala ugruške dispergovanih filamenata (Slike 3D i 3D1), prosečnih dimenzija (1.10 ± 0.45) x (0.43 ± 0.17) mm. Raspršen rast (Slike 3E i 3E1) je primećen kada je gljiva gajena na natrijum selenitu (uzorak SeO_3^{2-} 10 sub), sa dimenzijama filamenata od (1.04 ± 0.45) x (0.43 ± 0.17) mm (Žnidaršič i Pavko, 2001). Morfologija rasta gljiva u tečnoj podlozi je predmet opsežnih istraživanja, budući da utiče na reološka svojstva fermentacionog bujona, prinos biomase, kao i prinos ciljanih metabolita i biotehnošku efikasnost procesa (Belmar-Beiny i Thomas, 1991; Daniel et al., 1995; Lee et al., 2004; Packer i Thomas, 2009). Uslovi koji favorizuju jedan oblik rasta još uvek nisu u potpunosti poznati. Veliki broj faktora utiče na morfologiju rasta, kao što su: sastav medijuma za gajenje, pH, temperatura fermentacije, stopa aeracije. Dva faktora koja imaju najveći uticaj na morfologiju rasta se izdvajaju, a to su mehaničke sile i trenje prisutno u bioreaktoru (Panda i Rameshaiah, 2009). Fermentacioni bujon tokom submerznog gajenja je potrebno mešati da bi se kultura ravnomerno snabdevala kiseonikom.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Slika 3. Morfologija rasta gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

A, A1- K sub; kontrolni uzorak bez dodatog selena; B, B1-SU 10 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 mg mL^{-1}); C, C1-SU 25 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (25 mg Se mL^{-1}); D, D1-SP 10 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex[®]-om (10 mg Se mL^{-1}); E, E1- SeO_3^{2-} 10 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se mL^{-1}); F, F1- SeO_4^{2-} 10 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenatom (10 mg Se mL^{-1}).

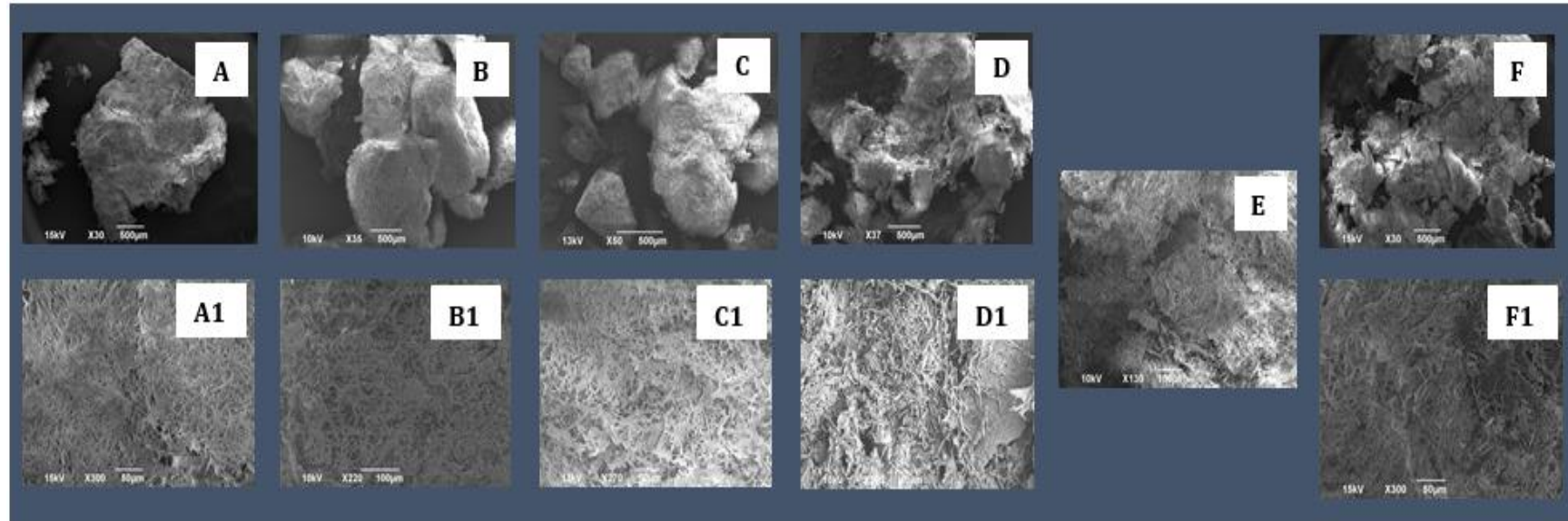
Lagano mešanje (150 obrt. min⁻¹) kakvo je primenjeno u eksperimentima u ovoj disertaciji je poželjno, jer se na taj način izbegava fragmentacija peleta. Lee i saradnici (2004) su otkrili da tokom submerznog gajenja gljiva *Grifola frondosa* formira kompaktne pelete pri niskoj aeraciji. Oni su došli do podataka da se maksimalna produkcija biomase micelijuma i polisaharida postiže kada gljiva raste u obliku labavih gromuljica koje su izrazito „maljave“. Isti autori su došli do zaključka da je prinos i biomase i EPS-a bolji pri primeni bioreaktora sa mehaničkim mešanjem u poređenju sa air-lift tipom bioreaktorom. U tom slučaju u bioreaktoru sa mehaničkim mešanjem se postiže bolje mešanje biomase tokom rasta a dobijeni peleti su željene morfologije. Que i saradnici (2014) su došli do podataka da pH vrednost takođe značajano utiče na morfologiju rasta i da gljiva *C. versicolor* raste u obliku filamenata pri pH 6.0. Isti autori su zaključili da je ova morfologija odgovarajuća za produkciju EPS-a od strane gljive *C. versicolor*.

5.2.3 Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) micelije gljive *C. versicolor* dobijene submerznim gajenjem

Skenirajuća elektronska mikroskopija je metoda pomoću koje se mogu utvrditi morfološke karakteristike, sastav i druga svojstva površine nekog uzorka. Glavna prednost ove metode u odnosu na upotrebu konvencionalnih mikroskopa je izuzetno velika dubina polja koja omogućava dobijanje gotovo 3D slike uz jednostavnu pripremu uzorka. Da bi se snimili, uzorci moraju biti električno provodljivi. Zbog toga svakom snimanju prethodi oblaganje uzorka slojem metala (metaliziranje) u čiju se svrhu najčešće koriste zlato, platina, osmijum, iridijum, volfram ili hrom. Dobijena slika nastaje kao rezultat skeniranja površine uzorka uskim snopom elektrona koji se usmeravaju ka uzorku pomoću visokog napona od 50 do 300 kV (Milojković, 2015).

Kao što se može videti na Slici 4, dobijena je morfologija hifa tipična za gljive. Hife su dugačke, veoma razgranate i anastomozirane. Nisu uočene razlike u stepenu umrežavanja hifa primenom između uzoraka dobijenih gajenjem u tečnoj podlozi sa dodatkom selenouree (Slike 4B, 4B1 i 4C, 4C1) i uzoraka gajenih u tečnoj

podlozi sa dodatkom Sel-Plex[®]-a (Slike 4D, 4D1 i 4E, 4E1). Jedino je kod uzorka SeO₃²⁻ 10 sub (Slike 4F i 4F1) uočen nešto niži stepen umrežavanja hifa, što je u skladu sa snimcima dobijenim svetlosnom mikroskopijom (Slika 3). Gustina hifa je veoma visoka a prisustvo septi nije uočeno. Poznato je da ekstracelularni materijal produkovan tokom rasta okružuje hife gljive *C. versicolor* u tečnoj kulturi. Uklanjanje takvog materijala sa površine hifa zahteva pažljivo ispiranje, a potvrda dobro obavljenog procesa je odsustvo egzopolisaharida na površini hifa (Vesentini et al., 2005). Skenirajućom elektronskom mikroskopijom nije uočeno prisustvo EPS-a na površini micelije, ni kod jednog pripremljenog uzorka. Ovakva potvrda je veoma značajna budući da su istraživanja pokazala da egzopolisaharidi gljive *C. versicolor* korišćene u ovoj disertaciji ispoljavaju značajnu antibakterijsku aktivnost (Duvnjak et al., 2016). Primenjena SEM analiza daje određenu sigurnost tokom tumačenja dobijenih rezultati naknadno vršenih hemijskih analiza i analiza biološke aktivnosti, pa se tako može zaključiti da su dobijeni rezultati nastali usled prisustva hemijskih jedinjenja/elementa i aktivnosti bioaktivnih komponenti prisutnih u micelijumu gljive (Ivarsson i Holmström, 2012).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Slika 4. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM) micelije gljive *C. versicolor* dobijene gajenjem u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

A, A1 - K sub; kontrolni uzorak bez dodatog selena; B, B1 - SU 10 sub; rast u medijumu obogaćenom selenoureom (10 mg Se mL^{-1}); C, C1 - SU 25 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (25 mg Se mL^{-1}); D, D1 - SP 10 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 mg Se mL^{-1}); E - SP 25 sub; rast u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (25 mg Se mL^{-1}); F, F1 - SeO_3^{2-} 10 sub rast u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se mL^{-1}).

5.2.4 Uticaj neorganskih soli i organskih izvora selena na usvajanje selena i prinos biomase micelijuma gljive *C. versicolor* dobijene submerznim gajenjem

Gljiva gajena u tečnoj podlozi pokazala je znatno veći kapacitet za usvajanje selena u poređenju sa gljivom raslom na čvrstom supstratu (Tabela 4 i Tabela 5). Kao i kod plodonosnih tela, sadržaj selena u kontrolnom uzorku micelije bio je veoma nizak, i to oko 1 µg g⁻¹. Dobijena je veoma gusta biomasa bele boje kontrolnog uzorka.

Tabela 4. Prinos biomase i rezultati usvajanja selena iz neogranskih soli u micelijum submerzno gajene gljive *C. versicolor*.

Neorganska so	Koncentracija mg Se L ⁻¹ tečne podloge	Oznaka uzorka	Sadržaj selena (µg g ⁻¹ suve mase) *	Prinos biomase (g L ⁻¹ tečne podloge)
Kontrola		K sub**	0.81±0.55 a***	6.63±0.31 ^a
Na₂SeO₃	10	SeO ₃ ²⁻ 10 sub	2310.00±249.00 ^b	1.89±1.12 ^b
	25	SeO ₃ ²⁻ 25 sub	6707.00±586.00 ^c	1.94±0.23 ^b
Na₂SeO₄	10	SeO ₄ ²⁻ 10 sub	160.5±22.4 ^a	4.37±0.22 ^c

*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **Ksub-kontrolni uzorak; SeO₃²⁻ 10 sub, SeO₃²⁻ 25 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₄²⁻ 10 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenatom (10 mg Se L⁻¹); ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Natrijum selenit dodat u podlogu uzrokovao je promenu boje micelijuma od jarko svetlo roze (10 mg Se L⁻¹) do izrazite cigla crvene boje (25 mg Se L⁻¹). Prema Milovanoviću i saradnicima (2014), pri visokim koncentracijama selena u tečnoj podlozi (100 mg L⁻¹ i 500 mg L⁻¹) tokom supresije rasta gljive *Pleurotus ostreatus* u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom, dolazi do redukcije selenita do elementarnog selena što dovodi do stvaranja crvenog obojenja micelijuma i

podloge. Ranija istraživanja su pokazala da tokom perioda stacionarne faze rasta gljive dolazi do redukcije selenita (SeO_3^{2-}) do amorfno, elementarnog selena (S^0) što miceliji daje crvenu boju (Poluboyarinov et al., 2009). Redukcijom selenata i selenita do elementarnog selena dolazi do njegove imobilizacije i ujedno se smanjuje toksičnost ovog elementa (White et al., 1995).

U poređenju sa natrijum selenatom, natrijum selenit se pokazao kao povoljniji oblik za akumulaciju selena (Tabela 4). Selen je usvojen pri dodatku koncentracije natrijum selenita u koncentraciji selena od 10 i 25 mg L⁻¹ u veoma visokom procentu (43.66 i 52.05 % redom), tako da je dobijena biomasa sa visokim sadržajem selena, oko 2310.00 i 6707.00 µg g⁻¹. Sa druge strane, kada je natrijum selenat primenjen, ostvaren je znatno niži stepen usvajanja od 7.01 % (Tabela 4). Da bi došlo do usvajanja selena, selenati se prvo moraju redukovati do selenita, a da bi se ovaj proces ostvario neophodna je aktivnost nekoliko enzima (Kieliszek et al., 2015).

Micelijum submerzno gajene gljive *Ganoderma lucidum* je takođe pokazao izuzetnu sposobnost akumulacije selena, tako da je njegov sadržaj u micelijumu iznosio čak 5000 µg g⁻¹ računato na suhu masu gljive. Poređenjem sa drugim submerzno gajenim gljivama u tečnoj podlozi sa dodatkom selena (*Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes* i *Hericiium erinaceus*) utvrđeno je da je *G. lucidum* znatno efikasnije usvojila selen iz tečne podloge (Shang i Wang, 1999). Prema Zhao i saradnicima (2008) *G. lucidum* je u stanju da usvoji između 20 i 30 % selena iz podloge i inkorporira ga u proteine i polisaharide.

Merenjem prinosa biomase gljive tokom rasta u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (Tabela 4), uočen je toksični efekat primenjenog jedinjenja. Dodatak 2.5 puta veće koncentracije selena u podlogu je skoro otrovao njegov sadržaj u micelijumu, ali je i značajno smanjio prinos biomase. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljivanim rezultatima od strane drugih naučnika. Naime, Malinowska i saradnici (2009) su primetili značajno inhibitorno dejstvo natrijum selenita na rast gljive *Hericiium erinaceum* u tečnoj kulturi kada je dodat u koncentraciji od 100 mg Se L⁻¹. Sa druge strane, koncentracija od 25 mg Se L⁻¹ nije imala značajan uticaj na prinos biomase. Milovanović i saradnici (2014) su takođe

ispitivali uticaj koncentracije dodatog selena na prinos biomase i apsorbciju selena u micelijumu gljive *Pleurotus ostreatus*. Zaključeno je da se optimalna koncentracija selena za istovremeno najbolji prinos biomase kao i usvajanje selena nalazi u opsegu od 15 do 20 mg L⁻¹. Primena natrijum selenata za obogaćenje bujona za gajenje je imala znatno manji uticaj na prinos biomase gljive (Tabela 4), što je u skladu sa nižim (statistički značajno, $p \leq 0.05$) sadržajem usvojenog selena.

Istovremeno, znatno bolja akumulacija selena i prinos biomase su ostvareni kada su primenjeni organski izvori selena (Tabela 5). Ranija istraživanja su pokazala da se selenourea u vodenim rastvorima razgrađuje veoma sporo (Pan et al., 2007; Yamashita et al., 2010). To može biti jedan od uzroka slabijeg uticaja selenouree na prinos biomase gljive uprkos visokoj akumulaciji selena. Takođe, tokom degradacije, selenourea oslobađa selenid jon (S²⁻) (Yamashita et al., 2010). Da bi se selenati i seleniti metabolisali do selenoaminokiselina, oni se prvobitno moraju redukovati do selenida. Selenidi reaguju sa aminokiselinom serin i stvaraju selenocistein, koji se dalje metaboliše do drugih organskih jedinjenja selena uključujući i selenometionin (Thavarajah i Combs 2013).

Dodatak selenouree u tečnu podlogu statistički značajno ($p \leq 0.05$) je uticao na prinos biomase poređenju sa kontrolnim uzorkom, ali je primećeno da je rast značajno manje inhibiran u poređenju sa primenom natrijum selenita (Tabela 5). Takođe, kao i kod dodatka natrijum selenita u tečnu podlogu za gajenje, uzorci obogaćeni selenouream su bili svetlo roze do tamno crvene boje, u zavisnosti od primenjene koncentracije. Gljiva je pokazala visoku sposobnost za usvajanje selena iz ovog izvora tako da je pri koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ usvojila 46.08 % dodatog selena a pri koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ 39.10 %. Dobijeni procenat za nižu koncentraciju je uporediv sa procentom dobijenim za selenit, međutim kod više koncentracije, procenat usvajanja je pao za oko 13 %. Ipak, selenourea se pokazala kao povoljniji izvor budući da je ispoljila znatno niži uticaj na rast i prinos biomase gljive.

Tabela 5. Prinos biomase i rezultati usvajanja selena iz organskih izvora u micelijum submerzno gajene gljive *C. versicolor*.

Organski izvor Se	Koncentracija mg Se L ⁻¹ tečne podloge	Oznaka uzorka	Sadržaj selena (µg g ⁻¹ suve mase)*	Prinos biomase (g L ⁻¹ tečne podloge)
Kontrola		K sub**	0.81±0.55 a***	6.63±0.31 ^a
Selenourea	10	SU 10 sub	1028.65±59.89 ^b	4.48±0.55 ^b
	25	SU 25 sub	2084.00±362.04 ^c	4.69±0.47 ^b
Sel-Plex®	10	SP 10 sub	573.80±90.93 ^d	2.39±0.53 ^c
	25	SP 25 sub	1200.00±219.20 ^b	4.67±0.67 ^b

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).

Ksub-kontrolni uzorak; SU 10 sub, SU 25 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub, SP 25 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); *Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Pri primeni Sel-Plex®-a kao izvora selena, rast biomase gljive je bio značajno inhibiran (Tabela 5). Međutim, neočekivano, dodatak Sel-Plex®-a u većoj koncentraciji (25 mg Se kg⁻¹) je znatno manje uticao na prinos biomase. Dobijeni podaci su u skladu sa eksperimentalnim rezultatima koje su dobili Savić i saradnici (2016), a koji su pokazali inhibitorno dejstvo Sel-Plex®-a na rast gljive *Lentinus edodes*. Gljiva je i u ovom slučaju pokazala kapacitet da usvoji dodati selen, međutim u poređenju sa selenoureom, apsorbovala je oko 50 % manje dodatog selena. Gljiva je usvojila 13.71 % (10 mg Se L⁻¹) odnosno 22.42 % (25 mg Se L⁻¹) od selena dodatog u obliku selenskog kvasca. Takođe, nije uočena statistički značajna razlika (p≤0.05) između sadržaja selena u micelijumu gljive kada su selenourea i Sel-Plex® dodati u tečnu podlogu u koncentraciji od 10 mg Se mL⁻¹ (Tabela 5).

Micelijum gljive ima sposobnost da akumulira razne elemente, uključujući i teške metale. Na taj način plodonosna tela gljiva akumuliraju znatno više koncentracije od onih na kojima rastu. Teški metali se transportuju kroz

unutrašnjost ćelije i cirkulišu kroz čitav micelijum, a gljiva svojom metabolitskom aktivnošću teži da smanji njihovu toksičnost (na primer sintezom proteina koji sadrže metale u svojoj strukturi ili aktivnim transportom). Takođe, polisaharidne strukture ćelijskog zida gljive, kao što je na primer hitin, imaju sposobnost vezivanja metala za funkcionalne grupe (fosfatne, amino, karboksilne grupe). Usvajanje i sadržaj teških metala u plodonosnim telima nekih gljiva zavise od ekoloških faktora i od specifičnih genetskih osobina određene vrste. Od vrste i sastava zemljišta zavisi mobilnost i dostupnost metala, pa gljive u zavisnosti od karakteristika supstrata na kome micelijum raste razvijaju manji ili veći kapacitet za usvajanje metala. Prisustvo specifičnih proteina i drugih makromolekula uključenih u vezivanje i transport metala je faktor odgovoran za akumulacioni kapacitet svake vrste, a koji zavisi upravo od genetskih karakteristika gljive (Campos et al., 2009; Gadd, 2004). Usvajanje i akumulacija jedinjenja selena ne zavise samo od vrste gljive i ekoloških uslova rasta već i od oblika i koncentracije selena u okruženju (Poluboyarinov et al., 2009). Zbog toga se submerznim postupkom gajenja gljive u bioreaktoru, eliminiše mogućnost nekontrolisane promene ekoloških uslova, što obezbeđuje znatno kontrolisanije okruženje a samim tim i usvajanje selena. Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da su plodonosna tela gljive pokazala nešto veći afinitet ka usvajanju selena iz organskih izvora, osim kada je dodata najniža koncentracija selena (10 mg Se kg^{-1}). Budući da nije bilo velikih razlika u prinosu biomase i sadržaju usvojenog selena u plodonosnim telima gljive pri dodatku natrijum selenita i natrijum selenata (Tabela 2), odlučeno je da se u nastavku eksperimenata analizira samo $\text{SeO}_3^{2-} \cdot 10 \text{ PT}$, od uzoraka plodonosnih tela obogaćenih neorganskim jedinjenjima. Takođe, budući da je usvajanje natrijum selenata u submerznoj kulturi bilo znatno slabije u poređenju sa natrijum selenitom (Tabela 4), u narednim eksperimentima je analiziran uzorak $\text{SeO}_3^{2-} \cdot 10 \text{ sub}$ od uzoraka micelijuma gljive dobijenih gajenjem u tačnoj podlozi obogaćenoj neorganskim izvorima selena.

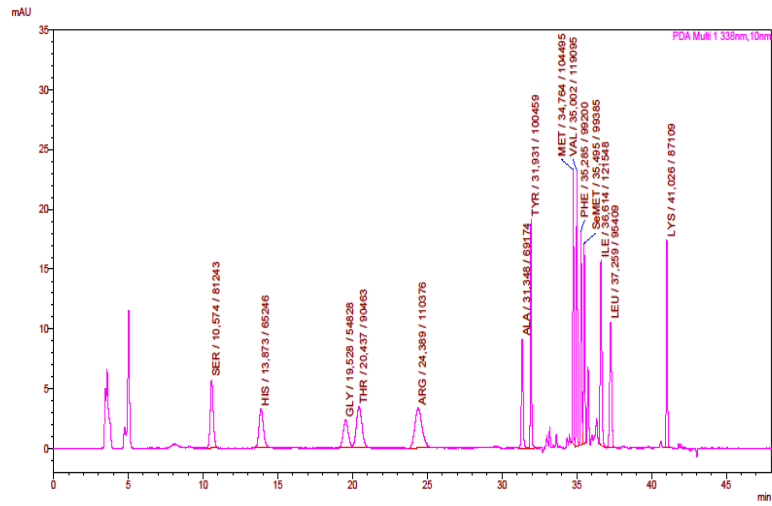
5.3 Određivanje aminokiselinskog sastava gljive *Coriolus versicolor* obogaćene selenom

Jedan od glavnih ciljeva postavljenih u ovoj disertaciji je utvrđivanje aminokiselinskog sastava dobijenih uzoraka plodonosnih tela i micelijuma obogaćenih selenom. Budući da mnoga jedinjenja koja sadrže selen nisu isparljiva, HPLC analitička tehnika je prema literaturnim podacima najčešće korišćena za određivanje aminokiselinskog sastava gljiva. Svojstveno tehnicu separacije i identifikacije pomoću HPLC-a je to što omogućava separaciju analita uz jedan uslov, a to je da su rastvorljivi u odgovarajućem rastvaraču ili smeši rastvarača. HPLC tehnici je takođe svojstvena reproducibilnost separacije, koja često nedostaje drugim tehnikama za analizu aminokiselinskog sastava, kao na primer kapilarnoj elektroforezi (B'Hymer i Caruso, 2006). Pre hromatografskog razdvajanja, analiti se moraju ekstrahovati iz čvrstih uzoraka prema odgovarajućoj proceduri (Montes-Bayón et al., 2006). U ovoj disertaciji izvršena je analiza sadržaja 17 aminokiselina, od kojih šest pripadaju esencijalnim aminokiselinama, a dve selenoaminokiselinama i to L-selenometionin (SeMet) i seleno-metil-seleno-L-cistein (MeSeCys). Prema literaturnim podacima za analiziranje selenoaminokiselina HPLC separacija se takođe u literaturi navodi kao najbolja metoda (Pedrero i Madrid, 2009). Na ovaj način izvršena je uspešna separacija komponenti smeše standarda aminokiselina pa su dalje analize radjene pod uslovima analize standarda (odjeljak 4.3.2). Hromatogram koncentrovane smeše standarda aminokiselina dobijen sa HPLC aparata prikazan je na Grafiku 2, a na Grafiku 3 hromatogram Se-metil-seleno-L-cisteina (MeSeCys), dok su ostali dobijeni izvorni hromatogrami dobijeni sa HPLC uređaja na kojima je prikazan ukupan aminokiselinski sastav i sastav selenoaminokiselina dati u Prilogu A i u Prilogu B.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

2016-08-01 15:05:34 Page 1 / 2

Sample Name : AA st 0,10000 pr 1
 Sample ID : AA st 0,10000 pr 1
 Data Filename : 2016-04-05_2014_11_AA st 0,10000 pr 1_010.lcd
 Method Filename : AA OPA deriv, 16-24 line ver, 30.01.2014.lcm
 Batch Filename : AA standards 2016.lcb
 Vial # : 1-19
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Standard

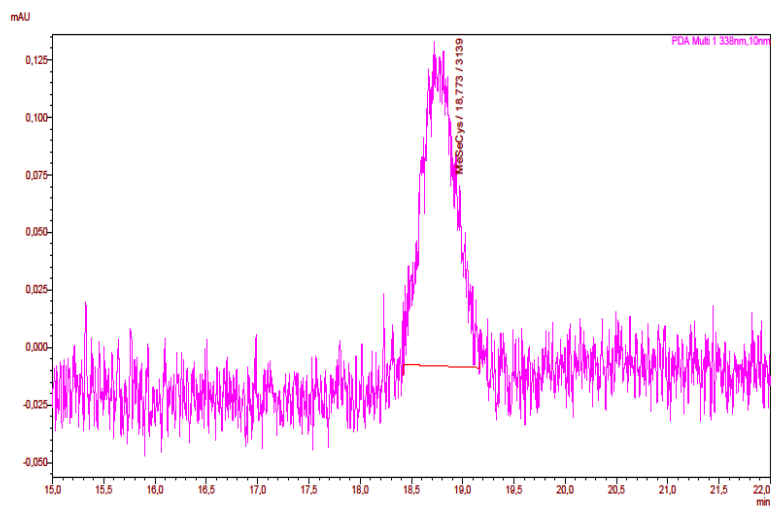


C:\LabSolutions\Data\Aminokwasny Serbia\Dunja\AA standards\2016-04-05_2014_11_AA st 0,10000 pr 1_010.lcd

Grafik 2. Hromatogram koncentrovane smeše aminokiselinskog standarda.

2016-08-08 17:58:07 Page 1 / 12

Sample Name : Std MeSeCys r2048
 Sample ID : pr 1
 Data Filename : 2016-08-22_1636_45_Std MeSeCys r2048_pr 1_001.lcd
 Method Filename : AA OPA deriv, MeSeCys 91-99 line ver, 19.05.2016.lcm
 Batch Filename : Samples MeSeCys 06.2016.lcb
 Vial # : 1-93
 Injection Volume : 20 uL
 Sample Type : Unknown



Grafik 3. Hromatogram standarda seleno-metil-seleno-L-cisteina.

5.3.1 Aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

5.3.1.1 Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

U Tabeli 6 je prikazan ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor*. Svi ispitivani uzorci su imali najviši sadržaj L-glutaminske kiseline, L-treonina, L-glicina i L-asparaginske kiseline. Sadržaj ovih aminokiselina u kontrolnom uzorku (K PT) je iznosio oko 26.81, 26.31, 24.61 i 22.74 mg g⁻¹ respektivno. Takođe, u kontrolnom uzorku su detektovane značajne količine L-leucina, oko 16.39 mg g⁻¹, i L-alanina, oko 14.03 mg g⁻¹. Gljiva je imala najniži sadržaj L-metionina (od 1.37 do 1.69 mg g⁻¹), L-histidina (od 3.37 do 4.52 mg g⁻¹) i L-tirozina (od 4.32 do 5.36 mg g⁻¹). Visok sadržaj asparaginske i glutaminske kiseline, a nizak sadržaj metionina utvrđen je i u proteinima gljive *G. lucidum* (Zhao et al., 2004; Du et al., 2007). Analizom je utvrđeno da je dodatak Sel-Plex®-a (25 uticao (p≤0.05) na povećanje sadržaja četiri aminokiseline, i to L-arginina, L-lizina i L-glutaminske kiseline i L-glicina (uzorak SP 10 PT). Sadržaj ostalih aminokiselina nije se statistički značajno razlikovao u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Interesantno, dodatak veće koncentracije Sel-Plex®-a u supstrat za gajenje nije statistički značajno (p≤0.05) uticao na aminokiselinski profil gljive u poređenju sa nižom koncentracijom.

Analizom aminokiselinskog profila gljive obogaćene selenouream ustanovljeno je da je smanjen sadržaj (p≤0.05) L-asparaginske kiseline, L-glutaminske kiseline i L-histidina u poređenju sa kontrolnim uzorkom, dok je sadržaj ostalih aminokiselina bio nepromenjen.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 6. Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena (mg g^{-1}).

Aminokiselina	Sadržaj aminokiselina izražen u mg g^{-1} suve mase plodonosnih tela *					
	K PT**	SU 10 PT	SU 25 PT	SP 10 PT	SP 25 PT	SeO ₃ ²⁻ 10 PT
L-asparaginska kiselina	22.74±1.07 ^{a***}	21.06±0.48 ^b	20.68±0.52 ^b	23.74±1.60 ^a	23.97±0.44 ^a	18.52±0.44 ^c
L-glutaminska kiselina	26.81±0.97 ^{a,c}	24.06±0.53 ^b	25.44±0.70 ^{a,b}	28.25±1.87 ^{c,d}	29.38±0.38 ^d	21.63±0.39 ^e
L-serin	12.51±1.00 ^{a,b}	11.68±0.24 ^a	11.94±0.27 ^a	13.56±0.95 ^b	13.38±0.15 ^b	10.13±0.40 ^c
L-histidin	4.15±0.20 ^{a,c}	3.69±0.07 ^{b,d}	3.97±0.17 ^{b,c}	4.36±0.42 ^a	4.52±0.11 ^a	3.37±0.11 ^d
L-glicin	24.61±2.79 ^{a,c}	26.02±0.44 ^{a,c}	27.17±0.43 ^{a,c}	30.61±2.72 ^b	28.49±0.61 ^{b,c}	21.06±0.49 ^e
L-treonin ⁺	26.31±1.73 ^{a,b}	24.20±0.20 ^a	24.69±0.42 ^a	27.32±1.55 ^b	27.42±0.51 ^b	20.67±1.34 ^c
L-arginin	9.26±0.60 ^{a,b}	9.33±0.47 ^{a,c}	8.34±0.49 ^{b,e}	10.31±0.94 ^{c,d}	10.65±0.10 ^d	7.42±0.37 ^e
L-alanin	14.03±1.34 ^{a,b}	13.72±0.42 ^a	13.95±0.17 ^a	15.65±1.35 ^b	14.97±0.24 ^{a,b}	11.05±0.51 ^c
L-tirozin	5.11±0.24 ^{a,b}	5.10±0.65 ^{a,b}	4.64±0.33 ^{a,c}	5.36±0.33 ^b	5.01±0.09 ^{b,c}	4.32±0.22 ^d
L-metionin ⁺	1.63±0.12 ^a	1.69±0.11 ^a	1.65±0.06 ^a	1.65±0.07 ^a	1.37±0.31 ^a	1.37±0.34 ^a
L-valin ⁺	10.72±0.53 ^{a,b}	10.30±0.26 ^a	10.25±0.23 ^a	11.47±0.95 ^b	11.43±0.55 ^b	8.68±0.17 ^c
L-fenilalanin ⁺	9.62±0.45 ^{a,c}	9.08±0.35 ^{a,b}	8.90±0.21 ^b	10.02±0.57 ^c	9.93±0.15 ^c	7.98±0.26 ^d
L-izoleucin ⁺	7.74±0.41 ^{a,b}	7.45±0.22 ^a	7.48±0.17 ^{a,c}	8.30±0.79 ^{b,c}	8.21±0.51 ^{b,c}	6.31±0.19 ^d
L-leucin ⁺	16.39±0.89 ^{a,b}	15.36±0.17 ^a	15.27±0.26 ^a	17.16±1.35 ^b	17.05±0.45 ^b	13.37±0.25 ^c
L-lizin ⁺	9.41±0.85 ^a	10.19±0.19 ^{a,b}	10.58±0.16 ^{b,c}	11.30±1.08 ^c	11.47±0.42 ^c	7.79±0.43 ^d
EAA/NEAA ^{**}	0.69±0.01 ^a	0.68±0.01 ^a	0.68±0.01 ^a	0.64±0.05 ^a	0.60±0.11 ^a	0.68±0.01 ^a
EAA/TAA (%) ^{***}	40.68±0.31 ^a	40.57 ±0.32 ^a	40.44±2.15 ^a	38.82±1.93 ^a	37.35±4.62 ^a	40.42±0.28 ^a

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT - kontrolni uzorak; SU 10 PT, SU 25 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom selenoureom (10 i 25 mg Se kg^{-1}); SP 10 PT, SP 25 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom Sel-Plex[®]-om (10 i 25 mg Se kg^{-1}); SeO₃²⁻ 10 PT - plodonosna tela rasla na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg^{-1}). ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Fisher's LSD. +Esencijalna aminokiselina. **Količnik esencijalnih (EAA) i neesencijalnih aminokiselina (NEAA). ***Procentualni odnos esencijalnih (EAA) i ukupnih aminokiselina (TAA).

Dodatak veće koncentracije selenouree (25 mg Se kg^{-1}) uticao je ($p \leq 0.05$) jedino na smanjenje sadržaja L-arginina. Međutim, poređenjem uticaja dva organska jedinjenja kojima je supstrat obogaćen na aminokiselinski sastav gljive (Tabela 6), uočene su značajnije razlike budući da je selenourea statistički značajno uticala ($p \leq 0.05$) na smanjenje sadržaja dvanaest (SU 10 PT i SP 10 PT) odnosno devet od petnaest aminokiselina (SU 25 PT i SP 25 PT).

Dodatkom natrijum selenita (Tabela 6), u supstrat za gajenje došlo je do značajnog smanjenja ($p \leq 0.05$) sadržaja svih aminokiselina u poređenju sa kontrolnim i uzorcima obogaćenim Sel-Plex[®]-om, osim L-metionina čiji je sadržaj ostao nepromenjen. Poređenjem uzoraka SeO_3^{2-} 10 PT i SU 10 PT uočeno je da nije došlo do promene u sadržaju L-metionina i L-histidina, a nisu uočene značajne razlike ($p \leq 0.05$) u sadržaju L-arginina i L-metionina između uzorka SeO_3^{2-} 10 PT i SU 25 PT.

Ipak, bez obzira na izvesne pomenute razlike među analiziranim uzorcima, prema podacima prikazanim u Tabeli 6, utvrđeno je da nije došlo do statistički značajne ($p \leq 0.05$) promene odnosa esencijalnih prema ukupnim aminokiselinama (EAA/TAA) kod svih ispitivanih uzoraka. Taj odnos se nalazio u opsegu između 0.60 i 0.69 i nije se statistički značajno razlikovao od uzorka do uzorka. Prema FAO/WHO, preporučena referentna vrednost količnika EAA/NEAA iznosi 0.6, što ukazuje da dodatak seleno u tom smislu nije imao negativan uticaj na aminokiselinski sastav gljive (Ohtsuka et al., 1973).

5.3.1.2 Sadržaj L-selenometionina plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima seleno

Sadržaj L-selenometionina u uzorcima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* dat je u Tabeli 7. U kontrolnom uzorku (K PT) selenometionin nije detektovan. Sa porastom koncentracije seleno u plodonosnom telu sadržaj selenometionina je rastao. Najveći sadržaj selenometionina utvrđen je u uzorcima SU 25 PT

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

($105.27 \pm 8.54 \mu\text{g g}^{-1}$) i SP 25 PT ($91.22 \pm 14.76 \mu\text{g g}^{-1}$). Nije utvrđena statistički značajna razlika ($p \leq 0.05$) u sadržaju selenometionina pri upotrebi najniže testirane koncentracije (10 mg Se kg^{-1}) bilo da je reč o organskom ili neorganskom jedinjenju upotrebljenom za obogaćenje supstrata.

Tabela 7. Sadržaj L-selenometionina u plodnosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak	Sadržaj L-selenometionina u plodnosnom telu gljive*	
	SeMet ($\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase)	% Se usvojenog u obliku SeMet
K PT**	n.d***	/
SU 10 PT	$74.47 \pm 14.83^{a,c****}$	83.68 ± 14.12^a
SU 25 PT	105.27 ± 8.54^b	43.27 ± 2.59^b
SP 10 PT	$59.65 \pm 3.73^{a,c}$	67.10 ± 1.81^c
SP 25 PT	$91.22 \pm 14.76^{a,b}$	39.25 ± 5.58^d
SeO ₃ ²⁻ 10 PT	71.99 ± 8.18^c	67.98 ± 4.30^c

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). **K PT - kontrolni uzorak; SU 10 PT, SU 25 PT - plodnosna tela rasla na supstratu obogaćenom selenoureom (10 i 25 mg Se kg^{-1}); SP 10 PT, SP 25 PT-plodnosna tela rasla na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se kg^{-1}); SeO₃²⁻ 10 PT-plodnosna tela rasla na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg^{-1} .)***Nije detektovano. ****Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, $p \leq 0.05$, ANOVA, Fisher`s LSD.

Kada se rezultati izraze u procentima selena sadržanog u obliku selenometionina u odnosu na ukupan sadržaj selena u gljivi (Tabela 7), uočava se da je uzorak SU 10 PT inkorporirao selen u selenometionin u najvećem procentu (oko 83.68 %) a zatim, slede uzorak SeO₃²⁻ 10 PT (oko 67.98 %) i uzorak SP 10 PT (oko 67.10 %). Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima na micelijumu gljive

Lentinus edodes koja su pokazala da se pri nižim sadržajima selena u gljivi skoro 70 % selena usvaja u obliku selenometionina (Turlo et al., 2007).

Takođe, primećeno je da više koncentracije organskih jedinjenja negativno utiču na procentulani sadržaj selena u obliku selenometionina. Tako je obogaćenje supstrata selenoureom u 2.5 puta višoj koncentraciji selena procentualno smanjilo ugradnju selena u selenometionin za oko 40 %, dok je isto povećanje koncentracije selena dodatkom Sel-Plex®-a imalo nešto slabiji uticaj, pa je sadržaj SeMet smanjen za oko 27 % (Tabela 7).

Prema literaturnim podacima sadržaj selenometionina u gljivi *G. lucidum* je opadao kako je sadržaj selena u gljivi rastao. Ovakav rezultat je ukazao na to da visok sadržaj selena u gljivi inhibira sintezu selenometionina. Takođe, pokazano je da neorganski selen u gljivi ispoljava dualnu prirodu odnosno u nižim koncentracijama stimuliše, a u višim koncentracijama inhibira sintezu selenometionina (Zhao et al., 2004). Istraživanja na selenom obogaćenim gljivama su pokazala da je SeMet dominantan oblik selena prisutan u gljivama, sa veoma dobrom biološkom dostupnošću (Rayman et al., 2008). Takođe, pokazano je da vodeni ekstrakt gljive *Lentinus edodes* obogaćene natrijum selenatom sadrži SeMet koji je najverovatnije vezan za proteine gljive (Ogra et al., 2004).

5.3.2 Aminokiselinski sastav micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

5.3.2.1 Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

U poređenju sa sadržajem aminokiselina u plodonosnom telu gljive (KPT), submerzno gajeni micelijum (K sub) je bio bogatiji u svim analiziranim aminokiselinama (Tabela 8). Aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* je bio sličan aminokiselinskom sastavu micelijuma gljive *Pleurotus cornucopiae*.

Gljiva *C. versicolor* je imala viši sadržaj deset od četrnaest poređenih aminokiselina, a najveće razlike su uočene kod sadržaja arginina i alanina, budući da je njihov sadržaj bio 8.5 odnosno 3.6 puta veći u micelijumu gljive *C. versicolor* (Meng et al., 2010). Micelijum gljive *C. versicolor* je imao najviši sadržaj L-glutaminske kiseline ($37.56 \pm 2.53 \text{ mg g}^{-1}$), a zatim slede L-glicin, L-asparaginska kiselina i L-treonin sa približno istim sadržajem. Visok sadržaj glutaminske i asparaginske kiseline, glutamata i aspartata detektovan je i kod gljiva roda *Pleurotus* (Wang et al., 2001; Kayode et al., 2015).

Dodatak selenouree u koncentraciji od 10 mg Se L^{-1} u tečnu podlogu za gajenje, doveo je do statistički značajnog ($p \leq 0.05$) povećanja sadržaja svih aminokiselina osim arginina i tirozina, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Njihov sadržaj je takođe bio viši, ali ne i statistički značajan. Budući da je selenourea diamid (formula selenouree $[\text{SeC}(\text{NH}_2)_2]$) ona je sa sobom u podlogu za gajenje takođe unela određenu dodatnu količinu azota, što je verovatno, takođe, uticalo na dobijanje povoljnijeg aminokiselinskog sastava dobijenog micelijuma (Wang et al., 2001; Danscher i Stoltenberg, 2006).

Primena više koncentracije selenouree (25 mg Se L^{-1}) je nepovoljno uticala na aminokiselinski sastav micelijuma. Naime, uzorak SU 25 sub je imao značajno niži ($p \leq 0.05$) sadržaj deset od analiziranih petnaest aminokiselina u poređenju sa SU 10 sub. Međutim važno je napomenuti da je u poređenju sa K sub, uzorak SU 25 sub imao niži sadržaj glutaminske kiseline, histidina, arginina i viši sadržaj valina, dok je sadržaj ostalih aminokiselina bio nepromenjen. Ipak, za oba testirana uzorka obogaćena selenouream, EAA/NEAA količnik se nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao u poređenju sa K sub. Takođe, udeo esencijalnih u ukupnim aminokiselinama koji je iznosio oko 39 % nije se statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Dodatak Sel-Plex®-a u tečnu podlogu za gajenje nije povećao ($p \leq 0.05$) sadržaj samo tri aminokiseline u uzorku SP 10 sub, i to serina, histidina i arginina čije su vrednosti ostale nepromenjene u poređenju sa K sub. Primećen je različiti uticaj viših koncentracija dva organska jedinjenja seleno na aminokiselinski sastav micelijuma.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 8. Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena (mg g^{-1}).

Aminokiselina	Sadržaj aminokiselina izražen u mg g^{-1} suve mase micelijuma*					
	K sub**	SU 10 sub	SU 25 sub	SP 10 sub	SP 25 sub	SeO ₃ ²⁻ 10 sub
L-asparaginska kiselina	27.17±2.54 ^{a,c***}	31.41±0.88 ^b	27.72±1.28 ^a	32.35±0.37 ^{b,c}	34.19±1.25 ^c	27.73±0.97 ^a
L-glutaminska kiselina	37.56±2.53 ^a	41.39±1.06 ^b	33.28±0.92 ^c	43.98±0.34 ^d	45.97±0.83 ^d	35.94±1.03 ^a
L-serin	16.17±2.08 ^a	18.78±0.77 ^b	16.33±1.55 ^a	17.13±0.36 ^{a,b}	13.99±0.81 ^{a,b}	16.46±1.10 ^{a,b}
L-histidin	6.84±0.59 ^{a,d}	7.84±0.25 ^b	5.10±0.45 ^c	7.18±0.27 ^{a,b,d}	6.96±0.54 ^d	5.19±0.40 ^{e,c}
L-glicin	28.82±4.85 ^a	36.41±1.85 ^{b,c}	31.37±3.52 ^{a,c}	34.94±1.07 ^{b,d}	37.81±4.27 ^b	30.65±2.56 ^d
L-treonin ⁺	26.80±3.76 ^a	31.78±0.96 ^{b,c}	30.16±3.09 ^{a,b}	31.31±1.26 ^{b,c}	33.85±2.22 ^b	28.31±1.48 ^{a,c}
L-arginin	14.44±1.53 ^{a,d}	15.44±1.16 ^a	12.44±1.44 ^b	15.59±0.56 ^a	19.00±0.80 ^c	13.15±0.51 ^{b,d}
L-alanin	20.00±3.22 ^a	23.94±1.11 ^b	21.48±2.60 ^{a,b}	25.04±0.54 ^{b,c}	26.26±2.25 ^b	18.40±1.69 ^a
L-tirozin	6.56±0.58 ^{a,b}	7.31±0.18 ^a	5.85±0.68 ^b	8.17±0.21 ^c	8.78±0.44 ^c	6.16±0.31 ^b
L-metionin ⁺	n.a.****	2.52±0.12 ^a	1.41±0.13 ^b	2.94±0.13 ^c	2.87±0.26 ^c	1.73±0.22 ^d
L-valin ⁺	12.56±1.03 ^a	14.58±0.50 ^b	13.76±0.87 ^b	20.00±0.09 ^c	19.98±0.54 ^c	12.56±0.59 ^a
L-fenilalanin ⁺	11.46±0.94 ^a	13.57±0.49 ^b	11.97±0.67 ^a	15.34±0.10 ^c	16.18±0.63 ^c	11.42±0.51 ^a
L-izoleucin ⁺	9.68±0.84 ^{a,e}	11.30±0.40 ^{b,c}	10.52±0.71 ^{a,c}	15.47±0.20 ^d	15.29±0.32 ^d	9.18±0.47 ^e
L-leucin ⁺	18.79±1.8 ^a	22.72±0.65 ^b	20.30±1.65 ^a	27.85±0.15 ^c	28.88±1.20 ^c	18.33±1.01 ^a
L-lizin ⁺	13.19±2.5 ^a	16.66±0.63 ^{b,c}	11.03±1.53 ^a	17.12±0.82 ^b	19.15±1.90 ^b	9.73±1.09 ^c
EAA/NEAA**	0.60±0.00 ^{a,d}	0.64±0.04 ^{a,b}	0.65±0.00 ^{a,b}	0.71±0.00 ^b	0.79±0.05 ^c	0.54±0.10 ^d
EAA/TAA (%)***	37.59±0.05 ^{a,d}	39.06±1.61 ^{a,b}	39.23±0.10 ^{a,b}	41.36±0.16 ^{b,c}	44.16±1.67 ^c	34.69±4.3 ^d

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **Ksub-kontrolni uzorak; SU 10 sub, SU 25 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouree (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub, SP 25 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex[®]-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Na₂SeO₃ (10 mg Se L⁻¹). ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher's LSD.****Nije analizirano.*Esencijalna aminokiselina. **Količnik esencijalnih (EAA) i neesencijalnih aminokiselina (NEAA). ***Procentualni odnos esencijalnih (EAA) i ukupnih aminokiselina (TAA).

Naime, dodatak veće koncentracije Sel-Plex[®]-a (25 mg Se L⁻¹) statistički značajno (p≤0.05) je uticao jedino na L-arginin, i to tako što je povećao njen sadržaj. Interesantno, veća koncentracija selenouree je dovela do smanjenja saržaja ove aminokiseline u uzorku. Visok sadržaj svih aminokiselina u uzorcima gajenim na Sel-Plex[®]-u se može pripisati uticaju visokog sadržaja azota i

aminokiselina poreklom od dodatog selenskog kvasca (Wang et al., 2001). Za uzorak SP 25 sub je ostvaren statistički značajno veći ($p \leq 0.05$) EAA/NEAA odnos (0.79) i udeo esencijalnih u ukupnim aminokiselinama (44.16 %) u poređenju sa svim testiranim uzorcima. Kada se upoređi uticaj dva organska jedinjenja iste koncentracije (10 mg Se L^{-1}) na sadržaj esencijalnih aminokiselina, uočava se da je SP 10 sub imao značajno ($p \leq 0.05$) viši sadržaj pet od sedam esencijalnih aminokiselina u odnosu na SU 10 sub (Tabela 8). Jedino se sadržaj lizina i treonina ova dva uzorka nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao. Razlika u sadržaju esencijalnih aminokiselina između SP 25 sub i SU 25 sub je bila još izraženija, budući da je SP 25 sub imao statistički značajno ($p \leq 0.05$) viši sadržaj svih aminokiselina osim treonina. Takođe, uočava se da je dobijen statistički značajno ($p \leq 0.05$) veći procentualni sadržaj esencijalnih aminokiselina u odnosu na ukupne (EAA/TAA (%)) za uzorak SP 25 sub u poređenju sa svim ostalim uzorcima. Za uzorak SP 10 sub ovaj odnos je takođe bio statistički značajno ($p \leq 0.05$) veći (0.71) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (0.60). Utvrđeno je da je udeo esencijalnih u odnosu na ukupne aminokiseline rastao sa porastom koncentracije organskog jedinjenja dodatog u supstrat. Viši sadržaj ($p \leq 0.05$) L-glutaminske i L-asparaginske kiseline uzoraka gajenih na Sel-Plex[®]-u u poređenju sa svim analiziranim uzorcima ukazuje na potencijalnu prednost ovih uzoraka pri eventualnoj primeni micelijuma kao aditiva u hrani. Naime, ove dve aminokiseline spadaju u grupu aminokiselina koje daju ukus sličan mononatrijum glutaminatu, što ukazuje na potencijalnu upotrebu gljive kao pojačivača ukusa. Takođe, svi uzorci su bili bogatiji u alaninu, glicinu, serinu i treoninu koje spadaju u grupu aminokiselina koje daju sladak ukus u odnosu na grupu aminokiselina (arginin, histidin, izoleucin, leucin, metionin i valin), koje daju gorak ukus (Beluhan i Ranogajec, 2011).

Dodatak natrijum selenita u supstrat za gajenje delovao je nepovoljno na aminokiselinski sastav gljive. Iako je uzorak imao statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži sadržaj samo tri aminokiseline (histidina, glicina i lizina), i viši sadržaj glicina, udeo esencijalnih u ukupnim aminokiselinama je statistički značajno opao za oko 4.57 do 9.47 % u poređenju sa ostalim obogaćenim uzorcima, a EAA/NEAA odnos je bio niži od 0.6, vrednosti preporučene od strane FAO/WHO (Ohtsuka et al.,

1973). Iste primenjene koncentracije organskih jedinjenja generalno gledano su dale povoljniji aminokiselinski sastav u odnosu na neorganski natrijum selenit.

5.3.2.2 Sadržaj L-selenometionina u micelijumu submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima seleno

Sadržaj L-selenometionina u micelijumu gajenom u tečnoj podlozi obogaćenoj selenom bio je značajno viši u poređenju sa onim u plodnosnim telima (Tabela 9). Utvrđena je različita sposobnost gljive da akumulira selen u obliku selenometionina kada su primenjena različiti izvori seleno za obogaćenje tečne podloge. Najviši sadržaj SeMet je utvrđen kod uzoraka raslim sa dodatkom Sel-Plex[®]-a. Sa porastom koncentracije Sel-Plex[®]-a u tečnoj podlozi, sadržaj SeMet u micelijumu je rastao (Tabela 9). Kada se uporede svi uzorci, najviši sadržaj je utvrđen kod uzorka SP 25 sub ($1478.30 \pm 263.71 \mu\text{g g}^{-1}$). Najviši procenat seleno usvojenog u obliku selenometionina imao je uzorak SP 10 sub, za kojeg je utvrđeno da čak 95 % usvojenog seleno sadrži u obliku selenometionina. Ovako dobra akumulacija je najverovatnije posledica visokog sadržaja selenometionina prisutnog u selenskom kvascu, od čak 63 % (EFSA, 2014), a koji je najverovatnije direktno usvojen od strane gljive. Sa druge strane, gljiva rasla u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureeom je pokazala znatno bolji kapacitet konverzije selenouree u SeMet pri nižoj koncentraciji. Ostvaren je statistički značajno ($p \leq 0.05$) veći sadržaj selenometionina u uzorku SU 10 sub u poređenju sa SU 25 sub. Kada se rezultati izraze procentualno, povoljniji uticaj niže koncentracije je bio još izraženiji. Naime, gljiva je ostvarila statistički značajno veći ($p \leq 0.05$) procenat ukupnog seleno prevedenog u selenometionin pri nižoj koncentraciji selenouree (uzorak SU 10 sub) od oko 31.23 % (Tabela 9).

Tabela 9. Sadržaj L-selenometionina u micelijumu gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak	Sadržaj L-selenometionina u micelijumu gljive <i>C. versicolor</i> *	
	SeMet ($\mu\text{g g}^{-1}$ suve mase)	% Se usvojenog u obliku SeMet
K sub**	n.a***	/
SU 10 sub	732.86 \pm 39.51 ^{a****}	31.23 \pm 4.47 ^a
SU 25 sub	605.63 \pm 82.12 ^b	11.69 \pm 0.19 ^b
SP 10 sub	1296.00 \pm 44.58 ^c	95.00 \pm 4.25 ^c
SP 25 sub	1478.30 \pm 263.71 ^c	49.42 \pm 2.85 ^d
SeO ₃ ²⁻ 10 sub	517.09 \pm 44.96 ^b	9.03 \pm 0.19 ^b

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). **Ksub-kontrolni uzorak; SU 10 sub, SU 25 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub, SP 25 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex® - om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub - micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Na₂SeO₃ (10 mg Se L⁻¹). ***Nije analizirano. ****Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p \leq 0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Sadržaj selenometionina u uzorku SeO₃²⁻ 10 sub je bio statistički značajno niži (p \leq 0.05) u odnosu na uzorak SU 10 sub i uzorke obogaćene Sel-Plex®-om. Ovi podaci ukazuju na potencijalan negativan uticaj natrijum selenita na sintezu selenometonina u poređenju sa organskim izvorima. Interesantno, nije uočena značajna razlika u sadržaju SeMet između uzoraka SeO₃²⁻ 10 sub i SU 25 sub.

Dobijeni podaci su u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja koje su dali Klimaszewska i saradnici (2016). Pri dodatku natrijum selenita u tečnu podlogu pri submerznom gajenju od 20 $\mu\text{g Se mL}^{-1}$, sadržaj SeMet u dobijenom micelijumu gljive *L. edodes* je iznosio 672 $\mu\text{g g}^{-1}$, a kada su dodate više koncentracije selena, biosinteza selenometionina je inhibirana (Klimaszewska et al., 2016). Takođe, ranije je pokazano da sa porastom koncentracije selena u micelijumu gljive opada procenat inkorporiranog selenometionina u ukupno

usvojenom selenu, što je potvrđeno i u ovoj disertaciji (Turło et al., 2007). Isti autori su pokazali da je za koncentracije selena u micelijumu gljive *L. edodes* iznad $400 \mu\text{g g}^{-1}$ procenat selenometionina iznosio tek oko 6 %. Rezultati prikazani u ovoj disertaciji (Tabela 9) pokazuju da je gljiva *C. versicolor* uspješnie sintetisala SeMet tokom rasta u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom, budući da je inkorporirala veći procenat SeMet (oko 9 %), uprkos visokoj akumulaciji selena u micelijumu, od čak oko $2310.00 \mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 4).

Rezultati dobijeni u ovoj tezi ukazuju na različit uticaj istog izvora selena na sposobnost iste gljive da sintetiše SeMet u različitim uslovima gajenja. Utvrđen je veliki potencijal organskog jedinjenja selenouree za proizvodnju selenom obogaćene gljive *C. versicolor* na čvrstom supstratu u poređenju sa ostalim testiranim izvorima selena. Takođe, utvrđeno je da je niža koncentracija selena (10 mg Se kg^{-1} , 10 mg Se L^{-1}) dodata kako u čvrstu, tako i u tečnu podlogu povoljnije uticala na sintezu SeMet nego kada su dodate više koncentracije selena. Veoma visoku inkorporaciju selena u SeMet ostvarili su i uzorci dobijeni gajenjem u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex®-a.

5.3.2.3 Sadržaj selenometil-seleno-L-cisteina u micelijumu submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Sadržaj selenometil-seleno-L-cisteina određen je u uzorcima micelijuma dobijenog submerznim gajenjem (Tabela 10). Postupak hladne ekstrakcije ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) sa 50 mM hlorovodoničnom kiselinom je izabran da bi se izbegla degradacija MeSeCys u dobijenom ekstraktu. Ova aminokiselina je stabilna na sobnoj temperaturi, međutim ekstrakcija na visokim temperaturama dovodi do značajnih gubitaka (Klimaszewska et al., 2016). Ranije je pokazano da neke biljke koje se smatraju akumulatorima selena, sadrže MeSeCys kao jednu od glavnih aminokiselina sa selenom.

Tabela 10. Sadržaj Se-metil-seleno-L-cisteina u micelijumu gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak	Sadržaj Se-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> *	
	MeSeCys (ng g ⁻¹ suve mase)	% Se usvojenog u obliku MeSeCys
K sub**	n.a***	/
SU 10 sub	2044.48±63.53 ^{a****}	0.09±00 ^a
SU 25 sub	2725.58±413.68 ^b	0.05±00 ^b
SP 10 sub	897.52±142.08 ^c	0.07±0.01 ^c
SP 25 sub	1214.86±325.17 ^d	0.04±0.010 ^d
SeO ₃ ²⁻ 10 sub	n.d.****	/

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **Ksub-kontrolni uzorak; SU 10 sub, SU 25 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub, SP 25 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub-micelijum gajen u tečnoj podlozi obogaćenoj Na₂SeO₃ (10 mg Se L⁻¹). ***Nije analizirano.****Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. **** Nije detektovano.

Pri sadržaju selenometionina u micelijumu gljive višem od 300 µg g⁻¹ i sadržaju ukupnog selena višem od 1100 µg g⁻¹, primećuju se toksični efekti selena koji dovodi do značajene inhibicije rasta micelijuma (Turlo et al., 2010b). Akumulacijom selena u obliku neproteinske selenoaminokiseline MeSeCys, sprečavaju se toksični efekti koji prate prekomernu ugradnju SeMet i SeCys u proteine (Terry et al., 2000). Takođe, potvrđeno je da se višak selena eliminiše redukcijom do elementarnog selena (Tsvileva et al., 2012). Svi testirani uzorci u kojima je detektovan MeSeCys su imali statistički značajno različit (p≤0.05) sadržaj ove aminokiseline (Tabela 10). Od selenom obogaćenih uzoraka jedino kod uzorka SeO₃²⁻ 10 sub prisustvo MeSeCys nije detektovano (Tabela 10, hromatogram dat u prilogu B). Sadržaj MeSeCys je rastao sa porastom sadržaja selena u tečnoj podlozi

za gajenje. Najviši sadržaj je detektovan u uzorku SU 25 sub ($2725.58 \pm 413.68 \text{ ng mg}^{-1}$), i to 2.26 puta veći u poređenju sa SP 25 sub. Ranije je pokazano da verovatno postoji visoka korelacija između sadržaja MeSeCys u micelijumu gljive i poboljšane sinteze SeMet (Klimaszewska et al., 2016). Dobijeni rezultati su u skladu sa tim, budući da je sa porastom procenta ukupnog sadržaja Se u micelijumu inkorporiranog u obliku SeMet rastao i procentualni sadržaj ukupnog selena inkorporiranog u obliku MeSeCys.

MeSeCys je detektovana i u gljivama *Agaricus bisporus* i *Lentinus edodes*, a uočeni su pikovi poreklom od neorganskih jedinjenja selena kao i od SeMet i SeCys (Gergely et al., 2006). Utvrđen je statistički značajno ($p \leq 0.05$) različit procenat akumuliranog MeSeCys u odnosu na ukupan selen kod svih testiranih uzoraka. Procenat je opadao sledećim redosledom: SU 10 sub > SP 10 sub > SU 25 sub > SP 25 sub.

5.4 Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata gljive *Coriolus versicolor*

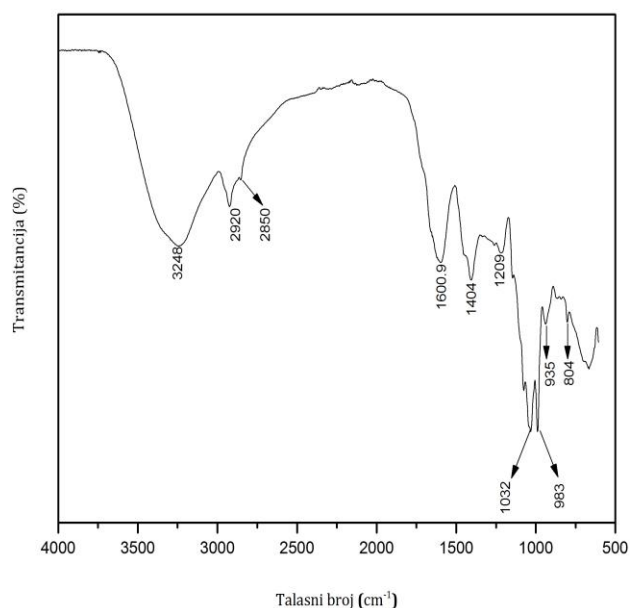
5.4.1 FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

Kvalitativna analiza hemijskog sastava ekstrakata dobijenih metanolnom ekstrakcijom biomase micelijuma gljive *C. versicolor* urađena je pomoću FTIR (Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom) spektroskopije. Ova metoda omogućava dobijanje informacija o velikom broju jedinjenja, uključujući i informacije o kvalitativnom, kvantitativnom, fizičkom i hemijskom sastavu. Dobijeni spektar daje informacije o prisustvu proteina, masnih kiselina, ugljenih hidrata, nukleinskih kiselina i lipopolisaharida detekcijom prisustva NH, CO, CC, CH, CH₂, OH i drugih hemijskih grupa. Pozicija u spektru apsorpcionih maksimuma prisutnih veza je specifična za određenu funkcionalnu grupu prisutnu u uzorku, tako da svaki uzorak ima jedinstveni spektar odnosno spektar koji se dobija je „otisak prsta“ svakog uzorka ponaosob (Ruthes et al., 2015).

5.4.1.1 FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rase na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Svi uzorci ekstrakata plodonosnih tela gljive dali su spektre sa vrlo malim razlikama u položaju traka koje potiču od dominantnih komponentni u ekstraktu kao što su polisaharidi, gluklan i proteini.

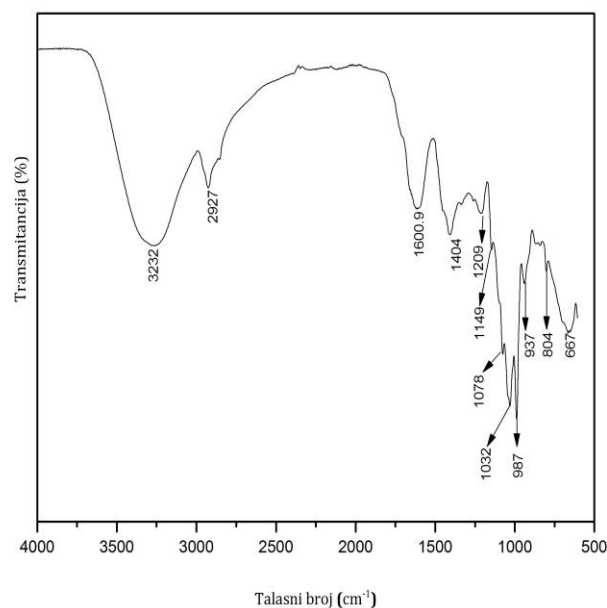
FTIR spektar kontrolnog uzorka (KPT_{eks}) prikazan je na Grafiku 4. Najistaknutija traka uočena je na oko 3248 cm⁻¹ i potiče od O-H vibracija istezanja glukozidnih veza (Rodrigues et al., 2017). Slabe veze koje su detektovane na oko 2920 cm⁻¹ i 2850 cm⁻¹ verovatno potiču od prisustva masnih kiselina u uzorku. Dobijeni pikovi su znatno manje izraženi u poređenju sa literaturnim podacima za ekstrakte submerzno gajenih uzoraka (Rodrigues et al., 2017). Apsorpcioni maksimum trake na 1600.9 cm⁻¹ se može pripisati produktima degradacije proteina vezanih za polisaharide (Synytsya et al., 2009).



Grafik 4. FTIR spektar metanolnog ekstrakta KPT_{eks} plodonosnih tela gljive *C. versicolor*.

Traka na oko 1400 cm^{-1} se dovodi u vezu sa prisustvom proteinskih struktura u uzorku, odnosno kompleksa glukan-protein, ali takođe može da ukaže i na prisustvo uronskih kiselina, odnosno O-C=O vibracije savijanja (Rodrigues et al., 2017). Polisaharidni region obuhvata opseg između 1200 cm^{-1} i 900 cm^{-1} (Fischer et al., 2006). Generalno, dobijeni spektar uzorka KPT_{eks} iz opsega od 1200 cm^{-1} do 750 cm^{-1} je veoma kompleksan, pa je određivanje α - odnosno β - konfiguracija prisutnih glukana znatno teže. U svim uzorcima je primećeno preklapanje nekoliko traka u opsegu između 1150 cm^{-1} i 1078 cm^{-1} . Ove trake se odnose na prisustvo glukozidne veze β -d-glukana u uzorku i ukazuju na veći sadržaj β -d-glukana (Šandula et al., 1999; Alzorqi et al., 2017). Oštra traka na $\approx 1032\text{ cm}^{-1}$ verovatno ukazuje na prisustvo α -glukana u ekstraktu (Kozarski et al., 2012b; Ren et al., 2014). Apsorpciona trake sa maksimumom na oko 985 cm^{-1} pripadaju polisaharidnom regionu (Fischer et al., 2006). U spektru anomernih konfiguracija polisaharida (od 950 cm^{-1} do 750 cm^{-1}) detektovani su pikovi na oko 935 cm^{-1} (najverovatnije C-O tj, O-CH₂ vibracije istezanja). Traka na oko 804 cm^{-1} najverovatnije potiče od prisustva monosaharida manoze (Wang et al., 2011b; Alzorqi et al., 2017; Rodrigues et al., 2017).

Dobijeni spektar (Grafik 5) metanolnog ekstrakta gljive gajene na supstratu obogaćenom neorganskim selenom ($\text{SeO}_3^{2-} \cdot 10\text{ PT}_{\text{eks}}$) nije pokazao značajnije razlike u odnosu na predhodno opisani spektar KPT. Dobijene su apsorpcione trake karakteristične za prisustvo polisaharida kao što su široka traka na oko 3230 cm^{-1} (vibracije vodoničnih veza OH grupa), trake na oko 1150 cm^{-1} , 1076 cm^{-1} , intenzivna apsorpciona traka na $\approx 1032\text{ cm}^{-1}$ (α -glukani), (Kozarski et al., 2012b; Ren et al., 2014). $\text{SeO}_3^{2-} \cdot 10\text{ PT}$ apsorpcioni maksimum trake je na 1600.9 cm^{-1} može se pripisati produktima degradacije proteina vezanih za polisaharide (Synytsya et al., 2009). Se-O-C simetričnoj vibraciji istezanja odgovara traka na poziciji oko 667 cm^{-1} (Li et al., 2017).



Grafik 5. FTIR spektar metanolnog ekstrakta SeO_3^{2-} 10 PT_{eks} plodonosnih tela gljive *C. versicolor*

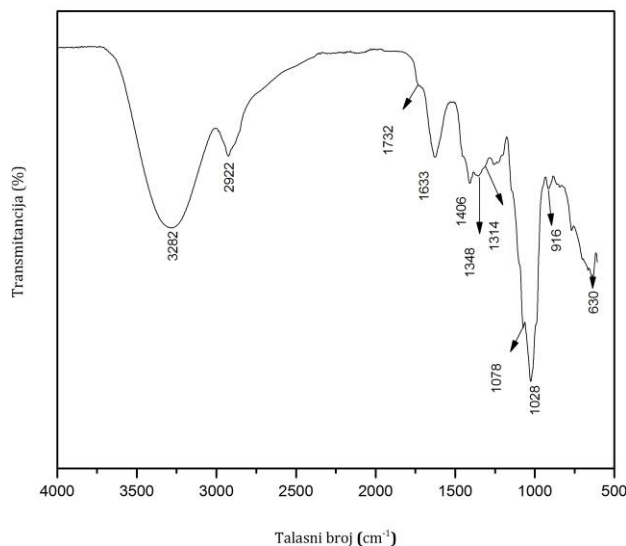
Spektri metanolnih ekstrakata plodonosnih tela (Prilog C) obogaćenog selenoureom (SU 10 PT_{eks} i SU 25 PT_{eks}) u pogledu prisustva glavnih komponenti ekstrakata. Oba spektra pokazuju trake karakteristične za glikozidne strukture kao što su široka traka sa maksimumom na oko 3280 cm^{-1} , nekoliko preklapljenih traka između 1150 cm^{-1} i 1078 cm^{-1} (β -d-glukani), oštar pik na oko 1028 cm^{-1} i 987 cm^{-1} (Gonzaga et al., 2005). Signal na oko 1730 cm^{-1} koji ukazuje na prisustvo karboksilne grupe je u velikoj meri prekriven jakim apsorpcionim pikom iz opsega između 1650 cm^{-1} i 1590 cm^{-1} , a koji pripada N-H vibracionom regionu, i ukazuje na prisustvo proteina u uzorku (Ren et al., 2014; Lima et al., 2016).

FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata gajenih na supstratu obogaćenom Sel-Plex[®]-om (SP 10 PT_{eks} i SP 25 PT_{eks}) pokazali su gotovo identične spektre (Prilog C). Jake vibracije iz opsega 1200 do 1000 cm^{-1} pripisuju se vibracijama prstena šećera, koje su preklapljene vibracijama istezanja C-OH sporednih grupa i C-O-C glikozidnih veza (Rodrigues et al., 2017). Traka prisutna

kod uzorka SP 10 PT_{eks} na oko 1078 cm^{-1} nastaje usled vibracija C-O grupa na C4 poziciji ostataka glukoze (Yan et al., 2011).

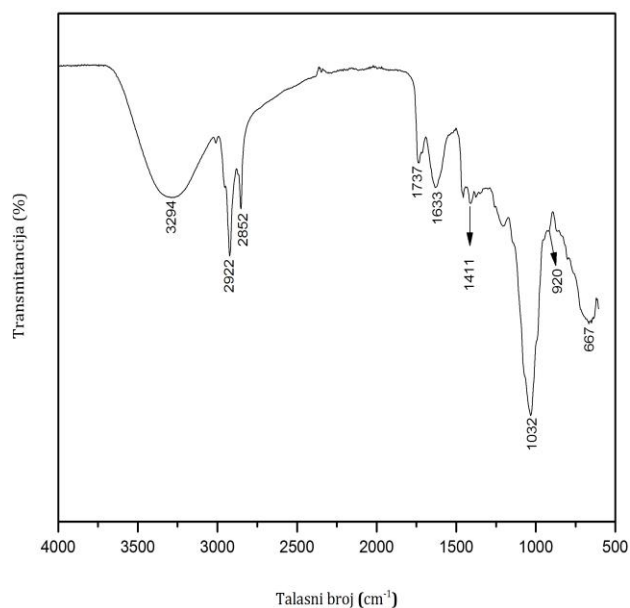
5.4.1.2 FTIR spektroskopija metanolnih ekstrakata micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Kao što se može videti na Grafiku 6. spektar uzorka K sub_{eks} pokazuje široku karakterističnu traku u regionu između $\approx 3600\text{ cm}^{-1}$ i $\approx 3000\text{ cm}^{-1}$ koja se odnosi na vibracije OH grupa. Ekstrakti gljiva daju jak spektar u ovom regionu usled molekularnih interakcija polisaharidnih lanaca (Kozarski et al., 2011). Gonzaga i saradnici (2013) kao i Kozarski i saradnici (2011) su ukazali na moguće prisustvo N-H grupa/vibracija karakterističnih za proteine u istom spektralnom regionu koje su preklapljene OH vibracijama. Traka na približno 2920 cm^{-1} koja odgovara vibracijama asimetričnog istezanja se preklapa sa trakom simetričnog istezanja CH_2 grupa (2850 cm^{-1}) i ukazuje na prisustvo lipida u ekstraktu (Ren et al., 2014; Matijašević et al., 2016). Primećeni pik na $\approx 1730\text{ cm}^{-1}$ je indikacija prisustva C=O grupa (Xiao et al., 2012). Veza na $\approx 1650\text{ cm}^{-1}$ je posledica vibracija asimetričnog istezanja COO^- grupa (Gonzaga et al., 2013). Dve trake su uočene u spektralnom regionu između 1100 cm^{-1} i 1000 cm^{-1} . Apsorpciona traka na $\approx 1028\text{ cm}^{-1}$ je pridružena C-O vibracijama istezanja, dok se traka na $\approx 1079\text{ cm}^{-1}$ najverovatnije odnosi na prisustvo O-supstituisanih ostataka glukoze. Prema Kozarski i saradnicima (2011) ova veza ukazuje na prisustvo β -glukana u metanolnom ekstraktu. Dve preklapljene slabe trake sa apsorpcionim maksimumom na oko 1348 cm^{-1} i 1314 cm^{-1} . Prva traka se verovatno odnosi na OH grupe fenolnih komponenata dok druga pripada amidnoj grupi (III) i ukazuje na prisustvo proteina (Rodrigues et al., 2017; Depciuch, 2016). Takođe, prisustvo malih količina proteina detektovano je prisustvom slabe veze na $\approx 1406\text{ cm}^{-1}$ (Ren et al., 2014).



Grafik 6. FTIR spektar metanolnog ekstrakta Ksub_{eks} micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*.

Na FTIR spektru (Grafik 7) metanolnog ekstrakta micelijuma gajenog na tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (SeO_3^{2-} 10 sub_{eks}) uočene su sve trake koje su predhodno opisane za uzorak K sub. Uočene su veze karakteristične za prisustvo jedinjenja glikozidne strukture (na oko 3294 cm^{-1} , 1737 cm^{-1} i 1032 cm^{-1}). Veći intenzitet pikova na približno 2922 cm^{-1} i dodatno pik na 2852 cm^{-1} ukazuju na potencijalno strukturno različit sadržaj lipida poreklom iz ćelijskog zida gljive. Takođe, verovatno je prisutna i mala količina proteina koja se može povezati sa apsorpcionom trakom na $\approx 1411\text{ cm}^{-1}$ (Ren et al., 2014).



Grafik 7. FTIR spektar metanolnog ekstrakta SeO_3^{2-} 10 sub_{eks} micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*

Karakteristična apsorpcija na približno 920 cm^{-1} ukazuje na prisustvo α -D-glukopiranoze u metanolnom ekstraktu (Liu et al., 2013; Li et al., 2017).

Prema dobijenim FTIR spektrima (Prilog C), metanolni ekstrakti uzoraka micelijuma gajenih u tečnoj podlozi sa dodatkom selenouree (SU 10 sub_{eks} i SU 25 sub_{eks}) nisu se međusobno razlikovali u pogledu kvalitativnog sastava. Oba uzorka imaju široku traku karakterističnu za vibracije istezanja OH grupa usled snažnih inter i intramolekulskih interakcija polisaharidnih lanaca u spektralnom regionu od oko 3600 cm^{-1} do 3000 cm^{-1} (Kozarski et al., 2011). U poređenju sa kontrolnim uzorkom (K sub_{eks}) ove trake su manje izražene. Dva apsorpciona pika koja ukazuju na prisustvo lipida u uzorku detektovna su na oko 2924 cm^{-1} i 2852 cm^{-1} . U poređenju sa kontrolnim uzorkom, ovi pikovi su znatno izraženiji, što ukazuje na verovatno prisustvo većih količina lipida u uzorku. Slaba traka detektovana na približno 1738 cm^{-1} dodeljena je C=O vibracijama istezanja i verovatno ukazuje na prisustvo malih količina lipida u uzorcima (Synytsya et al., 2009). Apsorpciona traka na 1633 cm^{-1} je verovatno od prisutnih kompleksa proteina sa

polisaharidima (Lima, et al., 2016). Slaba apsorpciona traka koja predstavlja deformišuće vibracije C-H veza alifatičnih grupa a koje pripadaju fenolnim pigmentima uočena je na oko 1404 cm^{-1} (Alzorqi et al., 2017; Klaus et al., 2015).

Dve apsorpcione trake su uočene u spektralnom regionu između 1100 cm^{-1} i 1000 cm^{-1} . Prema Kozarski i saradnicima (2011) indikacija prisustva β -glukana u ekstraktima gljive je veza prisutna na približno 1079 cm^{-1} . Sa druge strane intenzivna apsorpciona traka na oko 1028 cm^{-1} može se pripisati C-O valentnim vibracijama (Duvnjak et al., 2016). Dodatno, mala količina β -glukana detektovana je slabom apsorpcijom na oko 871 cm^{-1} (SU 25 sub_{eks}) i 875 cm^{-1} (SU 10 sub_{eks}) (Jiang et al., 2015). Na talasnoj dužini od oko 667 cm^{-1} uočena je široka traka koja se pripisuje Se-O-C simetričnoj vibraciji istezanja (Li et al., 2017). Ova formacija potvrđuje da su jedinjenja selena uspešno prešla u metanolni ekstrakt.

FTIR spektri uzoraka SP 10 sub_{eks} i SP 25 sub_{eks} dobijenih u medijumu obogaćenom Sel-Plex®-om (Prilog C), takođe pokazuje široku traku na oko 3211 i 3238 cm^{-1} . Veze prisutne u opsegu između 2900 i 2700 cm^{-1} se mogu dodeliti vibracijama istezanja CH_2 i CH_3 grupa masnih kiselina poreklom iz ćelijskog zida gljive (Rodrigues et al., 2017). Intenzitet ovih pikova je sa porastom sadržaja selena u gljivi rastao. Može se pretpostaviti da je dodatak selena u medijum za gajenje uticao na građu ćelijskog zida gljive, i na taj način verovatno doveo do povećanja sadržaja masnih kiselina u ekstraktu gljive. FTIR spektar uzorka SP 25 sub_{eks}, pokazuje slabu traku na oko 1732 cm^{-1} . Ova traka je karakteristična za vibracije karboksilnih estarskih veza (Ren et al., 2014). Apsorpcioni pikovi prisutni u oblasti između 1650 i 1590 cm^{-1} ukazuju na prisustvo kompleksa polisaharid-protein u uzorku gljive. (Lima, et al., 2016).

Veza na oko 1580 cm^{-1} se može pripisati vibracijama amidne grupe (II), što takođe ukazuje na dodatno prisustvo proteina kod ekstrakata SP 10 sub_{eks} i SP 25 sub_{eks}. Izraženi pik kod uzoraka gajenih u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex®-a ukazuju na verovatno veći sadržaj azota i slobodnih aminokiselina (Rodrigues et al., 2017; Klaus et al., 2015).

Dodatne apsorpcione trake koje ukazuju na prisustvo proteina u uzorku nalaze se na 1514 cm^{-1} i 1456 cm^{-1} . Traka na 1514 cm^{-1} je uočena jedino kod

ekstrakata gljive obogaćene Sel-Plex-om. Dobijeni pikovi pripadaju vibracionoj oblasti između 1400 cm^{-1} i 1520 cm^{-1} odnosno amidnoj grupi II, budući da nastaju usled vibracija istezanja CN grupa. (Moharram et al., 2008; Mohaček-Grošev et al., 2001).

Takođe, budući da veza na oko 1456 cm^{-1} ukazuje i na prisustvo nezasićenih C=C veza, moguće je da se proteini nalaze vezani za lipide (Depciuch, 2016). Ova traka je najizraženija kod uzorka SP 25 sub, kada se uporede svi ekstrakti submerzno gajene gljive.

Prema Synytsya i saradnicima (2009), apsorpcione trake između 1403 i 1408 cm^{-1} se najverovatnije javljaju zbog prisustva karboksilata asparaginske i glutaminske kiseline u proteinima uzoraka. Apsorpcione trake u ovoj spektralnoj oblasti se takođe mogu javiti kao rezultat vibracija alifatičnih grupa fenolnih komponenti (Klaus et al., 2015). Primećeno je da su pikovi u ovoj oblasti kod uzoraka SP 25 sub_{eks} i SP 10 sub_{eks} najintenzivniji, dok su najmanje trake dobijene kod kontrolnog uzorka i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}.

Slaba traka na 920 cm^{-1} verovatno potiče od α -glukana u uzorku gljive. Preklapanje traka sa maksimumom na 844 cm^{-1} i 875 cm^{-1} ukazuju na istovremeno postojanje α i β konfiguracija u polisaharidima (Jiang et al., 2015; Klaus et al., 2015; Rodrigues et al., 2017).

Na oko 667 cm^{-1} uočena je široka traka koja se pripisuje Se-O-C simetričnoj vibraciji istezanja što potvrđuje uspešnost ekstrakcije jedinjenja selena (Li et al., 2017).

5.4.1.3 Kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

Uzorci metanolnih ekstrakata su podvrgnuti kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi u cilju dobijanja informacija o uticaju načina gajenja i primenjenog izvora selena za suplementaciju na hemijski sastav dobijenog ekstrakta. Određen je prinos ekstrakata, ukupan sadržaj selena u ekstraktu, sadržaj polisaharida, glukana (ukupnih, α i β), monosaharidni sastav prisutnih polisaharidnih jedinjenja, sadržaj proteina, lipida i fenolnih jedinjenja.

5.4.1.3.1 Određivanje prinosa i ukupnog sadržaja selena u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* dobijenih gajenjem na čvrstom supstratu

Prinos metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* i sadržaja selena u njima dati su u Tabeli 11. Dobijeni rezultati ukazuju na to da ne postoje statistički značajne razlike ($p \leq 0.05$) u prinosu ekstrakata u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Ekstrakti dobijeni od plodonosnih tela gljive rasle na supstratu kome je dodata viša koncentracija selena (25 mg Se kg^{-1}) u okviru istog jedinjenja upotrebljenog za obogaćenje su dali nešto niži (ali ne i statistički značajno, $p \leq 0.05$) prinos. Izgleda da selen u ovako niskim primenjenim koncentracijama nije značajnije uticao na hemijski sastav dobijenih plodonosnih tela.

Sa porastom koncentracije selena u plodonosnim telima gljive, rastao je i sadržaj selena u ekstraktu. Sa druge strane, dobijeni sadržaj selena u ekstraktima je varirao u zavisnosti od izvora selena, pa je tako najveći sadržaj detektovan kod uzorka SU 25 PT_{eks}, $99.48 \mu \text{g}^{-1}$ a najniži kod uzorka SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} $37.51 \mu \text{g}^{-1}$.

Tabela 11. Ukupan sadržaj selena u ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak metanolnog ekstrakta	Prinos ekstrakta (% u odnosu na masu gljive upotrebenu za ekstrakciju)*	Ukupan sadržaj Se (μg^{-1} suve mase ekstrakta)
K PT _{eks}	6.30±1.30 ^a	4.50±0.32 ^a
SU 10 PT _{eks}	5.20±0.60 ^a	42.99±0.21 ^b
SU 25 PT _{eks}	5.12±1.20 ^a	99.48±1.33 ^c
SP 10 PT _{eks}	6.90±0.30 ^a	59.08±13.63 ^d
SP 25 PT _{eks}	5.92±0.10 ^a	62.37±3.39 ^d
SeO ₃ ²⁻ -10 PT _{eks}	6.1±1.1 ^a	37.51±2.47 ^b

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenouream u koncentraciji (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks}, SP 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex[®]-om (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻-10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg⁻¹). **Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p \leq 0.05, ANOVA, Fisher's LSD.

5.4.1.3.2 Određivanje prinosa i ukupnog sadržaja selena u metanolnim ekstraktima micelijuma gljive *C. versicolor* dobijenog submerznim gajenjem

Prinosi ekstrakata micelijuma gljive gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena prikazani su u Tabeli 12. Uočava se da dobijeni niži prinos ekstrakta gljive gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenom u poređenju sa kontrolnim uzorkom (oko 15.29 %), nije bio statistički značajan (p \leq 0.05). Najniži prinos od ekstrakata (oko 11.59 %) kod upotrebe organskih jedinjenja za obogaćenje tečne podloge je detektovan kod uzorka SU 25 sub_{eks}, dok

je najviši prinos ostvaren kod ekstrakta micelijuma gajenog u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex®-a u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ i to oko 14.93 %. Prinos ekstrakta micelijuma obogaćenog natrijum selenitom je bio oko 7.54 %, što je statistički značajno niži (p≤0.05) prinos u poređenju sa ostalim uzorcima.

Tabela 12. Prinos metanolnog ekstrakta i ukupan sadržaj selena u ekstraktima micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak metanolnog ekstrakta	Prinos ekstrakta (% u odnosu na masu gljive upotrebjenu za ekstrakciju)*	Ukupan sadržaj Se (μ g ⁻¹ suve mase ekstrakta)
K sub_{eks}**	15.29±4.40 ^{a***}	1.89±0.01 ^a
SU 10 sub_{eks}	11.98±0.26 ^a	106.3±0.28 ^b
SU 25 sub_{eks}	11.59±0.08 ^a	151.7±0.14 ^c
SP 10 sub_{eks}	14.93±0.29 ^a	410.9±0.14 ^d
SP 25 sub_{eks}	12.98±0.15 ^a	445.9±0.14 ^e
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	7.54±4.44 ^b	84.83±1.35 ^b

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj obogaćenom Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Određivanje ukupnog sadržaja selena u metanolnim ekstraktima micelijuma obogaćenog organskim izvorima selena, pokazalo je značajne razlike među uzorcima. Kod ekstrakata gljive gajene sa dodatkom selenouree, oko 7 do 10 % ukupnog selena micelijuma je detektovano u ekstraktu. Sa druge strane, gljiva gajena sa dodatkom Sel-Plex®-a dala je u tom smislu povoljnije rezultate, budući da

je od ukupnog selena, u ekstraktu detektovano čak između 71.6 i 37.2 i % selena. Sadržaj selena u ekstraktu micelijuma gajenog u podlozi obogaćenoj natrijum selenitom je bio najniži. Sa porastom koncentracije Se u ekstrahovanom materijalu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena, došlo je do statistički značajnog ($p \leq 0.05$) smanjenja procenta selena detektovanog u ekstraktu u odnosu na ukupan sadržaj selena. Pad koncentracije selena u ekstraktu sa porastom koncentracije selena u micelijumu je značajno veći kod uzoraka gajenih na Sel-Plex[®]-u (oko 30 %) u poređenju sa selenoureom. Dobijene razlike u sadržaju selena među ekstraktima gajenim na različitim organskim oblicima selena daju informacije o najverovatnijem različitom hemijskom sastavu ekstrakta, kao i o uticaju različitih jedinjenja na hemijski sastav dobijenog micelijuma.

5.4.2 Hemijska karakterizacija polisaharidnih komponenti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* raslih na supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Biološki aktivni polisaharidi su široko rasprostranjeni među višim gljivama. Većina njih ima jedinstvenu strukturu koja se razlikuje od vrste do vrste. Povrh toga, različiti sojevi jedne vrste mogu proizvoditi polisaharide različitih svojstava (Wasser, 2002). Neki fungalni β -glukani deluju kao stimulatori imunog sistema, i tako štite organizam od patogenih mikroba i štetnog uticaja toksina i kancerogenih jedinjenja iz spoljašnje sredine. β -glukani se ne sintetišu u čovekovom organizmu, i upravo je to razlog zbog čega ih organizam prepoznaje kao strane molekule što dovodi do imunog odgovora organizma (Brown i Gordon, 2005). Polisaharidi gljiva su uglavnom i prisutni kao glukani, povezani različitim vezama, a neki od njih mogu biti i heteroglukani. Tako sporedni lanci heteroglukana osim glukoze mogu sadržati i druge monosaharide kao što su arabinoza, manosa, fukoza, galaktoza, ksiloza i glukuronska kiselina (Wasser, 2002). Zbog toga određivanje monosaharidnog sastava može dati bitne informacije o sastavu ekstrahovanih polisaharida iz micelijuma i plodonosnih tela gljive. Postoji veliki broj homologa monosaharida slične strukture, a u stvarnosti se

monosaharidi javljaju ne samo u polisaharidima nego i u oligosaharidima, polisaharopeptidima, i glukoproteinima. Zbog toga je za njihovo određivanje neizbežna upotreba separacionih tehnika visoke rezolucije, pa se HPLC metoda nameće kao logičan izbor (Xingbin et al., 2005). Da bi se utvrdio sadržaj monosaharida, potrebno izvršiti hidroliza prisutnih polisaharidnih komponenata, što je urađeno pomoću trifluoro sirćetne kiseline (Malinowska et al., 2009).

Međutim, monosaharidi imaju generalno nisku UV spektralnu aktivnost, pa je njihova derivatizacija neophodna da bi se ostvarila visoko senzitivna detekcija. PMP (3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-on) je jedan od najčešće korišćenih reagensa za obeležavanje monosaharida koji sa njima reaguje u niskim koncentracijama, i ne uzrokuje izomerizaciju. Tako dobijeni derivatizovani monosaharidi pokazuju snažnu UV apsorpciju pri talasnim dužinama od oko 250 nm (Xingbin et al., 2005).

5.4.2.1 Sadržaj ukupnih polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor*

Sadržaj polisaharida u ekstraktima plodonosnih tela gljive gajenih na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom i natrijum selenitom nije se statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao u odnosu na sadržaj polisaharida u kontrolnom ekstraktu (Tabela 13). Izgleda da selen u prisutnoj koncentraciji u uzorcima SU 10 PT, SU 25 PT i SeO_3^{2-} 10 PT nije uticao na rastvorljivost i ekstrakciju prisutnih polisaharida. Ekstrakti plodonosnih tela gljive gajene na supstratu kome je dodat Sel-Plex® imali su statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži sadržaj ukupnih polisaharida u poređenju sa svim uzorcima. Svi analizirani ekstrakti obogaćeni selenom su imali statistički značajno viši sadržaj ukupnih i β -glukana, a niži sadržaj α -glukana ($p \leq 0.05$) u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Takođe, upotreba različitog organskog jedinjenja kao i njegov viši sadržaj nije statistički značajno uticao na sadržaj β -glukana u metanolnom ekstraktu. Poređenjem ekstrakata plodonosnih tela sa ekstraktima micelijuma, uočava se da su vrednosti dobijene za sadržaj polisaharidnih komponenti generalno značajno više kod ekstrakata plodonosnih tela. Na sadržaj β -glukana u gljivama utiču mnogi faktori, kao što su na primer:

Akumulacija seleno u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

vrsta gljive, uslovi gajenja gljive, stepen zrelosti polodonosnog tela i sadržaj ukupnih dijetetskih vlakana (Zhu et al., 2015).

Tabela 13. Ukupan sadržaj polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim jedinjenjima.

Uzorak metanolnog ekstrakta	Ukupan sadržaj polisaharida (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta) *	Sadržaj glukana (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta) *		
		Ukupni glukani	α-glukani	β- glukani
K PT_{eks}**	205.09±0.43 ^{a***}	11.85±0.48 ^a	4.64±1.33 ^a	7.21±0.27 ^a
SU 10 PT_{eks}	226.84±34.03 ^a	19.55±0.92 ^b	0.80±0.03 ^b	18.75±0.95 ^b
SU 25 PT_{eks}	223.62±2.03 ^a	17.98±0.25 ^b	0.31±0.08 ^c	17.67±0.22 ^b
SP 10 PT_{eks}	146.96±0.02 ^b	18.36±0.68 ^b	0.34±0.04 ^c	18.02±0.63 ^b
SP 25 PT_{eks}	152.54±4.84 ^b	n.a. ^{****}	n.a.	n.a.
SeO₃²⁻ 10 PT_{eks}	207.69±3.20 ^a	21.28±0.74 ^c	0.56±0.02 ^d	20.72±0.76 ^c

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks} -kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks}, SP 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex[®]-om (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻ 10 PT_{eks}-metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. ****Nije analiziran.

Prema literaturnim podacima, struktura polisaharida dobijenih iz polodnosnih tela, micelijuma i egzopolisaharida iste gljive se razlikuju prema sastavu. Utvrđeno je da polisaharidi gljive *Agaricus blazei* dobijeni iz plodonosnih tela, micelijuma ili proizvedeni ekstacelularno imaju različitu hemijsku strukturu. Polisaharidi iz plodonosnih tela su prvenstveno glukani povezani različitim vezama ili heteroglukani. Micelija uglavnom sadrži glukomanane, dok se ekstracelularni polisaharidi sastoje uglavnom od kompleksa manan-protein. Treba napomenuti da struktura polisaharida u micelijumu može zavisiti i od sastava

hranljivog medijuma za gajenje, pa se tako optimizacijom uslova gajenja mogu dobiti polisaharidi istog sastava i iz plodonosnih tela i iz micelijuma. Ipak, generalno gledano, broj polisaharidnih frakcija izolovanih iz plodonosnih tela ili micelijuma iste vrste najčešće zavisi od upotrebljene metode za frakcionisanje, ali je ukupan sadržaj polisaharida u plodonosnim telima uglavnom veći (Wasser, 2002).

5.4.2.2 Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim izvorima selena

Monosaharidni sastav ekstrakata plodonosnih tela gljive obogaćene selenouream i Sel-Plex[®]-om dat je u Tabeli 14, a dobijeni hromatogrami su prikazani u prilogu D. Šećerne komponente prisutne u ekstraktu su se sastojale uglavnom od D-glukoze, (93.09 - 96.14 %). Takođe, detektovane su i D-manoza i D-glukozamin, mada u znatno manjem obimu. Sadržaj glukozamina je bio statistički značajno viši ($p \leq 0.05$) kod ekstrakata obogaćenih selenom. Najviši sadržaj glukozamina je određen kod ekstrakta plodonosnih tela raslih na sustratu obogaćenom selenskim kvascem (SP 10 PT_{eks}), što ukazuje na najverovatniji uticaj ovog izvora selena na hemijski sastav ćelijskog zida gljive, odnosno na povećan sadržaj hitina. Naime, hitin predstavlja polimere β -1,4-N-acetilglukozamina, a njegov sadržaj u ćelijskom zidu filamentoznih gljiva se razlikuje i može se kretati od 1-15 % (Free, 2013).

Utvrđeno je prisustvo D-galaktoze u malom procentu u uzorcima, dok se za ostale monosaharide može reći da su prisutni u tragovima.

Tabela 14. Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* obogaćenog organskim izvorima selena.

Monosaharidi	Sadržaj monosaharida metanolnih ekstrakata gljive <i>C. versicolor</i> izražen u % u odnosu na ukupne monosaharide*		
	KPT _{eks} **	SU 10 PT _{eks}	SP 10 PT _{eks}
D-Manoza	1.06±0.03 ^{a***}	1.00±0.01 ^a	1.42±0.05 ^b
D-Glukozamin	1.55±0.02 ^a	2.18±0.00 ^b	4.64±0.09 ^c
D-Riboza	0.01±0.00 ^{a,t}	0.17±0.01 ^{b,t}	0.06±0.02 ^{b,t}
D-Ramnoza	0.02±0.00 ^{a,t}	0.03±0.02 ^{a,t}	n.d.
D-Glukuronska kiselina	0.08±0.03 ^t	n.d. ^{****}	n.d.
D-Galaktozamin	n.d.	n.d.	n.d.
D-Glukoza	96.14±0.15 ^a	95.42±0.02 ^b	93.09±0.14 ^c
D-Galaktoza	1.13±0.09 ^a	0.91±0.05 ^a	0.52±0.08 ^{b,t}
D-Ksiloza	0.01±0.00 ^{a,t}	0.23±0.01 ^{b,t}	n.d.
D-Fukoza	n.d.	0.06±0.04 ^t	n.d.

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks} -kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom (10 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 mg Se kg⁻¹); ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. **** Nije detektovan. ^t Monosaharid je detektovan u tragovima.

5.4.3 Ukupan sadržaj proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Sadržaj proteina (Tabela 15) u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela obogaćenih organskim izvorima selena u poređenju sa kontrolnim uzorkom statistički značajno (p≤0.05) je opadao sledećim redosledom: K PT_{eks} > SU 10 PT_{eks} > SP 10 PT_{eks}. Nije uvrđena značajna razlika (p≤0.05) između kontrolnog (K PT_{eks}) i ekstrakta gljive rasle na čvrstom supstratu obogaćenom natrijum selenitom (SeO₃²⁻ 10 PT_{eks}).

Tabela 15. Ukupan sadržaj proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak metanolnog ekstrakta	Ukupan sadržaj proteina (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)*	Ukupan sadržaj lipida (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)	Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)
K PT _{eks} **	10.86±0.49 ^{a***}	156.83±5.83 ^a	18.19±1.15 ^a
SU 10 PT _{eks}	8.33±0.08 ^b	136.44±0.44 ^b	16.99±1.15 ^a
SU 25 PT _{eks}	n.a. ^{****}	n.a.	14.55±1.07 ^b
SP 10 PT _{eks}	2.47±1.03 ^c	148.38±8.07 ^{a,b}	12.09±1.28 ^c
SP 25 PT _{eks}	n.a.	n.a.	16.18±2.03 ^{a,b}
SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}	12.29±0.45 ^a	183.72±3.40 ^c	15.92±1.23 ^{a,b}

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks}-kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks}, SP 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. ****Nije analiziran.

Analizom sadržaja fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima utvrđeno je da je najveći sadržaj fenolnih jedinjenja imao kontrolni ekstrakt KPT_{eks}, 18.19 µg g⁻¹. Primećeno je da je sa porastom sadržaja selena u ekstraktima plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom organskim izvorima selena (SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks}, SP 10 PT_{eks} i SP 25 PT_{eks}) sadržaj fenolnih jedinjenja opadao. Međusobnim poređenjem u okviru istog jedinjenja i koncentracije primenjenog selena za suplementaciju sadržaj fenolnih jedinjenja je bio veći kod uzoraka micelijuma (Tabela 18) u odnosu na plodonosna tela, sa izuzetkom uzorka SP 25 PT_{eks} koji je

imao statistički ne značajano ($p \leq 0.05$) veći sadržaj fenolnih jedinjenja. Fenolne komponente su potencijalni antioksidansi, i kao takve mogu da služe kao donori vodonika slobodnim radikalima čime su u stanju da zaustave lančanu reakciju oksidacije lipida u početnoj fazi. Ova sposobnost fenolnih komponenti da hvataju slobodne radikale potiče od prisustva fenolnih hidroksilnih grupa (Kosanić et al., 2016).

5.4.4 Hemijska karakterizacija polisaharidnih komponenti metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor*

5.4.4.1 Sadržaj ukupnih polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*

Ukupan sadržaj polisaharida i glukana, kao i ukupan sadržaj α i β glukana prikazan je u Tabeli 16. Ukupan sadržaj polisaharida je bio najveći u kontrolnom uzorku, dok je kod svih uzoraka dobijenih ekstrakcijom selenom obogaćenog micelijuma dobijen značajno manji sadržaj polisaharida. Takođe, poređenjem dobijenih rezultata u okviru istog jedinjenja (selenourea ili Sel-Plex®) primenjenog za obogaćivanje medijuma za gajenje, primećeno je da je sa porastom sadržaja selena u micelijumu, ekstrahovano statistički značajno manje ($p \leq 0.05$) polisaharida. Rezultati ranijih istraživanja su pokazali da *Lentinus edodes* gljiva inkorporira selen u ugljenohidratnu mrežu micelijuma (Turlo et al., 2010a). Naime, glavni konstituenti ćelijskog zida gljiva proteini i polisaharidi mogu da vežu neorganske komponente selena biosorpcijom (Malinowska et al., 2009). Vezivanje selena za polisaharide dovodi do smanjenja njihove rastvorljivosti što najverovatnije utiče na njihovu ekstrakciju (Turlo et al., 2010a). Sadržaj ukupnih i α i β -glukana je bio najveći kod kontrolnog uzorka. Visok sadržaj α -glukana je takođe detektovan u ekstraktu micelijuma gajenom na natrijum selenitu. Takođe, kao i u slučaju sa polisaharidima, sadržaj svih oblika glukana u ekstraktima je opadao sa porastom koncentracije selena u micelijumu. Kod svih metanolnih

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

ekstrakata sa selenom detektovan je statistički značajno manji sadržaj β -glukana u poređenju sa kontrolnim uzorkom.

Tabela 16. Ukupan sadržaj polisaharida i glukana u metanolnim ekstraktima micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak	Ukupan sadržaj polisaharida (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta) *	Sadržaj glukana (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta) *		
		Ukupni glukani	α -glukani	β -glukani
K sub_{eks}**	282.02±0.14 ^{a***}	15.26±0.21 ^a	8.90±0.06 ^a	6.36±0.06 ^a
SU 10 sub_{eks}	114.07±8.88 ^b	6.80±0.31 ^b	0.59±0.01 ^b	6.21±0.32 ^b
SU 25 sub_{eks}	90.74±1.26 ^c	4.25±0.38 ^c	0.58±0.05 ^b	3.67±0.33 ^c
SP 10 sub_{eks}	61.74±1.80 ^d	3.41±0.44 ^d	0.32±0.03 ^b	3.10±0.46 ^d
SP 25 sub_{eks}	50.55±1.75 ^d	3.10±0.06 ^d	0.43±0.12 ^b	2.67±0.06 ^e
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	270.96±7.49 ^a	8.33±0.28 ^e	7.59±0.37 ^c	0.74±0.22 ^f

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks}-kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj obogaćenom Sel-Plex[®]-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Sa porastom koncentracije selena u micelijumu (isto jedinjenje za obogaćivanje), smanjivao se sadržaj β -glukana u ekstraktu. Tako je sadržaj β -glukana je varirao u opsegu od 6.21 do 3.67 mg g⁻¹ (SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks}) i 3.10 i 2.67 mg g⁻¹ (SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks}). Budući da su β -glukani jedan od glavnih konstituenata ćelijskog zida gljiva, predpostavlja se da je dodatak selena u medijum za gajenje uticao na strukturu ćelijskog zida gljive (Bhatia et al., 2013).

Takođe, povećan sadržaj selena u polisaharidima generalno, verovatno je doveo do smanjenja efikasnosti ekstrakcije β -glukana.

5.4.4.2 Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim izvorima selena

Analiza monosaharidnog sastava i sadržaja metanolnih ekstrakata micelijuma je ukazala na uticaj dodatka selena u medijum za gajenje na njihov ukupan sadržaj. Budući da su utvrđene kvantitativne razlike u sadržaju polisaharida u ekstraktima (Tabela 16), pristupljeno je određivanju kvalitativnog sastava polisaharida a da bi se otkrile eventualno prisutne razlike u sastavu polisaharida. Naime, različit kvalitativni sastav može ukazivati na potencijalan uticaj na razlike u strukturi polisaharida, a samim tim i na njihovo biološko delovanje.

Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* prikazan je u Tabeli 17. Sadržaj monosaharida je izražen u % od ukupnog sadržaja monosaharida. D-glukoza je bila najzastupljeniji monosaharid prisutan u najvišem procentu kod sva tri testirana uzorka. Vrednosti su bile 82.70 %, 96.16 %, 81.88% za uzorke K_{sub_eks}, SU 10 sub_{eks}, SP 10 sub_{eks}, redom. Uzorak obogaćen selenoureom je pokazao statistički značajno viši ($p \leq 0.05$) sadržaj ovog monosaharida u poređenju sa ostalim uzorcima. Takođe, utvrđene su i statistički značajno ($p \leq 0.05$) različite količine D-manoze u svim uzorcima. Tako je procenat opadao sledećim redosledom SP 10 sub_{eks} > K_{sub_eks} > SU 10 sub_{eks}. Sadržaj D-glukozamina je značajno opao u svim ekstraktima selenom obogaćenog micelijuma ($p \leq 0.05$). Takođe, detektovan je značajniji procenat (1.17 - 4.14 %) D-glukuronske kiseline kod svih uzoraka. Sadržaj ostalih monosaharida u uzorcima je uglavnom bio manji od 1 %.

Tabela 17. Monosaharidni sastav metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim izvorima selena.

Monosaharidi	Sadržaj monosaharida metanolnih ekstrakata micelijuma gljive <i>C. versicolor</i> izražen u % u odnosu na ukupne monosaharide *		
	Ksub _{eks} **	SU 10 sub _{eks}	SP 10 sub _{eks}
D-Manoza	5.14±0.44 ^{a***}	1.33±0.07 ^b	8.76±0.34 ^c
D-Glukozamin	5.65±0.00 ^a	0.44±0.00 ^b	3.93±0.56 ^c
D-Riboza	0.68±0.12 ^a	0.10±0.02 ^b	0.38±0.59 ^c
D-Ramnoza	0.55±0.05 ^a	0.21±0.05 ^b	n.d. ^{***}
D-Glukuronska kiselina	3.26±1.84 ^a	1.17±0.02 ^a	4.14±2.28 ^a
D-Galaktozamin	0.06±0.00 ^a	0.11±0.01 ^a	0.27±0.18 ^a
D-Glukoza	82.70±1.65 ^a	96.16±0.07 ^b	81.88±3.01 ^a
D-Galaktoza	1.84±0.04 ^a	0.44±0.03 ^b	0.64±0.15 ^b
D-Ksiloza	n.d.	n.d.	n.d.
D-Fukoza	0.04±0.24 ^a	0.05±0.04 ^a	n.d.

* Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks}-kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream (10 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 mg Se L⁻¹); ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. *** Nije detektovan.

Generalno posmatrano, kontrolni uzorak je imao nešto kompleksiji sastav u poređenju sa ekstraktima selenom obogaćenog micelijuma, sa višim sadržajem D-manoze, D-glukozamina i D-galaktoze. Ranija istraživanja su pokazala da polisaharidi gljiva *A. bisporus* i *P. linteus* sadrže više od 85 % glukoze, i u nešto nižem procentu D-galaktozu i D-ksilozu pa se može zaključiti da su dobijeni rezultati u skladu sa literaturnim podacima (Kozarski et al., 2011).

5.4.5 Određivanje ukupnog sadržaja proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Dobijeni rezultati hemijske analize ekstrakata (Tabela 18) su pokazali da postoje statistički značajne razlike ($p \leq 0.05$) u hemijskom sastavu između ekstrakata gljive gajene na podlozi obogaćenoj selenom i kontrolnog ekstrakta. Najviši sadržaj proteina detektovan je kod uzoraka SP 25 sub_{eks} (33.6 mg g^{-1}) i SP 10 sub_{eks} (21.64 mg g^{-1}). Dobjeni rezultati su u skladu sa rezultatima FTIR analize. Naime, dobijeni spektri ovih uzoraka su pokazali dodatne trake na 1514 cm^{-1} i 1456 cm^{-1} koje ukazuju na prisustvo proteina u uzorku. Ostali uzorci dobijeni ekstrakcijom micelijuma raslog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenom su imali statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži sadržaj proteina u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Ksub_{eks}). Utvrđena je veoma visoka i statistički značajana negativna korelacija ($r = -0.92$, $p \leq 0.05$) između sadržaja fenolnih jedinjenja (Tabela 18) i ukupnog sadržaja selena (Tabela 12) u ekstraktima micelijuma. Interesantno je da se prinos proteina nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao kada se uporede uzorci SU 10 sub_{eks} i SeO_3^{2-} 10 sub_{eks}, iako je kod ekstrakcije uzorka gajenog na neorganskom selenu dobijen nešto niži prinos. Istovremeni visok sadržaj proteina (Tabela 18) i selena (Tabela 12), u ekstraktima SP 10 sub ($410.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) i SP 25 sub ($445.9 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) ukazuje na to da je selen najvećim delom u uzorcima obogaćenim Sel-Plex[®]-om inkorporiran u proteine. Iako nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnog selena kada se uporedi dodatak selenouree i Sel-Plex[®]-a u istim koncentracijama, uzorci gajenji u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex[®]-a su veliki deo selena ugradili u SeMet (Tabela 9) koji je najverovatnije ugrađen u proteine gljive. Dodatno, kada se uporede rezultati analize sadržaja proteina u dobijenim uzorcima, ova dva ekstrakta imaju daleko viši sadržaj proteina u odnosu na ostale uzorke.

Tabela 18. Ukupan sadržaj proteina, lipida i fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena.

Uzorak metanolnog ekstrakta	Ukupan sadržaj proteina (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)*	Ukupan sadržaj lipida (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)	Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja (mg g ⁻¹ suve mase ekstrakta)
K sub_{eks}**	18.84±1.02 ^{a***}	171.95±2.38 ^a	24.08±1.22 ^a
SU 10 sub_{eks}	4.12±0.05 ^b	100.46±3.46 ^b	23.29±1.36 ^{a,c}
SU 25 sub_{eks}	14.03±0.10 ^c	121.46±0.51 ^c	24.97±1.60 ^a
SP 10 sub_{eks}	21.64±1.62 ^d	176.28±7.27 ^a	17.25±1.19 ^b
SP 25 sub_{eks}	33.63±0.01 ^e	290.82±2.26 ^d	15.62±0.35 ^b
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	3.77±1.01 ^b	115.61±5.28 ^c	21.99±0.25 ^c

*Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks}-kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 i 25 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 i 25 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Izgleda da je dodatak Sel-Plex®-a uticao na pojačanu sintezu proteina u uzorcima. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatime predhodnih istraživanja prema kojima niže koncentracije selena aktiviraju enzime koji hidrolizuju proteine do peptida i aminokiselina, dok visoke koncentracije selena inhibiraju delovanje ovih enzima (Liu et al., 2011).

5.5 Određivanje biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive *Coriolus versicolor*

5.5.1 Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* rase na čvrstom supstatu i u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Prvi korak pri utvrđivanju antimikrobne aktivnosti ekstrakata micelijuma i plodonosnih tela gljive *C. versicolor* bio je implementacija disk difuzione metode (Quereshi et al., 2010). Antibakterijska aktivnost je analizirana u odnosu na dve Gram-pozitivne (*S. aureus*, *B.cereus*) i tri Gram-negativne (*S. sonnei*, *P. hauseri*, *S. Enteritidis*) ATCC test bakterije. Neočekivano, zone inhibicije koje ukazuju na antibakterijsko delovanje ekstrakta su uočene jedino kod testiranja bakterije *P. hauseri* i nisu prelazile 8 mm. Dobijeni rezultati su ukazivali na praktično nepostojeći antimikrobni efekat metanolnih ekstrakata gljive. Međutim, prema literaturnim podacima uspešnost disk difuzione metode veoma zavisi od sposobnosti aktivne antimikrobne supstance iz uzorka da difunduje kroz agar. Na primer polisaharidi visoke molekulske mase slabo difunduju kroz agar (Ren et al., 2014). Prijavljene su čak i razlike u antimikrobnom delovanju između različitih tipova ekstrakata, a koje su posledica upravo limitirajućih faktora primene disk difuzione metode, koja se smatra neadekvatnom za testiranje delimično ili potpuno hidrofobnih komponenata (Davidson i Parish, 1989). Zbog toga, mikrodiluciona metoda poseduje izvesnu prednost u pogledu pouzdanosti dobijenih rezultata, pa je zbog toga u daljim eksperimentima izabrana za utvrđivanje antimikrobnog delovanja dobijenih ekstrakata.

5.5.1.1 Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* prikazano je u Tabeli 19 i Tabeli 20. U najvećem broju slučajeva, metanolni ekstrakt plodonosnih tela gljive K PT_{eks} je pokazao slabiji mikrobistatični uticaj na Gram-pozitivne bakterije u odnosu na K sub_{eks} (za pet od osam testiranih bakterija MIC vrednosti su bile više). Izuzetak su bakterije *S. aureus* (MIC, 2.5 mg mL⁻¹) i *L. monocytogenes* (MIC, 10 mg mL⁻¹) na koje je K PT_{eks} pokazao bolje dejstvo. Takođe, uočen je i letalni efekat ekstrakta K PT_{eks} na *B. cereus*.

Uzorak SU 10 PT_{eks} se pokazao najboljim protiv rasta *B. spizizeni* i *S. epidermidis* sa MIC vrednostima nižim od 0.3125 mg mL⁻¹. Međutim, zapaženo je i to da je ovaj uzorak jedini ispoljio mikrobicidni učinak na *E. faecalis* (MBC, 40 mg mL⁻¹) među uzorcima ekstrakata plodonosnih tela, a zajedno sa uzorkom micelijuma SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}. Utvrđeno je da je uzorak SU 25 PT_{eks} ispoljio generalno slabiji efekat na Gram-pozitivne bakterije u odnosu na kontrolni uzorak i uzorak SU 10 PT_{eks}. Od svih testiranih selenom obogaćenih ekstrakata plodonosnih tela jedino je SP 10 PT_{eks} delovao letalno na *B. cereus* pri koncentraciji od 5 mg mL⁻¹. Nijedan ekstrakt selenom obogaćenih plodonosnih tela nije delovao mikrobicidno na *S. aureus*. Poređenjem uticaja ekstrakata gljive rasle na supstratu kome je dodat Sel-Plex[®], utvrđeno je da je ekstrakt gljive rasle pri dodatku niže koncentracije Sel-Plex[®]-a u supstrat za gajenje (10 mg Se kg⁻¹) ostvario bolji mikrobicidni učinak na Gram-pozitivne bakterije, dok je ekstrakt gljive rasle pri dodatku više koncentracije Sel-Plex[®]-a (25 mg kg⁻¹) bio efikasniji u borbi protiv Gram-negativnih bakterija.

Primećen je značajno slabiji mikrobicidni učinak uzorka K PT_{eks} na Gram-negativne bakterije (Tabela 20) u poređenju sa K sub_{eks}. Uzorak K PT_{eks} je delovao mikrobicidno jedino na *P. hauseri*, i MBC vrednost je iznosila 20 mg mL⁻¹. Primećeno je da su i svi ekstrakti gljive gajene sa dodatkom selena ispoljili letalno delovanje na ovu bakteriju pri koncentracijama između 10 i 40 mg mL⁻¹. Uzorci SU

10 PT_{eks} i SP 25 PT_{eks} su ispoljili letalni efekat na veći broj testiranih Gram-negativnih bakterija, i kao takvi su se izdvojili među ekstraktima plodonosnih tela. Pokazalo se da su od svih testiranih uzoraka, ekstrakti submerzno odgajanih uzoraka obogaćenih selenoureom i natrijum selenitom jedini bili smrtonosni po ovu bakteriju. Karaman i saradnici (2010) su pokazali da niske koncentracije metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* (0.05 mg mL⁻¹) nisu imale efekta na Gram-negativne bakterije, osim na *S. Enteritidis*. Interesantno, za razliku od ekstrakta micelijuma gljive gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom, ekstrakt plodonosnih tela dobijenih gajenjem gljive na čvrstom supstratu obogaćenom natrijum selenitom je pokazao bolje inhibitorno dejstvo jedno u odnosu na bakteriju *S. epidermidis* (MIC, 5 mg mL⁻¹) u poređenju sa kontrolnim uzorkom (MIC, 10 mg mL⁻¹), a mikrobicidni efekat takođe nije uočen ni kod jedne testirane bakterije.

Nije utvrđeno antifungalno dejstvo ni jednog uzorka prema testiranim sojevima kvasaca (Tabela 20).

Metanolni ekstrakti selenom obogaćene gljive *C. versicolor* su pokazali antibakterijsko delovanje i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije. Zbog visoke polarnosti u poređenju sa drugim, često korišćenim rastvaračima, metanol rastvara više jedinjenja prisutnih u gljivi. Rezultati istraživanja ukazuju da je metanolni ekstrakt najjači antimikrobni agens (Smolskaitė et al., 2015). Metanolni ekstrakti dobijeni od plodonosnih tela gljiva *Clitocybe alexandri*, *Lactarius species*, *Lepista nuda* i *Pleurotus sajou-caju* takođe su ispoljavali inhibitorno delovanje na Gram-negativne bakterije. Među testiranim bakterijama najsenzitivnije su bile *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa* (Alves et al., 2012).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 19. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* na odabrane sojeve Gram-pozitivnih bakterija.

Test bakterija		Uzorak					
		K PT _{eks} *	SU 10 PT _{eks}	SU 25 PT _{eks}	SP 10 PT _{eks}	SP 25 PT _{eks}	SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	MIC**	>40.0±0.0	20.0±0.0 ^{***}	>40.0±0.0	>40.0±0.0	40.0±0.0 ^b	>40.0±0.0
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	MIC	>40.0±0.0	<0.3125±0.0000	>40.0±0.0	<0.3125±0.0000	>40	40.0±0.0
	MBC	n.d. ^{****}	<0.3125±0.0000	n.d.	40.0±0.0	n.d.	n.d.
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	MIC	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	>40.0±0.0	5.0±0.0 ^a	2.5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^a
	MBC	20.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	5.0±0.0 ^b	n.d.	n.d.
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC	2.5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^b	2.5.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^c
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	MIC	10.0±0.0 ^a	<0.3125±0.000 ^b	20.0±0.0 ^c	<0.3125±0.000 ^b	<0.3125±0.0000 ^b	5.0±0.0 ^d
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	MIC	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^c
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	MIC	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^c
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	MIC	>40.0±0.0	>40.0±0.0	>40.0±0.0	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	>40.0±0.0
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 10 i 25 mg Se kg⁻¹; SP 10 PT_{eks}, SP 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 i 25 mg Se kg⁻¹; SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom u koncentraciji 10 mg Se kg⁻¹. **Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p<0.05, ANOVA, Tukey`s HSD. **** Nije određeno.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 20. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* na odabrane sojeve Gram-negativnih bakterija i kvasaca.

Test mikroorganizam		Uzorak					
		K PT _{eks} *	SU 10 PT _{eks}	SU 25 PT _{eks}	SP 10 PT _{eks}	SP 25 PT _{eks}	SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	MIC**	40.0±0.0 ^{a***}	20.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.****	n.d.	n.d.	n.d.	20.0±0.0	n.d.
<i>P. hauseri</i> ATCC 13315	MIC	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a
	MBC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^c	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^c
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.
<i>E. coli</i> H7:O157 ATCC 35150	MIC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	MIC	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	n.d.	40.00	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	MIC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.
<i>S. sonnei</i> ATCC 29930	MIC	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	20.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^b	n.d.
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	MIC	5.0±0.0 ^a	2.5.0±0.0 ^b	2.5.0±0.0 ^b	2.5.0±0.0 ^b	2.5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	n.d.
<i>C. freundii</i> ATCC 43864	MIC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a
	MBC	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a	n.d.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	MIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	MIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks}, SU 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenouream u koncentraciji od 10 i 25 mg Se kg⁻¹; SP 10 PT_{eks}, SP 25 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 i 25 mg Se kg⁻¹; SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom u koncentraciji 10 mg Se kg⁻¹. **Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). ***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey's HSD. **** Nije određeno.

5.5.1.2 Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Rezultati testiranja metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* na antibakterijsku aktivnost prikazani su u Tabeli 21 i Tabeli 22. Rezultati antibakterijske aktivnosti kontrolnog uzorka (K sub_{eks}) su pokazali da se MIC vrednosti metanolnog ekstrakta za *Bacillus* i *Staphylococcus* sojeve, *E. faecalis* i *L. monocytogenes* bakterije nalaze u opsegu između <0.3125 i 20 mg mL^{-1} . Kontrolni uzorak je delovao mikrobicidno na bakterije *B. spizizeni* i *L. ivanovii* (MBC vrednosti su 10 mg mL^{-1} and 40 mg mL^{-1} , redom). Nije uočen rast bakterije *Y. enterocolitica* pri koncentraciji K sub_{eks} od 5 mg mL^{-1} , koja je označena kao najsenzitivnija u odnosu na ostale testirane Gram-negativne bakterije. MIC vrednosti za ostale Gram-negativne bakterije, su bile slične i nalazile su se u opsegu od 10 mg mL^{-1} do 40 mg mL^{-1} . Primećeno je da je metanolni ekstrakt kontrolnog uzorka pokazao mikrobicidni efekat na sedam od deset testiranih Gram-negativnih bakterija. Koncentracija od 20 mg mL^{-1} ispoljila je mikrobicidno delovanje na *P. hauseri* i *S. sonnei* dok je koncentracija od 40 mg mL^{-1} bila letalna za *P. mirabilis*, *E. coli*, *S. Enteritidis*, *Y. enterocolitica* i *C. freundii*.

Među Gram-pozitivnim bakterijama, *B. spizizeni*, *S. epidermidis* i *L. ivanovii*, su bile najsenzitivnije na uzorak SU 10 sub_{eks} (MIC vrednost $<0.3125 \text{ mg mL}^{-1}$). Takođe, jaka antibakterijska aktivnost je uočena i kod *B. cereus*, *S. aureus* i *L. monocytogenes*, za koje su MIC vrednosti iznosile redom 5.0 mg mL^{-1} , 5.0 mg mL^{-1} i 10 mg mL^{-1} , redom. Rast bakterija *E. faecalis* i *L. innocua* je inhibiran pri najvećoj upotrebljenoj koncentraciji (40 mg mL^{-1}). Minimalna baktericidna koncentracija nije utvrđena na *E. faecalis* i testirane *Listeria* sojeve, a uzorak SU 10 sub je delovao letalno na *B. cereus* (MBC= 5 mg mL^{-1}) koja je bila najsenzitivnija od osam testiranih Gram-pozitivnih bakterija. Letalni efekat ekstrakta je bio nešto slabiji za *B. spizizeni* i *S. epidermidis* (MBC vrednosti 10 mg mL^{-1} i 20 mg mL^{-1} respektivno). Kao najosetljivije bakterije među Gram-negativnim sojevima na delovanje uzorka SU 25

sub_{eks} pokazale su se *Y. enterocolitica* (MIC=0.625 mg mL⁻¹) i *S. sonnei* (MIC=5 mg mL⁻¹). *E. coli* i *C. freundii* su bile najotpornije na delovanje ekstrakata submerzno gajenje gljive u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom, za koje je MIC vrednost bila 40 mg mL⁻¹. Druge testirane bakterije su imale iste minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije od 20 mg mL⁻¹ i 40 mg mL⁻¹ sa izuzetkom *S. Typhimurium* za koju mikrobicidna koncentracija nije utvrđena. Zapaženo je da je uzorak SU 10 sub_{eks} delovao mikrobicidno na *E. coli* H7:O157 pri koncentraciji od 20 mg mL⁻¹.

U poređenju sa kontrolnim uzorkom, uzorak SU 10 sub_{eks} je delovao efikasnije na sve testirane *Listeria* sojeve. Takođe, dvostruko niža koncentracija uzorka SU 10 sub_{eks} je bila potrebna za inhibiciju rasta bakterija *S. aureus*, *Ps. aeruginosa*, *S. Typhimurium* i *S. sonnei*, a dva do četiri puta viša za *E. faecalis*, *P. hauseri* i *C. freundii*. Ekstrakti micelijuma obogaćenih selenoureom se nisu međusobno značajnije razlikovali u pogledu antimikrobnog delovanja na testirane bakterije. U poređenju sa SU 10 sub_{eks}, uzorak SU 25 sub_{eks} je inhibirao rast *P. hauseri* pri duplo nižim koncentracijama (MIC i MBC vrednosti su iznosile 10 mg mL⁻¹). Od svih obogaćenih uzoraka SU 25 sub_{eks} je ostvario najbolji inhibitorni i mikrobicidni učinak na ovu bakteriju. SU 25 sub_{eks} je imao nižu MIC vrednost (0.652 mg mL⁻¹) za bakteriju *Y. enterocolitica* u poređenju sa SU 10 sub_{eks}.

Od Gram-pozitivnih bakterija, SU 25 sub_{eks} je ostvario bolji mikrobicidni učinak na *S. epidermidis*, i to ne samo u poređenju sa SU 10 sub_{eks} nego i sa svim ostalim uzorcima. Zajedno sa SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} se pokazao kao najefikasniji u zaustavljanju rasta *S. aureus* (MIC 2.5 mg mL⁻¹). U poređenju sa SU 10 sub_{eks} ovaj uzorak je ostvario mikrobicidni efekat prema *S. aureus* zajedno sa SP 25 sub_{eks} (MBC vrednosti 40 i 20 mg mL⁻¹ respektivno). Ovo ukazuje da su više koncentracije upotrebljene za obogaćenje medijuma za gajenje imale bolji mikrobicidni učinak na bakteriju *S. aureus*.

Analizom uticaja uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} na Gram-pozitivne bakterije najbolje dejstvo je utvrđeno na bakterije *S. epidermidis* i *L. monocytogenes* (MIC <0.3125 mg mL⁻¹). U poređenju sa ostalim uzorcima, inhibitorni efekat na *L. monocytogenes* je ustanovljen pri znatno nižoj koncentraciji uzorka SeO₃²⁻ 10

sub_{eks}, a takođe, od svih testiranih jedino je uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} delovao mikrobicidno (MBC=40 mg mL⁻¹). Posmatrajući MIC vrednosti za *S. epidermidis* bakteriju, nije otkrivena razlika između uzoraka SU 10 sub_{eks} i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}. Međutim, MBC koncentracija je bila duplo niža za SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} (MBC=10 mg mL⁻¹). Uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je delovao letalno na sve *Listeria* sojeve u koncentraciji od 40 mg mL⁻¹. *S. aureus*, *E. faecalis* i *B. cereus* su takođe pokazale osetljivost na ovaj uzorak (MIC vrednost 2.5 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹ i 5 mg mL⁻¹ respektivno). Iako su uzorci SU 25 sub_{eks} i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} imali istu MIC vrednost za *S. aureus*, primećeno je da je SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} delvao letalno na bakteriju pri znatno nižoj koncentraciji. Štaviše, koncentracija uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} koja je ispoljila mikrobicidni učinak na *S. aureus* bakteriju je bila osam puta niža nego za SU 25 sub_{eks}. Samo dve bakterije (*B. spizizeni* i *L. ivanovi*) su se pokazale kao osetljivije na SU 10 sub_{eks} u poređenju sa SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}, kada se u obzir uzmu MIC vrednosti. Među Gram-negativnim bakterijama najosetljivija je bila *Y. enterocolitica*, a u poređenju sa ostalim, uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je pokazao najbolje delovanje na ovu bakteriju, i MIC vrednost je bila niža od 0.3125 mg mL⁻¹. Isto tako, letalna koncentracija je bila dva do četiri puta niža u poređenju sa ostalim uzorcima. SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} uzorak je bio dva do četiri puta efikasniji prema bakterijama *Ps. aeruginosa*, *E. coli* H7:0157 i *S. Enteritidis* u poređenju sa ostalim uzorcima sa MIC vrednostima od 10 mg mL⁻¹, 5 mg mL⁻¹ i 10 mg mL⁻¹ respektivno. MBC vrednost je bila ista za sve bakterije i iznosila je 20 mg mL⁻¹.

Primetan je mikrobicidni učinak uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} na *S. Typhimurium* koji je utvrđen jedino kod ovog uzorka. Lošiji mikrobistatični učinak ovog ekstrakta u poređenju sa ostalim uzorcima uočen je kod bakterije *S. sonnei*. Poređenjem sa kontrolnim uzorkom metanolnog ekstrakta biomase gljive *C. versicolor* gajene bez dodatka selena (K sub_{eks}), ustanovljeno je da su uzorci obogaćeni natrijum selenitom pokazali bolje dejstvo na veći broj Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Najveće poboljšanje je ustanovljeno u odnosu na *L. monocytogenes*. Koncentracija uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} koja je bila potrebna za inhibiciju rasta ove bakterije je bila značajno niža (<0.3125 mg mL⁻¹) u poređenju sa K sub_{eks} (20 mg mL⁻¹), i za razliku od neobogaćenog uzorka, SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je

ispoljio letalni efekat. Od testiranih uzoraka odgajenih submerzno jedino je SeO_3^{2-} 10 sub_{eks} delovao letalno na *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* i *S. Typhimurium*.

Ekstrakti obogaćeni Sel-Plex[®]-om su pokazali generalno najslabiji antibakterijski učinak, kako u poređenju sa kontrolnim uzorkom, tako i u poređenju sa ostalim selenom obogaćenim uzorcima gajenim submerzno. Koncentracije potrebne za inhibiciju rasta Gram-negativnih bakterija su bile znatno više u poređenju sa ostalim uzorcima. Jedino je uzorak SP 10 sub_{eks} inhibirao rast bakterije *S. epidermidis* pri koncentraciji nižoj od 0.3125 mg mL⁻¹. Poređenjem ekstrakta micelijuma obogaćenih istom koncentracijom organskog izvora selena (selenourea ili Sel-Plex[®]) utvrđen je bolji letalni efekat uzorka SP 25 sub_{eks} prema *S. aureus* bakteriji u poređenju sa SU 25 sub_{eks}. Mikrobicidni efekat uzoraka obogaćenih Sel-Plex[®]-om je uočen kod četiri testirane Gram-negativne bakterije, i to pri najvišoj upotrebljenoj koncentraciji.

Testirani ekstrakti nisu imali nikakav uticaj na ispitivane kvasce. Odsustvo ili veoma slabo antimikrobno delovanje ekstrakata gljive *C. versicolor* na patogene kvasce prijavljeno je i u drugim istraživanjima (Zaidi et al., 2013).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 21. Antimikrobno delovanje metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* na odabrane sojeve Gram-pozitivnih bakterija.

Test bakterija		Uzorak					
		K sub _{eks}	SU 10 sub _{eks}	SU 25 sub _{eks}	SP 10 sub _{eks}	SP 25 sub _{eks}	SeO ₃ ²⁻ 10 sub _{eks}
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	MIC	20.0±0.0 ^{a*}	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	n.d.	40.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^c
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10.0±0.0
<i>B. spizizeni</i> ATCC 6633	MIC	<0.3125±0.0000 ^a	<0.3125±0.0000 ^a	<0.3125±0.0000 ^a	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^c
	MBC	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	Nd	n.d.	10.0±0.0 ^a
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	MIC	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0	10.0±0.0	n.a.	5.0±0.0
	MBC	n.d.	5.0±0.0	5.0±0.0	10.0±0.0	n.a.	5.0±0.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MIC	10.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^b	2.5±0.0 ^c	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	2.5±0.0 ^c
	MBC	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^b	n.d.	20.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^c
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	MIC	<0.3125±0.0000 ^a	<0.3125±0.0000 ^a	<0.3125±0.0000 ^a	<0.3125±0.0000 ^a	40.0±0.0 ^b	<0.3125±0.0000 ^a
	MBC	n.d.	20.0±0.0 ^a	<0.3125±0.0000 ^b	5.0±0.0 ^c	5.0±0.0 ^c	10.0±0.0 ^d
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	MIC	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^c	40.0±0.0 ^c	<0.3125±0.0000 ^d
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40.0±0.0
<i>L. ivanovii</i> ATCC 19119	MIC	1.25.0±0.0 ^a	0.3125±0.0000 ^b	0.3125±0.0000 ^b	10.0±0.0 ^c	20.0±0.0 ^d	20.0±0.0 ^d
	MBC	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
<i>L. innocua</i> ATCC 33090	MIC	n.d.	40.0±0.0	40.0±0.0	40.0±0.0	n.d.	40.0±0.0
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40.0±0.0

*K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenourom u koncentraciji od 10 i 25 mg Se L⁻¹; SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 i 25 mg Se L⁻¹; SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom. **Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).

Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey's HSD. ** Nije određeno.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 22. Antimikrobno delovanje ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* na Gram-negativne bakterije i kvasace.

Test mikroorganizam		Uzorak					
		K sub _{eks} *	SU 10 sub _{eks}	SU 25 sub _{eks}	SP 10 sub _{eks}	SP 25 sub _{eks}	SeO ₃ ²⁻ 10 sub _{eks}
<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453	MIC**	20.0±0.0 ^{a***}	20.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b
	MBC	40.0±0.0 ^a	n.d.****	n.d.	n.d.	n.d.	40.0±0.0 ^a
<i>P. hauseri</i> ATCC 13315	MIC	10.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^c	40.0±0.0 ^c	40.0±0.0 ^c
	MBC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^c	40.0±0.0 ^c	40.0±0.0 ^c
<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 27853	MIC	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^c
	MBC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	20.0±0.0 ^b
<i>E. coli</i> ATCC 25922	MIC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
	MBC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
<i>E. coli</i> H7:O157 ATCC 35150	MIC	20.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^c
	MBC	n.d.	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	20.0±0.0 ^b
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	MIC	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^c
	MBC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	n.d.	n.d.	20.0±0.0 ^b
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	MIC	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	40.0±0.0
<i>S. sonnei</i> ATCC 29930	MIC	10.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^b	10.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^c
	MBC	20.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^b	40.0±0.0 ^b	n.d.	n.d.	20.0±0.0 ^a
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 27729	MIC	5.0±0.0 ^a	5.0±0.0 ^a	0.625±0.000 ^b	2.5.0±0.0 ^c	2.5.0±0.0 ^c	0.3125±0.0000 ^d
	MBC	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b	20.0±0.0 ^b	n.d.	40.0±0.0 ^a	10.0±0.0 ^c
<i>C. freundii</i> ATCC 43864	MIC	10.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	20.0±0.0 ^b
	MBC	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a	40.0±0.0 ^a
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	MIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	MIC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MBC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*K sub_{eks}-kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks}- metanolni ekstrakt metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream u koncentraciji od 10 i 25 mg Se L⁻¹; SP 10 sub_{eks}, SP 25 sub_{eks}- metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 i 25 mg Se L⁻¹; SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}-metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom.**Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).***Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Tukey's HSD. **** Nije određeno.

Antimikrobno delovanje ekstrakata gljive *C. versicolor* poslednjih godina predmet je brojnih istraživanja. Zaidi i saradnici (2013) su testirali dve vrste bioaktivnih jedinjenja izolovanih iz kulture submerzno gajene gljive *C. versicolor*. Prvi uzorak je dobijen ekstrakcijom peleta u smeši vode i etanola a drugi Tris HCl-etanolnom ekstrakcijom. Testirani ekstrakti nisu pokazali antimikrobno delovanje na *S. aureus* bakteriju iako je visoka koncentracija uzorka upotrebljena u eksperimentu (1000 mg L^{-1}). Veoma male zone inhibicije su uočene pri aplikaciji ekstrakta u koncentraciji od 300 mg mL^{-1} na *E. coli* i *S. Typhimurium* (5 mm i 2 mm, redom). Sa druge strane, Çoban i saradnici (2008) su testirali antibakterijsku aktivnost polisaharopeptida (PSP) izolovanih iz submerzno odgajene gljive *C. versicolor*. Potvrđeno je njihovo delovanje na *S. aureus* i *B. subtilis* ali ekstrakt nije imao efekta na *E. coli* i *S. epidermidis*. U ovoj studiji, maksimalne testirane koncentracije (40 mg mL^{-1}) svih uzoraka metanolnog ekstrakta ne samo da su inhibirale rast *E. coli* već su delovale i mikrobicidno. Takođe, svi uzorci dobijeni submerznim gajenjem su delovali inhibitorno na *S. Typhimurium* (Tabela 22). Štaviše, prilikom aplikacije ekstrakata gljive rasle na selenourei na bakteriju *S. Typhimurium*, MIC vrednosti su bile još niže (20 mg mL^{-1}) a uzorak SeO_3^{2-} 10 sub_{eks} je delovao i mikrobicidno. Metanolni ekstrakti selenom obogaćenih gljiva su u različitoj meri takođe bili efikasni prema *S. aureus* (Tabela 21).

Različito delovanje testiranih uzoraka metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma gljive *C. versicolor* je najverovatnije posledica razlika u hemijskom sastavu ekstrakta. Dobijeni rezultati su potvrdili prethodna istraživanja i zaključke da ne samo da vrsta gljive, već i uslovi rasta i sastav medijuma za gajenje utiču na antimikrobnost uzoraka. Dodatno, dokazano je da se metode izolacije antimikrobnih jedinjenja moraju uzeti u obzir kada se donose zaključci o potencijalu neke gljive da produkuje bioaktivna jedinjenja sa antimikrobnim delovanjem.

Pored toga, moraju se uzeti u obzir i svojstva testiranih mikroorganizama. Naime, predpostavlja se da varijacije u strukturi ćelijskog zida mogu biti uzrok različite otpornosti bakterija na isti uzorak antimikrobnih komponenti. Kompleksniji sastav ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija ima ulogu difuzione

barijere koja pruža veću otpornost na antimikrobna jedinjenja (Klančnik et al., 2010). Sadržaj peptidoglukana u ćelijskom zidu varira između 10 % i 60 % kada se uporede Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije. Mehanizam antimikrobnog delovanja je uglavnom vezan za smetnje u sintezi ćelijskog zida, modifikaciji propustljivosti ćelijske membrane, interferenciju pri replikaciji hromozoma ili tokom sinteze proteina (Alves et al., 2012). Istraživači su prijavili da polisaharidi mogu da oštete ćelijski zid i citoplazmatičnu membranu bakterije. Takva oštećenja mogu dovesti do rastvaranja proteina i curenja ćelijskog sadržaja što dovodi do smrti ćelije. Dodatno, nakon ulaska antimikrobnih komponenti u ćeliju, može doći i do dekompozicije DNK (He et al., 2010).

Takođe, bitan je i način gajenja gljive, koji može takođe uticati na njena antimikrobna svojstva. Mehta i Jandaik (2012) su prijavili bolje antibakterijsko delovanje metanolnih ekstrakata micelijuma u poređenju sa plodonosnim telom gljive *Ganoderma lucidum*. Isti autori su pokazali da su oba testirana ekstrakta sadržala antibakterijske konstituente koji su inhibirale rast i Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Bolja inhibitorna aktivnost metanolnog ekstrakta micelijuma u poređenju sa plodonosnim telom je verovatno zbog različitog sastava polisaharida u ćelijskom zidu gljive rasle u submerznom procesu. Obavezni konstituenti ćelijskog zida micelijuma, plodonosnih tela i drugih delova mikro i makromiceta su strukturno varijabilni polimeri D-glukopiranoze odnosno glukani. Neki egzopolisaharidi se takođe definišu kao glukani. Uprkos jednostavnosti njihovog monosaharidnog sastava (prema definiciji trebali bi da sadrže samo glukozu), postoji veliki broj strukturno različitih glukana, a raznovrsnost se postiže brojnošću i anomernim konfiguracijama d-glukopiranoznih jedinica, položajem i sekvencom glukozidnih veza u lancu, stepenom grananja i konformacijom lanca. Razgranati glukani mogu da sadrže veliki broj bočnih lanaca, sa jednom ili više monosaharidnih jedinica vezanih za kostur na različitim pozicijama (Synytsya i Novák, 2013). β -glukani mogu biti povezani sa proteinima, lipidima i drugim polisaharidima. Od same strukture β -glukana zavisi njihovo biološko delovanje. Njihova molekulska masa, hemijski sastav, broj bočnih lanaca i prostorna konfiguracija određuje fizička i terapijska svojstva glukana izolovanih iz gljiva

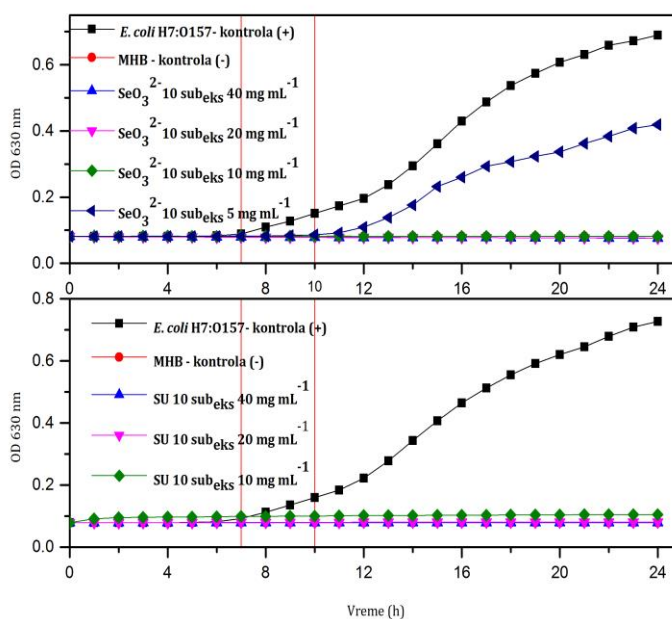
(Szwengiel i Stachowiak, 2016). Upravo pomenute razlike u sastavu i strukturi mogu biti jedan od uzroka različitog delovanja ekstrakata plodonosnih tela i ekstrakata micelijuma dobijenog submerznim gajenjem iste gljive.

Ekstrakti micelijuma i plodonosnih tela gljive *C. versicolor* dobijenog gajenjem u tečnoj podlozi i na čvrstom supstratu sa dodatkom organskih i neorganskih izvora selena su ispoljili različito antimikrobno delovanje u zavisnosti od testirane koncentracije ekstrakta i testiranog soja bakterije. Radi dobijanja više informacija o efikasnosti određenih koncentracija ekstrakata da zaustave rast ili ubiju ćelije bakterija, merene su promena optičke gustine bujona sa suspenzijom bakterija i ekstraktom odgovarajuće koncentracije tokom 24 h.

5.5.1.3 Antibakterijski potencijal metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* određen merenjem optičke gustine (*Optical Density*)-kinetika rasta

Uticaoj ekstrakata tokom 24 h na rast bakterija prikazan je pomoću krivih rasta. Budući da su ekstrakti micelijuma uglavnom pokazali bolju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa ekstraktima plodonosnih tela, ispitivane su promene u kinetici rasta pod uticajem metanolnih ekstrakata submerzno gajene gljive. Izabrane su jedna Gram-pozitivna (*S. aureus*) i jedna Gram-negativna bakterija (*E. coli* H7:O157).

Na Grafiku 8 dat je uporedni prikaz krive rasta bakterije *E. coli* H7 : O157 pod uticajem MIC i MBC koncentracija dva različita ekstrakata: SeO_3^{2-} 10 sub_{eks} i SU 10 sub_{eks}. Na krivoj rasta bakterije se uočavaju: lag faza, eksponencijalna faza i stacionarna faza. Fazu odumiranja bakterijskih ćelija nije bilo moguće uočiti budući da se pri praćenju optičke gustine meri apsorbanca i živih i mrtvih ćelija bakterije (Li et al., 2010).



Grafik 8. Uporedni prikaz uticaja metanolnih ekstrakata SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} i SU 10 sub_{eks} na *E. coli* H7 : O157.

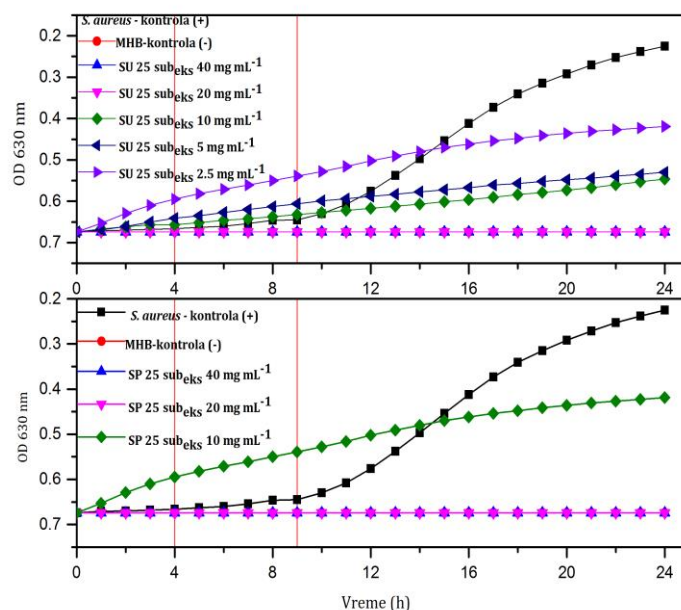
Izmerena OD vrednost Müller Hinton bujona (MHB-negativna kontrola) je bila manja od 0.1 i nije se menjala tokom 24 h koliko je analiza trajala. Apsorbanca uzorka jednaka apsorbanci negativne kontrole ukazuje na odsustvo rasta bakterijske kulture i mikrobicidni učinak ekstrakta. Primećeno je da nije postojala razlika u OD vrednosti između negativne kontrole i uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} pri koncentracijama od 10, 20 i 40 mg mL⁻¹, što se na Grafiku 8 uočava kao preklapanje linija crvene (MHB), zelene (10 mg mL⁻¹), ljubičaste (20 mg mL⁻¹) i svetlo plave (40 mg mL⁻¹) boje. Isti uzorak u nešto nižoj koncentraciji (5 mg mL⁻¹) za koga je prethodno utvrđeno mikrobistatično delovanje, dao je nešto drugačiju sliku. Uočava se produženje lag faze u trajanju od tri sata i skraćeno vreme trajanja eksponencijalne faze rasta. Duže trajanje lag faze se odražava na vreme potrebno za postizanje eksponencijalnog rasta kulture (Roszak i Colwell, 1987). Tako je izmerena znatno niža krajnja OD vrednost uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} u koncentraciji od 5 mg mL⁻¹ u poređenju sa pozitivnom kontrolom. To ukazuje na ometanje rasta početnog broja bakterija od strane dodatog ekstrakta što dovodi do produžetka

vremena potrebnog za prilagođavanje u sredini koja sadrži antimikrobne komponente.

Uporedni prikaz delovanja ekstrakta gljive rasle u tečnoj podlozi obogaćenom seleno u ukazao je na verovatno potencijalne razlike u mehanizmu delovanja analiziranih ekstrakata. Prethodno utvrđeno mikrobicidno delovanje koncentracija ekstrakata SU 10 sub_{eks} u koncentracijama od 40 i 20 mg mL⁻¹ je potvrđeno odsustvom porasta apsorbance u poređenju sa negativnom kontrolom. Međutim, za MIC koncentraciju uzorka (10 mg mL⁻¹) primećen je mali porast OD vrednosti u poređenju sa negativnom kontrolom, koji je ostao konstantan tokom čitavog eksperimenta. Krajnja OD vrednost je bila veoma niska, što ukazuje da je uzorak u primenjenoj koncentraciji delovao veoma inhibitorno na rast bakterije, ali ipak nije bio dovoljan da spreči rast svih prisutnih ćelija.

Dobijeni rezultati ukazuju na moguće greške prilikom vizuelnog očitavanja rezultata antimikrobne aktivnosti, odnosno vrlo male promene boje bujona nakon inkubacije koje se ne mogu lako uočiti golim okom. Međutim, važno je napomenuti da zbog veoma bliske apsorbance uzorka i negativne kontrole, za pouzdano utvrđivanje mikrobicidnog učinka ispitivane koncentracije uzorka, potrebno je iz odgovarajućeg bujona izvršiti zasejavanje agara na odgovarajuću čvrstu podlogu kako potvrdio efekat antimikrobnih komponenti, što je i urađeno, a rezultati su prikazani u Tabeli 22.

Na Grafiku 9. prikazan je uticaj MIC i MBC koncentracija ekstrakata obogaćenih seleno u i Sel-Plex[®]-om u koncentraciji od 25 mg mL⁻¹. Kriva rasta čiste kulture bakterije *S. aureus* pokazala je lag, eksponencijalnu i stacionarnu fazu. Mikrobicidni učinak ekstrakata ustanovljen je odsustvom porasta OD vrednosti u odnosu na negativnu kontrolu, pri koncentracijama od 40 i 20 mg mL⁻¹ i 20 mg mL⁻¹ za oba uzorka. Ipak, proverom zasejavanjem na čvrstoj podlozi utvrđeno je da je MBC vrednost za uzorak SU 25 sub_{eks} 40 mg mL⁻¹. Interesantno, sve ostale MIC testirane koncentracije su pokazale odsustvo lag faze. Takođe, na osnovu izgleda dobijenih krivih rasta, ne može se sa sigurnošću odrediti početak eksponencijalne faze kada je kulturi dodat ekstrakt.



Grafik 9. Uporedni prikaz delovanja metanolnih ekstrakata SU 25 sub_{eks} i SP 25 sub_{eks} na *S. aureus*.

5.5.2 Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu i u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Oksidativni stres koji se javlja usled disbalansa između nivoa slobodnih radikala i odbrambenog mehanizma organizma smatra se ozbiljnim uzrokom mnogih bolesti modernog doba uključujući i kancer. U okviru bioaktivnih konstituenata prisutnih u gljivama, fenolne komponente privlače najviše pažnje (Nowacka et al., 2014). Takođe, ranije je dokazan uticaj različitih oblika selena na poboljšanje antioksidativne aktivnosti vodenih i metanolnih ekstrakata gljiva (Turlo et al., 2010a). Kao što je u ovoj tezi već pokazano, ekstrakti gljiva gajeni na podlogama sa dodatkom selena predstavljaju značajan izvor navedenih aktivnih komponenti. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata su prikazani u nastavku.

5.5.2.1 Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih DPPH radikala

DPPH je slobodni radikal i reagens koji se nalazi u širokoj upotrebi za određivanje sposobnosti različitih komponenti da vezuju slobodne radikale (Su et al., 2008). Broj DPPH slobodnih radikala značajno opada u prisustvu komponenti koje mogu da vežu protone (Yamaguchi et al., 1998). Princip metode je zasnovan na činjenici da DPPH slobodni radikali sadrže nesparene elektrone. Rastvor DPPH koji se koristi za ispitivanje antioksidativne sposobnosti daje apsorpcioni maksimum na 517 nm u vidljivom delu spektra (ljubičasto obojenje). Kada se takvom rastvoru doda određena koncentracija ispitivanog jedinjenja koje je donor vodonika (antioksidativno jedinjenje) dolazi do međusobnog sparivanja DPPH elektrona i vodonika. Na taj način dolazi do smanjenja broja slobodnih DPPH radikala čime se smanjuje intenzitet obojenja reakcione smeše, što dovodi do snižavanja intenziteta apsorpcije. Step en dekolorizacije zavisi od broja elektrona vezanih od strane vodonikovih jona (Yamaguchi et al., 1998).

5.5.2.1.1 Sposobnost vezivanja slobodnih DPPH radikala metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

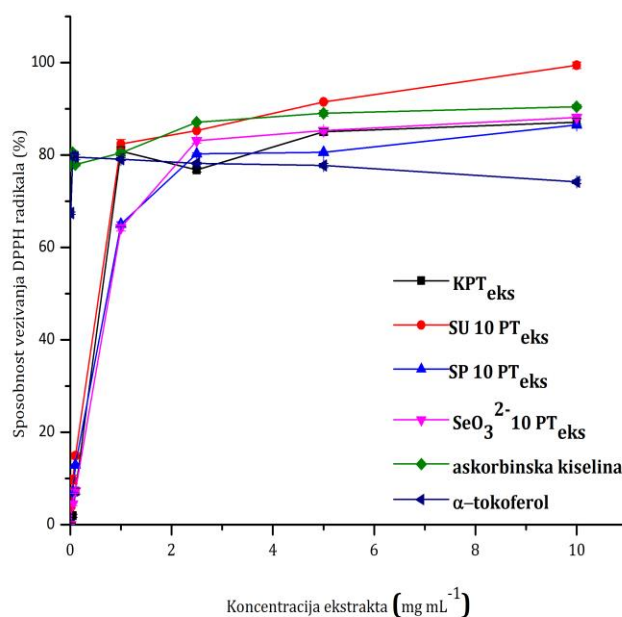
Na samom početku utvrđena je visoka sposobnost redukcije slobodnih DPPH radikala pozitivnih kontrola, α -tokoferola i askorbinske kiseline. Procenat vezivanja DPPH slobodnih radikala je bio veoma visok i pri niskim koncentracijama pozitivnih kontrola. Tako se za α -tokoferol taj procenat kretao između 67.41 i 79.84 % a za askorbinsku kiselinu između 77.71 % i 80.49 % pri koncentracijama 0.01 mg g⁻¹ i 0.05 mg g⁻¹, respektivno.

Rezultati antioksidativne aktivnosti metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena određeni preko DPPH metode su prikazani na Grafiku 10. Kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive (KPT_{eks}) je pokazao nešto nižu sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala (Grafik 10) u

poređenju sa metanolnim ekstraktom micelijuma dobijenog submerznim gajenjem ($K_{\text{sub_eks}}$), (Grafik 11). To je najverovatnije posledica značajno višeg ($p \leq 0.05$) sadržaja fenolnih jedinjenja u uzorku $K_{\text{sub_eks}}$ ($24.08 \pm 1.22 \text{ mg g}^{-1}$, Tabela 18), u poređenju sa $K_{\text{PT_eks}}$ ($18.19 \pm 1.15 \text{ mg g}^{-1}$, Tabela 15). Ranijim istraživanjima antioksidativnih svojstava gljive *L. edodes* zaključeno je da ekstrakti micelijuma dobijeni submerznim gajenjem ispoljavaju bolju antioksidativnu aktivnost i da deluju u nižim koncentracijama u poređenju sa ekstraktima plodonosnih tela iste gljive (Turlo et al., 2010a).

Utvrđena je slaba sposobnost vezivanja radikala svih testiranih metanolnih ekstrakata pri koncentraciji od 0.05 mg g^{-1} između 1.94 % i 9.75 %. Značajniji efekti su postignuti tek pri koncentraciji ekstrakata od 1 mg mL^{-1} , kada je procenat vezivanja DPPH slobodnih radikala bio između 64.21 % i 82.38 %. Pri pomenutoj koncentraciji sposobnost testiranih uzoraka da vezuju DPPH radikale je opadala sledećim redosledom: $SU 10 \text{ PT}_{\text{eks}} \approx K \text{ PT}_{\text{eks}} \approx \text{askorbinska kiselina} \approx \alpha\text{-tokoferol} > SP 10 \text{ PT}_{\text{eks}} > \text{SeO}_3^{2-} 10 \text{ PT}_{\text{eks}}$. Sa porastom koncentracije ekstrakata, rastao je antioksidativni efekat testiran ovom metodom. Zapažen je skok u redukciji kod uzorka $SU 10 \text{ PT}_{\text{eks}}$ pri koncentraciji od 5 mg g^{-1} , što predstavlja prvu koncentraciju ovog uzorka koja je nadmašila efekat obe pozitivne kontrole. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji, $SU 10 \text{ PT}_{\text{eks}}$ je redukovao broj DPPH slobodnih radikala čak za 99.42 %. Pri najvišim testiranim koncentracijama ekstrakata, sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala je povećana kod svih uzoraka i nalazila se u opsegu između 86.47 % i 88.1 %.

Rezultati ranijih istraživanja su pokazali da metanolni ekstrakt plodonosnih tela gljive *P. fossulatus* obogaćene selenom poseduje statistički značajno veću sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Bhatia et al., 2014). Takođe, utvrđeno je da metanolni ekstrakti micelijuma iste gljive pokazuju bolju sposobnost redukcije DPPH slobodnih radikala u poređenju sa metanolnim ekstraktima plodonosnih tela (Huang et al., 2006).



Grafik 10. Sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor*.

Efektivne koncentracije, EC₅₀ metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive dobijene na osnovu regresione analize prikazane su u Tabeli 23. Utvrđeno je da je najniža koncentracija uzorka SU 10 PT_{eks} bila potrebna za redukciju broja DPPH slobodnih radikala, a zatim slede KPT_{eks}, SP 10 PT_{eks} i SeO₃²⁻ 10 PT_{eks}. Regresionom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija između EC₅₀, i pojedinačno ukupnog sadržaja selena, sadržaja ukupnih polisaharida i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja. Antioksidativna aktivnost nekog uzorka može biti efekat sinergističkog ili pak antagonističkog delovanja različitih konsituenata prisutnih u gljivama (Nowacka et al., 2014). Takođe, ranija istraživanja su pokazala da antioksidativni efekat zavisi, ne samo od sadržaja, nego i od strukture prisutnih fenolnih jedinjenja.

Tabela 23. Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je vezano 50 % DPPH slobodnih radikala.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
KPT**	0.63±0.03 ^{a***}
SU 10 PT _{eks}	0.59±0.04 ^a
SP 10 PT _{eks}	0.74±0.00 ^b
SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}	0.78±0.00 ^b
Askorbinska kiselina	<0.01
α-tokoferol	<0.01

*Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je vezano 50 % DPPH slobodnih radikala. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenouream (10 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom u (10 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher's LSD.

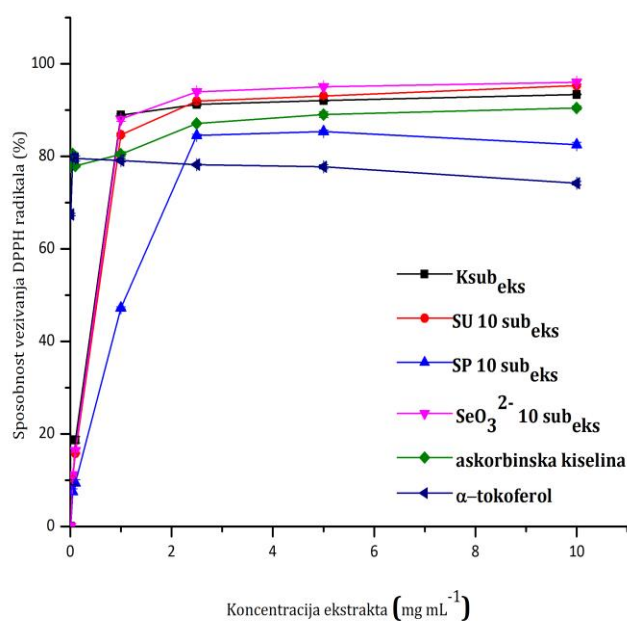
Za utvrđivanje uzroka različitog antioksidativnog delovanja metanolnih ekstrakata potrebno je izvršiti karakterizaciju prisutnih fenolnih jedinjenja. Budući da sadržaj selena u plodonosnim telima gljive nije bio visok, najverovatnije je njegov uticaj na rastvorljivost i ekstrakciju polisaharida bio slabiji, pa je u poređenju sa kontrolnim uzorkom, jedino SP 10 PT_{eks} imao statistički značajno (p≤0.05) niži sadržaj polisaharida (Tabela 13).

5.5.2.1.2 Sposobnost vezivanja slobodnih DPPH radikala metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala metanolnog ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* obogaćene selenom prikazana je na Grafiku 11. Vezivanje DPPH slobodnih radikala kod kontrolnog uzoraka (K_{sub_eks}), pri koncentraciji ekstrakta od 0.1 mg mL⁻¹ iznosila je 18.72 ± 0.66 %. Svi selenom obogaćeni uzorci su imali niže vrednosti pri istoj testiranoj koncentraciji. Kao najefikasniji pokazao se SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} (16.35 ± 0.33 %), a zatim slede SU 10 sub_{eks} (15.76 ± 0.11 %) i SP 10 sub_{eks} (9.43 ± 0.66 %) koji je ispoljio nešto nižu sposobnost vezivanja radikala pri istoj koncentraciji.

Sa porastom koncentracije ekstrakta, sposobnost vezivanja DPPH radikala je rasla. Pri koncentraciji od 1 mg mL⁻¹ uzorci su dostigli veoma visok nivo aktivnosti, a najizraženiji skok su imali kontrolni uzorak (89.91 %) i uzorak dobijen gajenjem u tečnoj podlozi sa natrijum selenitom (između 88.05 %). Primećeno je da je ekstrakt uzorka dobijenog gajenjem u podlozi sa Sel-Plex®-om pri ovoj koncentraciji pokazao znatno lošije rezultate, budući da je njegova sposobnost redukcije slobodnih radikala iznosila tek 47.23 ± 0.24 %. Maksimalni efekat je uočen pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakta, od 10 mg mL⁻¹. Pri maksimalnoj testiranoj koncentraciji, svi uzorci su ispoljili znatno bolji antioksidativni efekat u poređenju sa α -tokoferolom, a jedino je uzorak SP 10 sub_{eks} bio slabiji antioksidans u poređenju sa askorbinskom kiselinom. Kao najefikasniji su se pokazali uzorci SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} (96.00 ± 0.37 %), zatim slede SU 10 sub_{eks} (95.3 ± 0.22 %), i K_{sub_eks} (93.37 ± 0.11 %). Kao najmanje efikasan se pokazao uzorak SP 10 sub_{eks} koji je vezao 82.47 ± 0.54 % slobodnih DPPH radikala.

Bolju sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala selenom obogaćenih metanolnih ekstrakata *L. edodes* u poređenju sa neobogaćenim ekstraktom pokazali su i Turlo i saradnici (2010a). Međutim, u tim eksperimentima su dobijene znatno niže vrednosti (< 70 %).



Grafik 11. Sposobnost vezivanja slobodnih DPPH radikala metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor*.

U Tabeli 24. su prikazane EC₅₀ vrednosti metanolnih ekstrakata micelijuma gljive potrebnih za vezivanje 50 % slobodnih DPPH radikala. Vrednosti EC₅₀ kontrolnog uzorka, uzoraka obogaćenih selenouream i natrijum selenitom su se nalazile u opsegu između 0.52 i 0.55 mg mL⁻¹ i nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (p≤0.05). Prema dobijenim EC₅₀ vrednostima uzorak SP 10 sub_{eks} je pokazao najslabiji efekat. Regresionom analizom je ustanovljeno da postoji statistički značajna (p≤0.05) i veoma visoka pozitivna korelacija između sadržaja selena u ekstraktima micelijuma (r=0.97) i EC₅₀. To znači da sa porastom sadržaja selena u ekstraktima micelijuma, raste koncentracija ekstrakta koja je potrebna za redukciju 50 % slobodnih radikala. Sadržaj selena u ekstraktima micelijuma opada sledećim redosledom SP 10 sub_{eks} > SU 10 sub_{eks} SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} > K sub_{eks}. Ovakav uticaj selena je samo prividno negativan.

Tabela 24. Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je vezano 50 % DPPH slobodnih radikala.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
K sub_{eks}**	0.52±0.05 ^{a***}
SU 10 sub_{eks}	0.55±0.02 ^a
SP 10 sub_{eks}	1.11±0.00 ^b
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	0.52±0.02 ^a
Askorbinska kiselina	<0.01
α-tokoferol	<0.01

*Vrednosti su dobijene interpolacijom pomoću linearne regresione analize i prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Naime, ranije je pokazano da sa porastom sadržaja selena u micelijumu opada sadržaj polisaharida u ekstraktu, što ukazuje na to da niži sadržaj selena u obogaćenim ekstraktima daje hemijski sastav koji se povoljno odražava na antioksidativnost. To potvrđuje i ustanovljena veoma visoka, negativna, statistički značajna korelacija (r=-0.98, p≤0.05) između ukupnog sadržaja polisaharida u ekstraktima i EC₅₀. Takođe, ustanovljena je i veoma izražena negativna korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima micelijuma (r=-0.97, p≤0.05) i EC₅₀ vrednosti. Obzirom na to da uzorak SP 10 sub_{eks} ima statistički značajno manji sadržaj fenolnih jedinjenja u poređenju sa ostalim uzorcima, što verovatno predstavlja i uzrok slabijeg antioksidativnog efekta u poređenju sa ostalim uzorcima. Takođe, sadržaj ukupnih polisaharida, β-glukana i fenolnih jedinjenja u uzorku SP 10 sub_{eks} je bio statistički značajno (p≤0.05) niži u

poređenju sa ostalim testiranim ekstraktima sto bi mogao da bude dodatni razlog nižeg antioksidativnog potencijala ovog uzorka.

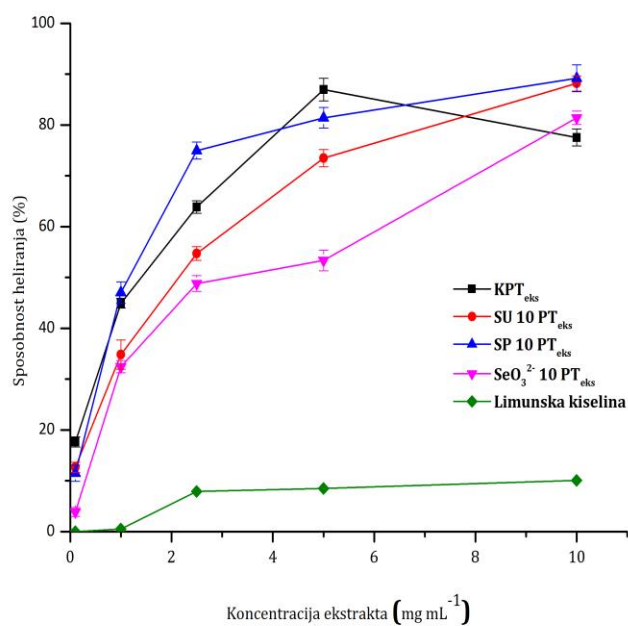
5.5.2.2 Određivanje sposobnosti heliranja Fe^{2+} jona

Fe^{2+} joni spadaju u najefikasnije prooksidanse koji se nalaze u hrani. Prooksidansi su hemijska jedinjenja koja dovode do pojave oksidativnog stresa putem stvaranja slobodnih kiseonikovih vrsta. Gvožđe stimuliše lipidnu peroksidaciju Fentonovom reakcijom i ubrzava peroksidaciju razlaganjem lipidnih hidroperoksida. Visoka sposobnost heliranja Fe^{2+} jona koju medicinske gljive poseduju može biti iskorišćena pri proizvodnji hrane (Mau et al., 2002; Soares et al., 2009). Uspešnost nekog uzorka da helira fero jone se utvrđuje na osnovu procenta inhibicije formiranja kompleksa Fe^{2+} -ferozin (Elmastas et al., 2007). Naime, ukoliko je prisutan, helirajući agens zaustavlja formiranje crveno obojenog kompleksa Fe^{2+} -ferozin zbog čega dolazi do smanjenja intenziteta boje. Merenje stepena smanjenja intenziteta boje merenjem apsorbance na 550 nm moguće je proceniti helirajuću sposobnost nekog agensa. Niža apsorbance ukazuje na višu helirajuću sposobnost (Soares et al., 2009).

5.5.2.2.1 Sposobnost heliranja Fe^{2+} jona metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Sposobnost heliranja jona gvožđa uzoraka KPT_{eks}, SU 10 PT_{eks}, SP 10 PT_{eks} i SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} za ispitivani opseg koncentracija od 0.1 mg g⁻¹ do 10 mg g⁻¹ su bile 17.65 - 86.57 %, 12.66 - 88.17 %, 11.46 - 89.19 % i 3.88 - 81.42 %, respektivno. Sa Grafika 12. se može uočiti da je kontrolni uzorak ispoljio najbolju sposobnost heliranja pri koncentraciji od 5 mg g⁻¹. Porastom koncentracije ekstrakata sposobnost heliranja kod ostalih uzoraka je rasla. Kada je testirana najviša koncentracija ekstrakta, svi selenom obogaćeni uzorci su ispoljili bolju helirajuću sposobnost u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Procenat helirajućih jona uzoraka

SU 10 PT_{eks} i SP 10 PT_{eks} je gotovo izjednačen i statistički značajno viši ($p \leq 0.05$) od vrednosti dobijenih za KPT_{eks} i SeO_3^{2-} 10 PT_{eks}.



Grafik 12. Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata plodnosnih tela gljive *Coriolus versicolor*.

Na osnovu regresione analize utvrđeno je da je najnižu koncentraciju potrebnu za heliranje 50 % Fe^{2+} jona imao uzorak SP 10 PT_{eks} (Tabela 25), a zatim slede KPT_{eks}, SU 10 PT_{eks} i na kraju SeO_3^{2-} 10 PT_{eks}.

Tabela 25. Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je helirano 50 % Fe²⁺ jona.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
KPT _{eks} **	1.40±0.00 ^{a***}
SU 10 PT _{eks}	2.14±0.00 ^b
SP 10 PT _{eks}	1.16±0.00 ^c
SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}	3.16±0.00 ^d
Limunska kiselina	n.u. ****

*Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je helirano 50 % Fe²⁺ jona. Vrednosti prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom (10 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg⁻¹). ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD. **** Nije utvrđeno.

5.5.2.2 Sposobnost heliranja Fe²⁺ jona metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

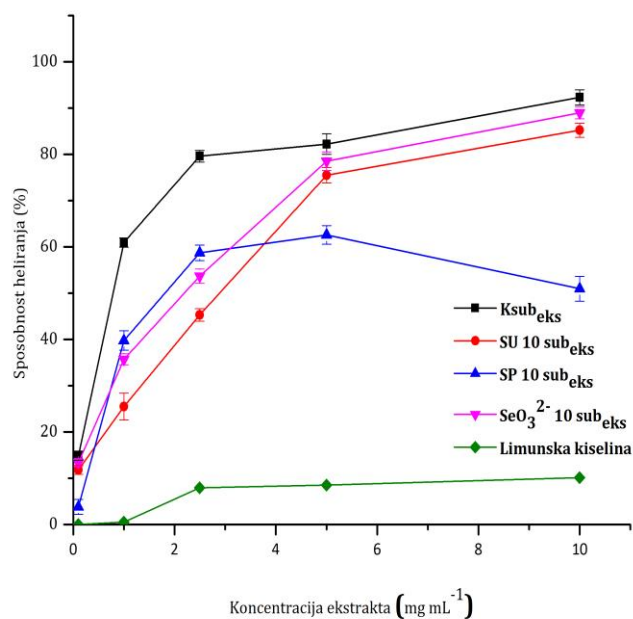
Sposobnost heliranja Fe²⁺ jona pomoću metanolnih ekstrakata micelijuma gljive prikazana je na Grafiku 13. Limunska kiselina koja je upotrebljena kao pozitivna kontrola se nije pokazala kao dobar helirajući agens, budući da je pri maksimalnoj koncentraciji od 10 mg g⁻¹ inhibirala tek 10.1 % Fe²⁺ jona. Slični rezultate prijavljeni su i u ranijim istraživanjima (Tsai et al., 2006). Helirajuća sposobnost metanolnih ekstrakata micelijuma je ispitivana za opseg koncentracija između 0.1 i 10 mg g⁻¹. Najbolju sposobnost heliranja Fe²⁺ jona je pokazao kontrolni uzorak, K sub_{eks}, koji je helirao između 14.83 % i 92.28 % Fe²⁺ jona pri

ispitivanim koncentracijama. Selenom obogaćeni ekstrakti su ispoljili različitu stepen sposobnosti heliranja pri porastu koncentracije ekstrakta između 0.1 i 1 mg g⁻¹, i to 13.68 % (SU 10sub_{eks}), 35.95 % (SP 10 sub_{eks}) i 22.32 % (SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}). Daljim rastom koncentracije ekstrakta helirajuća sposobnost uzoraka SU 10sub_{eks} i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je rasla. Uzorak SU 10 sub_{eks} je helirao statistički značajno niži procenat Fe²⁺ jona (85.21 %, p≤0.05) u poređenju sa kontrolnim uzorkom pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Helirajuća sposobnost metanolnog ekstrakta SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} koncentracije 10 mg g⁻¹ je bila 88.98 % i nije se statistički značajno razlikovala (p≤0.05) u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Za razliku od pomenutih, metanolni ekstrakt micelijuma dobijen gajenjem u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om je pokazao maksimalnu helirajuću sposobnost pri koncentraciji od 5 mg g⁻¹, 62.57 % nakon čega je usledio značajan pad na 50.52 %. Razlog tome može biti smanjenje rastvorljivosti i agregacija polisaharida prisutnih u ekstraktu što smanjuje broj slobodnih hidroksilnih grupa koje zajedno sa ostalim antioksidativnim komponentama ekstrakta učestvuju u heliranju Fe²⁺ jona (Kozarski, 2012a).

Predpostavlja se da visoka sposobnost heliranja metalnih jona od strane selenom obogaćenih gljiva javlja usled specifičnih Se-metal interakcija. Njihov uticaj zavisi od vrste metala i specifičnih karakteristika bioloških grupa koje sadrže selen (Bhatia et al., 2014). Potrebno je izvršiti dodatnu hemijsku karakterizaciju prisutnih oblika selena u ekstraktima radi donošenja pouzdanih zaključaka u vezi konkretnih interakcija koje utiču na antioksidativnu aktivnost selenom obogaćenih ekstrakata.

Efektivna koncentracija metanolnih ekstrakata micelijuma potrebna za heliranje 50 % Fe²⁺ jona prikazana je u Tabeli 26. Utvrđeno je da su se EC₅₀ vrednosti svih metanolnih ekstrakata statistički značajno razlikovale (p≤0.05). Nije utvrđena statistički značajna korelacija između EC₅₀ vrednosti i sadržaja selena, ukupnih polisaharida i fenolnih jedinjenja u ekstraktima. Na osnovu EC₅₀ vrednosti, efikasnost metanolnih ekstrakata je opadala prema sledećem rasporedu: K sub_{eks} > SP 10 sub_{eks} > SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} > SU 10 sub_{eks}.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*



Grafik 13. Sposobnost heliranja jona gvožđa metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *Coriolus versicolor*.

Tabela 26. Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim selenom pri kojoj je helirano 50 % fero jona.

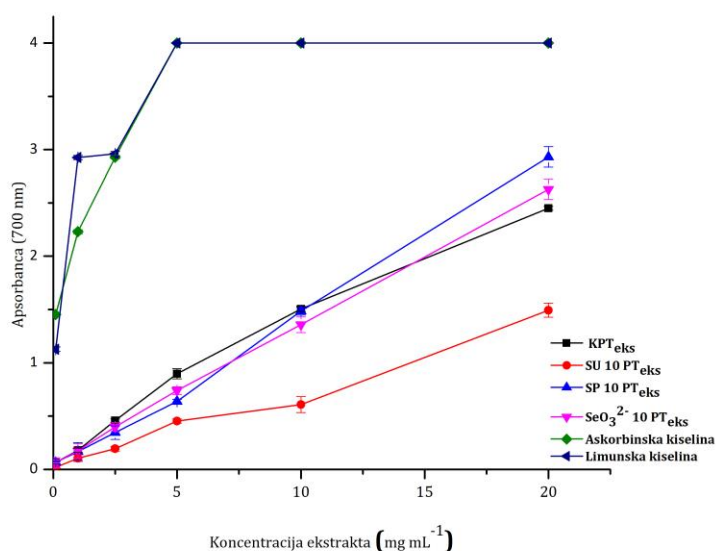
Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
K sub_{eks}**	0.79±0.00 ^{a***}
SU 10 sub_{eks}	2.89±0.00 ^b
SP 10 sub_{eks}	1.81 ±0.00 ^c
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	2.19±0.02 ^d
Limunska kiselina	n.d. ^{***}

*Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je helirano 50 % fero jona. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).**K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). *** Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher's LSD. *** Nije utvrđeno.

5.5.2.2.3 Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Molekuli i jedinjenja koja poseduju izvesni redukcionni potencijal, redukuju prisutne feri jone (Fe³⁺) do fero jona (Fe²⁺), što dovodi do intenziviranja obojenosti reakcione smeše tako da sa porastom izmerene apsorbance, raste i redukciona sposobnost uzorka (Arulpriya et al., 2010).

Redukciona sposobnost metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive prikazana je na Grafiku 14. Ekstrakti gljive rasle na supstratu obogaćenom selenom su pokazali znatan antioksidativni potencijal, osim SU 10 PT_{eks}. Sa porastom koncentracije ekstrakta, redukciona sposobnost je rasla, i dostigla maksimum kod svih testiranih ekstrakata pri maksimalnoj analiziranoj koncentraciji. Kontrolni uzorak je delovao bolje pri nižim koncentracijama, pa je tako dobijena najniža i statistički značajno (p≤0.05) različita EC₅₀ vrednost upravo za KPT_{eks}, u poređenju sa ekstraktima obogaćenim selenom (Tabela 27).



Grafik 14. Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *Coriolus versicolor*.

Niža koncentracija ekstrakta potrebna za dostizanje EC₅₀ ukazuje na potencijalno bolji redukcionu potencijal uzorka. Do sličnih rezultata su došli i Mau i saradnici (2002), koji su utvrdili da je metanolni ekstrakt gljive *C. versicolor* pri koncentraciji od 4 mg mL⁻¹ imao apsorbanca 0.79. Apsorbanca uzorka SP 10 PT_{eks} je izjednačena sa apsorbancom kontrolnog uzorka pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ a pri duplo većoj je ispoljila 16.38 % bolju redukcionu sposobnost. Redukciona sposobnost uzorka SeO₃²⁻ 10 PT je sa porastom koncentracije rasla gotovo linearno (R²=0.99889) i takođe postigla svoj maksimum pri koncentraciji od 20 mg mL⁻¹. Ekstrakt uzorka dobijen gajenjem na supstratu obogaćenom selenoureom (SU 10 PT_{eks}) se pokazao kao najslabiji redukcionu agens, i pri najvišoj testiranoj koncentraciji je imao za 50 % manju redukcionu sposobnost u poređenju sa sa uzorkom SP 10 PT_{eks} koji je pokazao najbolju sposobnost redukcije Fe³⁺ jona.

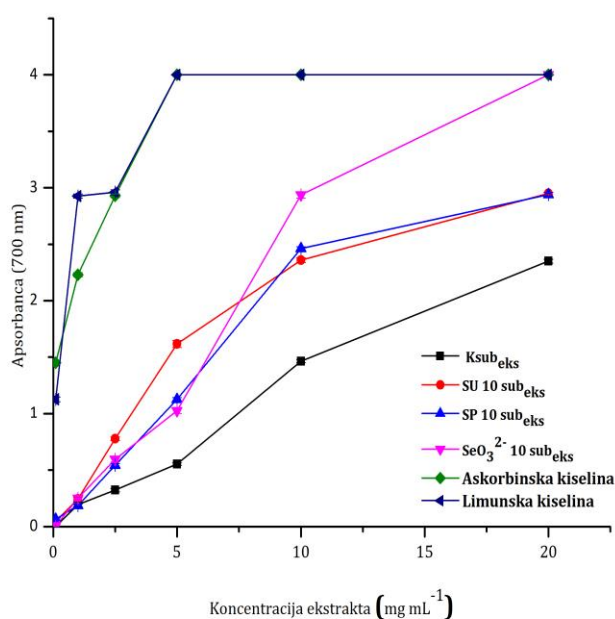
Tabela 27. Efektivna koncentracija metanolnih ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je izmerena apsorbanca 0.5.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
KPT _{eks} **	2.73±0.00 ^{a***}
SU 10 PT _{eks}	5.45±0.00 ^b
SP 10 PT _{eks}	3.83 ±0.00 ^c
SeO ₃ ²⁻ 10 PT _{eks}	3.21±0.02 ^d
Limunska kiselina	<0.1
Askorbinska kiselina	<0.1

*Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je apsorbanca 0.5. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3).**K PT_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom selenoureom (10 mg Se kg⁻¹); SP 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om (10 mg Se kg⁻¹); SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} - metanolni ekstrakt plodonosnih tela raslih na supstratu obogaćenom natrijum selenitom (10 mg Se kg⁻¹).***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

5.5.2.3 Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Analiziranjem metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor*, utvrđeno je da su svi uzorci su pokazali dobru redukcionu sposobnost, koja je rasla sa porastom koncentracije uzorka (Grafik 15).



Grafik 15. Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona metanolnih ekstrakata micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*

Svi uzorci su pokazali znatno bolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa kontrolnim uzorkom Ksub_eks koji je pokazao najslabiju sposobnost redukcije Fe³⁺ jona. Niže koncentracije uzorka SU 10 sub_eks, do 5 mg mL⁻¹ su delovale značajno bolje u poređenju sa ostalim selenom obogaćenim ekstraktima, što potvrđuju i dobijene EC₅₀ vrednosti (Tabela 28). Međutim, pri koncentraciji uzorka 5 od 10 mg mL⁻¹ primećen je značajan skok apsorbanca uzorka SeO₃²⁻ 10 sub_eks. Pri koncentraciji od 10 mg mL⁻¹ SeO₃²⁻ 10 sub_eks je pokazao bolju redukcionu sposobnost za 100.55 % u odnosu na kontrolni uzorak pri istoj koncentraciji. Pri

koncentraciji od 20 mg mL⁻¹ apsorbanca ovog uzorka dostigla maksimum i izjednačila sa apsorbancoma primenjenih standarda. Takođe, razlike u redukcionoj sposobnosti ekstrakata SU 10 sub_{eks} i SP 10 sub_{eks} pri najvišoj testiranoj koncentraciji su gotovo nestale, jer su uzorci dostigli isti maksimum apsorbanca od oko 2.95.

Ovako dobar antioksidativni efekat uzorka je postignut najverovatnije zbog visokog sadržaja elementarnog selena u micelijumu gljive. Naime, indikacija prisustva visoke koncentracije redukovanog (Se⁰) oblika selena je dobijen micelijum jarko crvene boje što je kao rezultat redukcije dodatog jedinjenja selena (videti odeljak 5.2.4).

Tabela 28. Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajene submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je izmerena apsorbanca 0.5.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
K sub _{eks} **	4.58±0.00 ^{a***}
SU 10 sub _{eks}	1.72±0.00 ^b
SP 10 sub _{eks}	2.31 ±0.00 ^c
SeO ₃ ²⁻ 10 sub _{eks}	2.08±0.02 ^d
Limunska kiselina	<0.1
Askorbinska kiselina	<0.1

*Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je apsorbanca 0.5. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). **K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹; SP 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex[®]-om u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹; SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom. ***Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD.

Ranija istraživanja su takođe pokazala visoku redukcionu sposobnost metanolnog ekstrakta selenom obogaćenog micelijuma *L. edodes* gljive. U poređenju

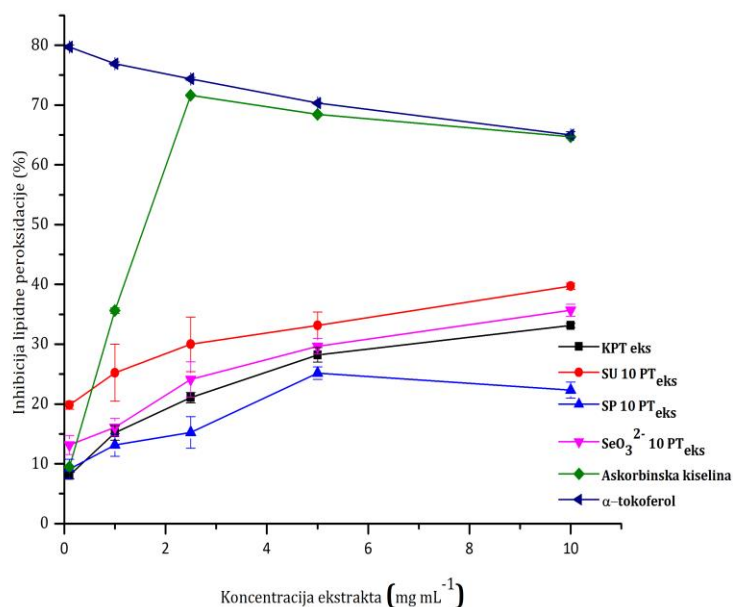
sa kontrolnim ekstraktom, redukujuća sposobnost je bila poboljšana za oko 30 %, a sadržaj ukupnog selena u takvom ekstraktu je bio $478 \mu \text{g}^{-1}$ (Turlo et al., 2010a). Približan sadržaj selena određen je u uzorku SP 10 sub_{eks} ($410.9 \mu \text{g}^{-1}$), a poboljšanje redukcione sposobnosti u odnosu na kontrolni uzorak pri najvišoj koncentraciji bilo je oko 20 %. Razlike u prisutnim oblicima selena u ekstraktima gljive obogaćenim različitim izvorima selena su najverovatnije uzrok razlika u antioksidativnim svojstvima testiranih uzoraka. Viša antioksidativna sposobnost, redukujuća sposobnost i sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala verovatno je posledica viših koncentracija Se^{-2} i Se^{+4} oblika selena u jedinjenjima prisutnim u ekstraktima. Pored toga, visok sadržaj elementarnog selena obezbeđuje visoku antioksidativnu i redukujuću sposobnost gljive (Huang et al., 2003).

5.5.2.4 Određivanje antioksidativne aktivnosti u model sistemu linoleinske kiseline

Lipidna peroksidacija je jedan od glavnih uzroka pogoršanja kvaliteta, odnosno smanjivanja nutritivne vrednosti hrane. Pored toga, pretpostavlja se da oksidativna modifikacija lipoproteina niske gustine ima ključnu ulogu u razvoju arteroskleroze. Gljive se smatraju dobrim fenolnim antioksidansima odnosno inhibitorima lipidne peroksidacije (Puttaraju et al., 2006).

5.5.2.4.1 Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom organskim i neorganskim izvorima selena

Antioksidativna aktivnost uzoraka metanolnih ekstrakata ispitana ovom metodom bila je veoma slaba. Ekstrakti plodonosnih tela gljive nisu pokazali 50 % inhibicije lipidne peroksidacije (Grafik 16). Sa porastom koncentracije ekstrakata, sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije svih uzoraka je rasla. Tako je efikasnost uzoraka opadala sledećim redosledom $\text{SU 10 PT}_{\text{eks}} > \text{SeO}_3^{2-} \text{ 10 PT}_{\text{eks}} > \text{K PT}_{\text{eks}} > \text{SP 10 PT}_{\text{eks}}$.



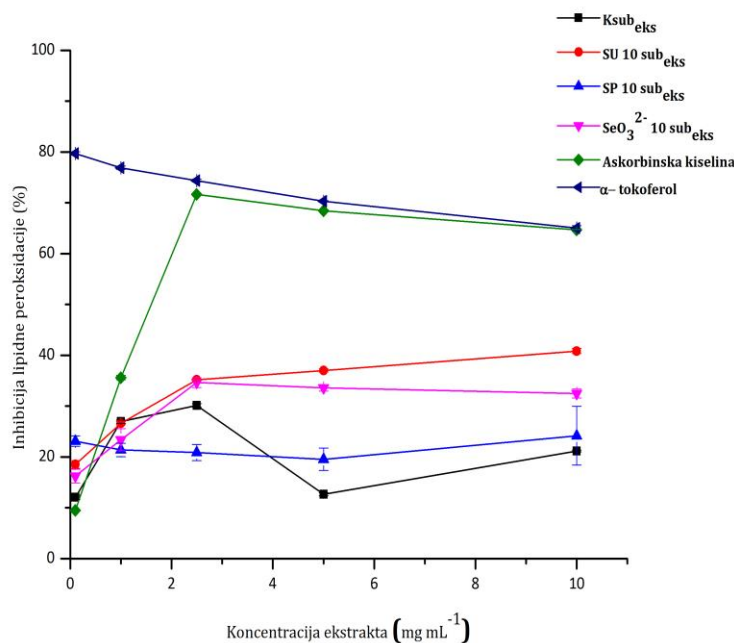
Grafik 16. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata plodonosnih tela gljive *C. versicolor*.

5.5.2.4.2 Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor* rasle u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena

Na Grafiku 17. prikazana je sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata micelijuma gljive *C. versicolor*. Upotrebljeni standardi su pokazali najbolju antioksidativnu sposobnost. EC₅₀ vrednosti za α-tokoferol je ispod 0.1 mg mL⁻¹ a za askorbinsku kiselinu je linearnom regresionom analizom ustanovljena EC₅₀ vrednost od 1.60 mg mL⁻¹ (Tabela 29).

Analizirani uzorci su pokazali slabu antioksidativnu aktivnost merenu ovom metodom. Ni jedan od ekstrakata nije smanjio lipidnu peroksidaciju za 50 % u testiranom opsegu koncentracija. Kontrolni uzorak je pokazao najslabiji efekat, sa procentom inhibicije od 30.15 % pri koncentraciji ekstrakta od 2.5 mg mL⁻¹.

Sposobnost inhibiranja lipidne peroksidacije je uglavnom rasla sa porastom koncentracije ekstrakata. Efikasnost testiranih uzoraka pri 10 mg mL⁻¹ je opadala sledećim redosledom: SU 10 sub_{eks} > SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} > SP 10 sub_{eks} > Ksub_{eks}.



Grafik 17. Sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakata micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor*.

Prema rezultatima koje su dali Mau i saradnici (2002), metanolni ekstrakt plodonosnog tela gljive *C. versicolor* komercijalno dostupne na tržištu Tajvana je pokazao značajno bolja antioksidativna svojstva, budući da je lipidna peroksidacija u prisustvu ekstrakta koncentracije 0.6 mg mL⁻¹ iznosila 58.56 %. Sa druge strane polisaharidni ekstrakt gljive *C. versicolor* je pokazao sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije od samo 31.3 % pri koncentraciji od 20 mg mL⁻¹ (Kozarski, 2012a). Dobijeni rezultati ukazuju na to da na antioksidativna svojstva utiču kako vrsta gljive i način gajenja, tako i vrsta testiranog ekstrakta.

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Tabela 29. Sposobnost lipidne peroksidacije metanolnih ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje u tečnoj podlozi obogaćenoj organskim i neorganskim izvorima selena pri kojoj je lipidna peroksidacija inhibirana 50%.

Uzorak	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹) *
Ksub_{eks}**	n.d.***
SU 10 sub_{eks}	n.d.
SP 10 sub_{eks}	n.d.
SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}	n.d.
Limunska kiselina	<0.1
Askorbinska kiselina	1.60

* Efektivna koncentracija metanolnog ekstrakta pri kojoj je lipidna peroksidacija inhibirana %. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). n.d.**K sub_{eks} - kontrolni uzorak metanolnog ekstrakta; SU 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom (10 mg Se L⁻¹); SP 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om (10 mg Se L⁻¹); SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} - metanolni ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom (10 mg Se L⁻¹). *** Nije utvrđeno.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih u ovoj disertaciji, pregledane literature, prethodno objavljenog rada proizašlog iz ove teze i problematike koja je bila tema ove teze, mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Sposobnost akumulacije selena iz različitih izvora u plodonosna tela gljive *C. versicolor*

Jedan od postavljenih ciljeva ovog rada je bilo utvrđivanje sposobnosti gljive *C. versicolor* da akumulira selen tokom rasta na tečnoj podlozi i čvrstom supstratu, kao i da se ispita uticaj različitih koncentracija i izvora dodatog selena na rast gljive. Upotrebljena su dva neorganska (natrijum selenit i natrijum selenat) i dva organska (selenski kvasac, Sel-Plex® i selenourea) izvora selena u tri koncentracije, i to 10, 25 i 50 mg Se kg⁻¹ za obogaćenje čvrstog supstrata, odnosno 10 i 25 mg Se L⁻¹ za obogaćenje tečne podloge za gajenje.

- Morfološke razlike u izgledu plodonosnih tela dobijenih rastom na supstratu obogaćenom različitim koncentracijama neorganskih soli selena nisu uočene. Pri dodavanju organskih izvora selena u supstrat za gajenje, jedino su pri najvišoj testiranoj koncentraciji selenouree (50 mg Se kg⁻¹) dobijena nerazvijena plodonosna tela, a pri istoj koncentraciji Sel-Plex®-a fruktifikacija je potpuno izostala, što ukazuje na toksičan efekat organskih oblika selena na razvoj plodonosnih tela gljive.
- Primećena je srednja negativna, statistički značajna korelacija ($p \leq 0.05$, $r = -0.54$) između sadržaja selena i prinosa biomase plodonosnih tela pri upotrebi neorganskih izvora selena za obogaćenje čvrstog supstrata za gajenje. Tek je pri koncentraciji od 50 mg Se kg⁻¹ dodatog u supstrat za gajenje uočeno je inhibitorno dejstvo natrijum selenita, dok ovakav uticaj iste koncentracije natrijum selenata na prinos nije utvrđen.
- Primećena je veoma jaka, negativna, statistički značajna ($p \leq 0.05$) korelacija ($r = -0.89$) između sadržaja selena u plodonosnim telima gljive i prinosa biomase plodonosnih tela pri upotrebi izvora selena za obogaćenje čvrstog supstrata za gajenje. Dodatak organskih izvora selena u podlogu za gajenje u

koncentraciji od 25 mg kg⁻¹ doveo je do smanjenja prinosa za oko 60 % (selenourea) do 80 % (Sel-Plex®), ali i do oko 2.5 puta veće akumulacije selena u plodonosna tela gljive. Uočeno je toksično delovanje koncentracije od 50 mg Se kg⁻¹ oba primenjena organska izvora selena na rast gljive.

- Rezultati analize sadržaja selena su pokazali da je gljiva uspešno usvojila dodati selen iz podloge i akumulirala ga u plodonosna tela. Nisu utvrđene razlike u sposobnosti usvajanja selena iz različitih izvora pri upotrebi najniže koncentracije (10 mg Se kg⁻¹). Sa porastom koncentracije selena u supstratu za gajenje, sadržaj selena u gljivi je rastao.
- Bolja sposobnost usvajanja selena je uočena kada su primenjeni organski izvori. Sadržaj selena u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* se kretao između 93.39 i 97.85 µg g⁻¹ (koncentracija selena u podlozi 25 mg kg⁻¹, Sel-Plex® i selenourea respektivno) i 198.4 µg g⁻¹ pri koncentraciji selenouree u čvrstom supstratu od 50 mg Se kg⁻¹.

2. Sposobnost akumulacije selena iz različitih izvora u micelijum submerzno gajene gljive *C. versicolor*

Sposobnost akumulacije selena iz tečne podloge za gajenje ispitana je za ista jedinjenja kao i u slučaju plodonosnih tela, uz primenu koncentracija selena od 10 i 25 mg L⁻¹.

- Konstruisani bioreaktor je uspešno primenjen za dobijanje biomase gljive *C. versicolor*. Proces gajenja u submerznoj kulturi je optimizovan praćenjem potrošnje glukoze i merenjem prinosa biomase tokom vremena. Utvrđeno je optimalno vreme trajanja procesa fermentacije od osam dana uz maksimalni prinos biomase (6.63±0.31 g SM L⁻¹).
- Rezultatima mikroskopskih analiza (primenjene su svetlosna mikroskopija i skenirajuća elektronska mikroskopija) utvrđen je uticaj različitih izvora selena na rast micelijuma gljive. Primećene su razlike u morfologiji rasta gljive pod uticajem različitih izvora selena. Gljiva gajena u odsustvu selena je rasla u obliku paperjastih peleta. Pri primeni selenouree, hife gljive su gusto pakovane i formiraju sferične pelete, a nije primećena statistički značajna razlika (p≤0.05) u veličini dobijenih peleta pri dodatku više koncentracije

seenouree (25 mg Se L⁻¹). Ovakav oblik se smatra najpovoljnijim sa stanovišta efikasne izolacije i separacije dobijene biomase od zaostale tečne podloge. Paperjaste pelete su dobijene kada je natrijum selenat dodat u podlogu kao izvor selena, što ukazuje na slabije pakovane tj. manje kompaktne hife. Primena Sel-Plex®-a uticala je na rast gljive, koja je formirala ugruške dispergovanih filamenata, a raspršeni rast je primećen pri dodatku natrijum selenita, gde je uočena veoma slaba međusobna povezanost hifa. Ovako dobijen rast je veoma negativno uticao na izolaciju biomase.

- Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) je utvrđeno odsustvo egzopolisaharida na površini micelijuma čime je potvrđena dobra separacija micelijuma gljive od prisutnih egzopolisaharida tokom izolacije micelijuma iz tečne podloge i njegovog ispiranja.
- Dodatak natrijum selenita i selenouree u tečnu podlogu doveo je do promene boje micelijuma od bele boje (kontrolni uzorak) do svetlo roze i izrazite cigla crvene boje usled redukcije selenita (SeO₃²⁻) do amorfno, elementarnog selena (S⁰) što miceliji daje crvenu boju. Pomenute promene predstavljaju mehanizam kojim gljiva smanjuje toksičnost selena kada je prisutan u visokim koncentracijama. Redukcijom selenata i selenita do elementarnog selena dolazi do njegove imobilizacije i ujedno se smanjuje toksičnosti ovog elementa po gljivu.
- Gljiva gajena u tečnoj podlozi pokazala je znatno veći kapacitet za usvajanje selena u poređenju sa gljivom raslom na čvrstom supstratu. Natrijum selenit se pokazao kao povoljniji neorganski oblik selena za akumulaciju, u poređenju sa natrijum selenatom. Procenat usvajanja dodatog selena u obliku natrijum selenita je bio između 43.66 i 52.05 %, a visoka koncentracija selena je detektovana u biomasi i to oko 2310.00 i 6707.00 µg g⁻¹ računato na suhu masu gljive (za koncentracije selena u tečnoj podlozi od 10 i 25 mg mL⁻¹). Istovremena visoka akumulacija selena, i viši prinos biomase u poređenju sa uzorcima raslim u tečnoj podlozi kojoj je dodat natrijum selenit, je ostvaren kada je podlozi dodata selenourea. Gljiva rasla u podlozi sa dodatom selenouream je usvojila između 1028.65 i 2084.00 µg g⁻¹ računato na suhu

masu gljive, u zavisnosti od primenjene koncentracije selena. Dodatak selenouree u tečnu podlogu statistički značajno ($p \leq 0.05$) je uticao na prinos biomase poređenju sa kontrolnim uzorkom, ali je primećeno da je rast značajno manje inhibiran u nego kada je podlozi dodat natrijum selenit. Primećeno je da je procenat usvojenog u odnosu na dodati selen opao sa oko 46.08 % na oko 39.10 % pri primeni 2.5 puta veće koncentracije selenouree. Kada je upotrebljen Sel-Plex® kao izvor selena, takođe je uočena dobra akumulacija selena, međutim, prinos biomase gljive je bio značajno niži. Neočekivano, viša koncentracija Sel-Plex®-a (25 mg Se L^{-1}) je znatno manje uticala na prinos biomase. U poređenju sa selenouream, gljiva gajena u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex®-a je apsorbivala oko 50 % manje dodatog selena.

3. Određivanje aminokiselinskog sastava plodonosnih tela gljive *C. versicolor* obogaćene selenom

- Dodatak suplemenata na bazi selena u podlogu za gajenje je statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticao na aminokiselinski profil gljive. Natrijum selenit je statistički značajno ($p \leq 0.05$) smanjio sadržaj svih aminokiselina u poređenju sa kontrolnim uzorkom kome nije dodat selen. Suplementacija selenouream je dovela do smanjenja sadržaja tri od 15 analiziranih aminokiselina u poređenju sa kontrolnim uzorkom ali je sadržaj esencijalnih aminokiselina ostao nepromenjen. Dodatak više koncentracije selenouree nije značajnije uticao na aminokiselinski profil gljive. Utvrđeno je da je dodatak Sel-Plex®-a uticao ($p \leq 0.05$) na povećanje sadržaja četiri aminokiseline, i to L-arginina, L-lizina, L-glutaminske kiseline i L-lizina u poređenju sa kontrolnim uzorkom, a viša koncentracija selena dodatog u obliku Sel-Plex®-a nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticala na sadržaj aminokiselina obogaćenih uzoraka. Ipak, ni kod jednog od testiranih uzoraka nije primećena promena odnosa esencijalnih prema ukupnim aminokiselinama (EAA/TAA (%)) kao ni odnosa esencijalnih i neesencijalnih (EAA/NEAA) aminokiselina u odnosu na kontrolni uzorak. Odnos EAA/NEAA se nalazio u opsegu između 0.60 i 0.69, nije se statistički

značajno ($p \leq 0.05$) razlikovao od uzorka do uzorka i zadovoljavao je FAO/WHO, preporučenu referentnu vrednost.

- Prisustvo L-selenometionina u kontrolnom uzorku plodonosnih telima gljive nije detektovan. Sa porastom koncentracije selena dodate u supstrat za gajenje rastao je i sadržaj L-selenometionina u uzorcima. Uzorci obogaćeni organskim izvorima selena u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ su imali najveći sadržaj L-selenometionina i to $105.27 \pm 8.54 \mu\text{g g}^{-1}$ (SU 25 PT) i ($91.22 \pm 14.76 \mu\text{g g}^{-1}$). Dodatak različitog izvora selena u supstrat za gajenje nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticao na sadržaj L-selenometionina pri upotrebi najniže koncentracije (10 mg Se kg⁻¹). Međutim, kada se rezultati izraze u procentima selena inkorporiranog u selenometionin u odnosu na ukupan sadržaj selena, primećuje se povoljniji uticaj dodavanja nižih koncentracija selena. Tako je uzorak SU 10 PT inkorporirao čak 83.68 % ukupnog selena u selenometionin, a zatim slede SP 10 PT (67.10 %) i SeO₃²⁻ 10 PT (67.98 %). Primećen je negativan uticaj viših koncentracija selena na sintezu seleometionina. Izraženo u procentima u odnosu na ukupan selen, inkorporacija selenometionina je bila niža za oko 40 % kada je supstratu dodato 25 mg Se kg⁻¹ (primena selenouree) odnosno 27 % (primena Sel-Plex®-a) u poređenju sa procentima dobijenih kada je gljiva rasla pri koncentraciji ovih jedinjenja od 10 mg Se kg⁻¹.

4. Određivanje aminokiselinskog sastava micelijuma submerzno gajene gljive *C. versicolor* obogaćene selenom

- Primena selenouree za obogaćenje tečne podloge za gajenje statistički značajno ($p \leq 0.05$) je uticalo na povećanje sadržaja svih aminokiselina osim arginina i tirozina u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Viša koncentracija selenouree (25 mg Se mL⁻¹) je nepovoljno uticala na aminokiselinski sastav gljive. Utvrđeno je da koncentracija jedinjenja ne utiče na odnos EAA/NEAA kao ni na udeo esencijalnih u ukupnim aminokiselinama. Micelijum dobijen gajenjem sa dodatkom Sel-Plex®-a imao je veoma visok sadržaj svih aminokiselina, koji se može pripisati visokom sadržaju azota i aminokiselina poreklom od dodatog selenskog kvasca. Dodatak veće

koncentracije Sel-Plex®-a (25 mg Se mL⁻¹) nije negativno uticao na aminokiselinski sastav gljive. Za uzorak SP 25 sub ostvaren je najbolji statistički značajno različit ($p \leq 0.05$) EAA/NEAA odnos (0.79) u poređenju sa ostalim uzorcima kao i najbolji udeo esencijalnih u ukupnim aminokiselinama (44.16 %).

- Micelijum *C. versicolor* gljive je pokazao različitu sposobnost akumulacije selena u obliku L-selenometionina pri dodatku različitih izvora selena u podlogu. Najviši sadržaj SeMet je detektovan kod uzorka SP 25 sub (oko 1478.30 $\mu\text{g g}^{-1}$). Sa porastom koncentracije Sel-Plex®-a u tečnoj podlozi za gajenje, sadržaj selenometionina u micelijumu gljive je rastao. Međutim kada se rezultati izraze procentualno, SP 10 sub je sadržao čak oko 95 % selena u micelijumu u obliku SeMet. Ovako visok procenat je verovatno posledica visokog sadržaja SeMet u selenskom kvascu koji je najverovatnije direktno urgađen u micelijum gljive. Veoma dobri rezultati su postignuti i kada je u tečnu podlogu dodata selenourea. Tada je sadržaj SeMet u micelijumu gljive iznosio oko 732.86 $\mu\text{g g}^{-1}$, odnosno oko 31.23 % od ukupno usvojenog selena. Najslabiji rezultati su dobijeni za micelijum obogaćen natrijum selenitom. Dobijeni rezultati ukazuju na verovatnu inhibiciju sinteze SeMet pri visokim koncentracijama svih oblika selena u podlozi za gajenje.
 - Sadržaj MeSeCys u uzorcima micelijuma obogaćenim selenom je bio veoma nizak, a u uzorku dobijenom gajenjem u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom nije detektovan. Budući da je akumulacija selena u obliku MeSeCys označena kao mehanizam kojim se gljiva štiti od toksičnih efekata prekomerne ugradnje SeMet i SeCys u proteine, niske vrednosti ukazuju na alternativne mehanizme detoksifikacije, kao što je na primer redukcija do elementarnog selena.
- 5. Hemijska karakterizacija metanolnih ekstrakata**
- Dobijeni FTIR spektri metanolnih ekstrakata plodonosnih tela su imali trake karakterističnih jedinjenja znatno manje izražene u poređenju sa ekstraktima submerzno gajenih uzoraka. Detektovane su hemijske grupe i

veze koje ukazuju na prisustvo jedinjenja glikozidne strukture, proteina i kompleksa proteina sa polisharidima. Nisu primećene značajnije razlike između spektara uzoraka ekstrakata plodonosnih tela gljive dobijenih gajenjem sa dodatkom različitih izvora selena. Veći broj traka koje pripadaju polisaharidnom regionu između 1200 cm^{-1} i 900 cm^{-1} , detektovan je kod ekstrakata plodonosnih tela u poređenju sa ekstraktima micelijuma, što je indikacija prisustva strukturno različitih polisaharida.

- FTIR spektroskopija dobijenih metanolnih ekstrakata micelijuma ukazuje na prisustvo veza karakterističnih za polisaharide, u najvećoj meri β -glukana. U poređenju sa kontrolnim uzorkom, dobijeni su u manjoj ili većoj meri izraženije trake koje ukazuju na prisustvo lipida u uzorku. Pretpostavlja se da je dodatak selena u tečnu podlogu za gajenje uticao na hemijsku strukturu ćelijskog zida gljive. Takođe, uočeno je najverovatnije prisustvo kompleksa proteina sa polisaharidima u uzorcima dobijenim ekstrakcijom micelijuma koji je gajen u podlozi obogaćenoj selenoureom. Uočeno je i prisustvo dodatnih traka u ekstraktima gljive gajene u tečnoj podlozi kojoj je dodat Sel-Plex®. Uočene trake su pripisane proteinima, a dobijeni spektar je u skladu sa rezultatima aminokiselinskog sastava odnosno povećanim sadržajem aminokiselina u ovim uzorcima. Detektovana je široka traka na oko 667 cm^{-1} koja, budući da je vezana za prisustvo Se-O-C simetričnih vibracija istezanja, najverovatnije potvrđuje prisustvo jedinjenja selena u analiziranim metanolnim ekstraktima.

6. Kvantitativna i kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

- Primena različitih jedinjenja za obogaćenje čvrstog supstrata za gajenje nije imao statistički značajan ($p \leq 0.05$) uticaj na prinos ekstrakata.
- Ukupan sadržaj selena u metanolnim ekstraktima zavisio je od primenjenog jedinjenja za obogaćenje podloge za gajenje. Sa porastom sadržaja selena u plodonosnom telu gljive, sadržaj selena u ekstraktu je rastao.
- Dodatak različitih izvora selena u supstrat za gajenje gljive *C. versicolor* uticao je na hemijski sastav dobijenih ekstrakata. Negativan, statistički

značajan ($p \leq 0.05$) uticaj Sel-Plex[®]-a na sadržaj polisaharida primećen je kod ekstrakata SP 10 PT_{eks} i SP 25 PT_{eks}. Uticaj drugih izvora selena na sadržaj ukupnih polisaharida nije primećen. Svi obogaćeni uzorci su imali statistički značajno ($p \leq 0.05$) viši sadržaj β -glukana u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Statistički značajno ($p \leq 0.05$) najveći sadržaj β -glukana utvrđen je kod uzorka SeO₃²⁻ 10 PT_{eks} (oko 20.72 mg g⁻¹). Sadržaj β -glukana kod ostalih selenom obogaćenih metanolnih ekstrakata nalazio u opsegu između 17.67 i 18.75 mg g⁻¹, a dobijene vrednosti se nisu međusobno statistički značajno ($p \leq 0.05$) razlikovale. Analiza monosaharidnog sastava je pokazala značajne ($p \leq 0.05$) razlike u kompoziciji polisaharida ekstrakata obogaćenih organskim izvorima selena. Utvrđeno je da su se dobijeni polisaharidi sastojali uglavnom od D-glukoze (93.09 - 96.14 %), D-glukozamina, D-manoze i u nešto manjoj meri D-galaktoze, a ostali monosaharidi su uglavnom pronađeni u tragovima. Sadržaj glukozamina je bio statistički značajno ($p \leq 0.05$) viši kod ekstrakata obogaćenih selenom, pogotovo kod uzoraka gajenih na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex[®]-om, što najverovatnije ukazuje na razlike u građi ćelijskog zida uzoraka, odnosno povećanog sadržaja hitina. Obogaćenje supstrata za gajenje višim koncentracijama organskih izvora selena je statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticalo na sadržaj proteina u ekstraktu, tako što je sadržaj proteina smanjen. Najverovatnije, je selen prisutan u visokoj koncentraciji u proteinima plodonosnih tela smanjio sposobnost njihove ekstrakcije. Niža koncentracija (10 mg Se kg⁻¹) selenouree i natrijum selenita dodata u supstrat za gajenje nije statistički značajno ($p \leq 0.05$) uticala na smanjenje sadržaja fenolnih komponenti u metanolnim ekstraktima.

- Jedino je prinos metanolnog ekstrakta micelijuma dobijenog gajenjem u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom bio statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži u poređenju sa ekstraktom kontrolnog uzorka.
- Najniži sadržaj selena detektovan je u ekstraktu micelijuma dobijenog rastom u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom. Statistički značajno

($p \leq 0.05$) više koncentracije selena detektovane su u ekstraktima micelijuma gajenog u tečnoj podlozi sa dodatkom Sel-Plex[®]-a u poređenju sa ekstraktima micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureamom.

- Dodatak selena u tečnu podlogu za gajenje je imao veći uticaj na sadržaj polisaharida u ekstraktima. Svi ekstrakti osim SeO_3^{2-} sub_{eks} su imali statistički značajno niži sadržaj polisaharida u poređenju sa kontrolnim ekstraktom, a dodatak više koncentracije selena u podlogu je delovala u tom smislu negativno. Razlog je najverovatnije to što se sa povećanjem sadržaja selena u micelijumu smanjuje rastvorljivost polisaharida što utiče na sposobnost njihove ekstrakcije. Sadržaj ukupnih, α - i β -glukana je takođe bio najviši kod kontrolnog uzorka a najniži kod uzoraka SeO_3^{2-} sub_{eks}, SP 10 sub_{eks} i SP 10 sub_{eks}. Dobijen monosaharidni sastav ekstrahovanih polisaharida ukazao je na značajne razlike u građi ćelijskog zida između uzoraka, odnosno utvrđen je uticaj primenjenog izvora selena na monosaharidni sastav polisaharida poreklom iz micelijuma. Kao i kod plodonosnih tela, i kod micelijuma je utvrđeno je da su se polisaharidi uglavnom sastojali od D-glukoze (96.16 - 81.88 %). Međutim, utvrđen je njihov nešto raznovrsniji sadržaj. Tako su detektovane značajne količine D-manoze i D-glukozamina kao i D-glukuronske kiseline. Sadržaj ovih monosaharida se statistički značajno razlikovao od uzorka do uzorka, a najbogatiji u D-manozi i D-glukuronskoj kiselini je bio uzorak SP 10 sub_{eks}. Najviši sadržaj D-glukozamina je imao kontrolni uzorak. Najviši sadržaj proteina, statistički značajno ($p \leq 0.05$) različit u poređenju sa ostalim uzorcima je detektovan u ekstraktima uzoraka gajenih u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex[®]-om (21.64 - 33.63 mg g⁻¹). Dodatak Sel-Plex[®]-a u tečnu podlogu za gajenje je statistički značajno uticao na porast sadržaja proteina u uzorcima a viša koncentracija je delovala pozitivno. Pretpostavlja se da je dodatak Sel-Plex[®]-a povoljno delovao na sintezu proteina u micelijumu. Uzorci gajeni na podlozi obogaćenoj selenoureamom i natrijum selenitom su imali statistički značajno ($p \leq 0.05$) niži sadržaj proteina u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Sa druge strane, dodatak selenouree nije

smanjio sadržaj fenolnih jedinjenja u uzorku, za razliku od Sel-Plex®-a. Negativan uticaj natrijum selenita na sadržaj fenolnih jedinjenja je takođe utvrđen. Naime, utvrđena je veoma visoka i statistički značajana korelacija ($r=-0.92$, $p\leq 0.05$) između sadržaja fenolnih jedinjenja i ukupnog sadržaja selena u ekstraktima micelijuma.

7. Određivanje antimikrobnog potencijala metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

- Metanolni ekstrakti selenom obogaćene gljive *C. versicolor* su ispoljili antibakterijsko delovanje i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije. Nijedan testirani ekstrakt nije pokazao antifungalno delovanje. Uočene su razlike između antimikrobnog delovanja ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma kao i u okviru ove dve grupe uzoraka pri korišćenju različitih izvora selena za obogaćenje podloge za gajenje. Uzorak SU 10 PT_{eks} je jedini ispoljio mikrobicidni učinak na *E. faecalis* (MBC, 40 mg mL⁻¹) među uzorcima ekstrakata plodonosnih tela, a zajedno sa uzorkom micelijuma SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} (MBC, 10 mg mL⁻¹). Takođe, uzorak SU 25 PT_{eks} ispoljio je generalno slabiji efekat na Gram - pozitivne bakterije u odnosu na kontrolni uzorak i uzorak SU 10 PT_{eks}. Uzorci SU 10 PT_{eks} i SP 25 PT_{eks} su ispoljili letalni efekat na veći broj testiranih Gram-negativnih bakterija, i kao takvi su se izdvojili među ekstraktima plodonosnih tela. Pokazalo se da su od svih testiranih uzoraka, jedino SU 10 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} delovali mikrobicidno na bakteriju *E. coli* H7 : O157 sa MBC vrednostima od 20 mg mL⁻¹, 40 mg mL⁻¹ i 20 mg mL⁻¹ redom. Ni jedan od selenom obogaćenih ekstrakata plodonosnih tela nije delovao mikrobicidno na *S. aureus*. Sa druge strane utvrđeno je letalno dejstvo tri ekstrakta micelijuma na *S. aureus* i to SP 25 sub_{eks}, SU 25 sub_{eks} i SeO₃²⁻ 10 sub_{eks}. u koncentracijama između 5 mg mL⁻¹ i 40 mg mL⁻¹. Poređenjem uzoraka gajenih u podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om generalno je uočeno da je niža koncentracija ostvarila bolji mikrobicidni učinak na Gram-pozitivne bakterije, a viša na Gram-negativne bakterije. Uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je delovao letalno na sve testirane bakterije uključujući i *Listeria* sojeve u

koncentracijama od 5 do 40 mg mL⁻¹. Jedino je ovaj uzorak delovao letalno na bakteriju *L. monocytogenes* (MBC=40 mg mL⁻¹) a mikrobistatični uticaj je primećen pri veoma niskoj koncentraciji ekstrakta (<0.3125 mg mL⁻¹). Takođe, ovaj uzorak je jedini delovao letalno na bakterije *S. Typhimurium* i *P. mirabilis*. Generalno, bolja inhibitorna aktivnost metanolnog ekstrakta micelijuma u poređenju sa plodonosnim telom uprkos višem sadržaju polisaharida i β -glukana u ekstraktima plodonosnih tela gljive koji se smatraju najznačajnijim antimikrobnim komponentama. Do različitog antimikrobnog delovanja ekstrakata je najverovatnije došlo usled razlika u sastavu i strukturi polisaharida ekstrahovanih iz ćelijskog zida gljive, na šta ukazuju i rezultati monosaharidnog sastava. Antimikrobno delovanje zavisi ne samo od sadržaja β -glukana već i od molekulske mase, hemijskog sastava, broja bočnih lanaca i prostorne konfiguracije. Takođe, utvrđeno je da se merenjem optičke gustine sa velikom preciznošću može odrediti minimalna inhibitorna koncentracija nekog uzorka, a da je za utvrđivanje letalnog dejstva nekog uzorka potrebno uzvršiti proveru naknadnim zasejavanjem uzoraka na čvrstoj podlozi.

8. Određivanje antioksidativnog delovanja metanolnih ekstrakata gljive *C. versicolor*

- Najbolju antioksidativnu aktivnost među ekstraktima plodonosnih tela ispoljio je uzorak SU 10 PT_{eks} koji je vezao čak 99.42 % DPPH slobodnih radikala pri koncentraciji ekstrakta od 10 mg mL⁻¹. Utvrđeno je da je ekstrakt delovao bolje ne samo u poređenju sa ostalim ekstraktima nego i u odnosu na obe testirane pozitivne kontrole. Takođe, za isti uzorak je utvrđena i najniža EC₅₀ vrednost (0.59 ± 0.04 mg mL⁻¹). Sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala je bila najizraženija takođe kod najviše testirane koncentracije ekstrakta i nalazila se u opsegu između 86.47% do 88.1 %. Najniža EC₅₀ vrednost je utvrđena za uzorak, SU 10 PT_{eks} (0.59 ± 0.04 mg mL⁻¹). Uzorci dobijeni ekstrakcijom micelijuma su pokazali sličnu sposobnost vezivanja DPPH slobodnih radikala. Kao najefikasniji su se pokazali uzorci SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} zatim slede SU 10 sub_{eks} sa procentom

vezanih slobodnih DPPH radikala od $96.00 \pm 0.37\%$ i $95.3 \pm 0.22\%$ i boljom antioksidativnom sposobnošću u poređenju sa pozitivnom kontrolom pri maksimalnoj koncentraciji. Najniže EC_{50} vrednosti ekstrakata su uočene kod uzoraka K sub_{eks}, SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} i SU 10 sub_{eks} (0.52 , 0.52 i 0.55 mg mL⁻¹, respektivno) i nisu se statistički značajno razlikovale. Utvrđena je veoma visoka, statistički značajna korelacija ($r = -0.98$, $p \leq 0.05$) između ukupnog sadržaja polisaharida u ekstraktima micelijuma i EC_{50} . kao i veoma visoka negativna korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima micelijuma ($r = -0.97$, $p \leq 0.05$) i EC_{50} vrednosti.

- Svi testirani uzorci metanolnih ekstrakata plodonosnih tela pokazali su značajnu sposobnost heliranja Fe²⁺ jona, i to mnogo bolju u poređenju sa pozitivnom kontrolom (limunska kiselina). Od svih uzoraka najbolje se pokazao SP 10 PT_{eks} ($EC_{50} = 1.16 \pm 0.00$) koji je u najvišem procentu helirao jone gvožđa pri svim koncentracijama u poređenju sa ostalim testiranim selenom obogaćenim uzorcima. Maksimalna helirajuća sposobnost pri najvišoj koncentraciji uzorka SP 10 PT_{eks} je bila oko 89.19 %. Jedino je uzorak KP_T_{eks} imao viši procenat heliranih jona pri testiranoj koncentraciji od 5 mg mL⁻¹. Suprotno, ekstrakt micelijuma gajenog u tečnoj podlozi obogaćenom Sel-Plex®-om se pokazao kao najlošiji pri najvišoj testiranoj koncentraciji ekstrakta od 10 mg mL⁻¹. Na osnovu EC_{50} vrednosti, efikasnost metanolnih ekstrakata je opadala prema sledećem rasporedu: K sub_{eks} > SP 10 sub_{eks} > SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} > SU 10 sub_{eks}. Uzorak SeO₃²⁻ 10 sub_{eks} je helirao oko 88.98 % jona, a ova vrednost se nije razlikovala od vrednosti dobijene za kontrolni uzorak. Generalno, utvrđena je razlika između uzoraka gajenih na različite načine i ustanovljen uticaj dodatog jedinjenja selena na antioksidativna svojstva dobijenih ekstrakata.
- Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona od strane metanolnih ekstrakata plodonosnih tela je bila značajno niža u poređenju sa pozitivnim kontrolama. Najnižu EC_{50} vrednost imao je kontrolni uzorak (2.73 mg mL⁻¹), međutim analizom efekta ekstrakta pri koncentraciji od 20 mg mL⁻¹ najbolju redukcionu sposobnost su ispoljili uzorci SP 10 PT_{eks}. i SeO₃²⁻ 10 PT_{eks}.

Ekstrakt gljive rasle na supstratu obogaćenom selenoureom je ispoljio najslabiju aktivnost, u poređenju sa pozitivnim kontrolama, kontrolnim ekstraktom gljive i ostalim ekstraktima selenom obogaćene gljive. Nasuprot tome, svi ekstrakti micelijuma raslog u tečnoj podlozi sa dodatkom različitih izvora selena su pokazali znatno bolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa kontrolnim uzorkom $K_{sub_{eks}}$. Najniža EC_{50} vrednost je određena za $SU_{10_{sub_{eks}}}$ i to 1.72 mg mL^{-1} . Zapažen je antioksidativni efekat ekstrakta SeO_3^{2-} $10_{sub_{eks}}$ čija se sposobnost redukcije izjednačila sa pozitivnim kontrolama pri najvišoj testiranoj koncentraciji.

- Svi testirani uzorci su pokazali veoma nisku sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Ni jedan ekstrakt nije doveo do smanjenja lipidne peroksidacije za 50 % u testiranom opsegu koncentracija ($0.1-10 \text{ mg mL}^{-1}$). Najslabiju inhibiciju lipidne peroksidacije ispoljili su kontrolni uzorci ekstrakata i ekstrakti dobijeni gajenjem gljive na čvrstom supstratu i u tečnoj podlozi koje su obogaćene Sel-Plex®-om. Utvrđena je značajna sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije pozitivnih kontrola.

Dobijeni rezultati takođe ukazuju na uticaj načina gajenja i primenjenih jedinjenja selena za obogaćenje supstrata na antioksidativna svojstva ekstrakata. Različit antioksidativni efekat uzoraka je posledica različitog hemijskog sastava odnosno razlika u sadržaju jedinjenja u kojima se selen nalazi u Se^{-2} i Se^{+4} obliku kao i koncentracije elementarnog selena.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj disertaciji može se zaključiti da submerzni postupak gajenja gljive *C. versicolor* ima niz prednosti u odnosu na gajenje gljive na čvrstom supstratu. Naime, primenom submerznog postupka skraćeno je vreme gajenja, parametri procesa su kontrolisani a mogućnost kontaminacije mikroorganizmima iz vazduha je svedena na minimum. Sve to, zajedno sa upotrebom podloge za gajenje tačno definisanog sastava otvara put ka standardizaciji celokupnog procesa gajenja gljive u cilju proizvodnje dijetetskih suplemenata na bazi selena. Takođe, treba pomenuti se submerznim gajenjem gljiva mogu dobiti i egzopolisaharidi, za koje se u literaturi navodi da poseduju

biološka svojstva, a koji su obzirom na temu ove teze bili tretirani kao nusproizvodi. Visoka sposobnost biotransformacije usvojenog selena u obliku L-selenometionina od strane submerzno gajene gljive kao i prikazani rezultati biološke aktivnosti metanolnih ekstrakata odgajene gljive osnov za dalji razvoj submerznih procesa gajenja različitih gljiva u cilju dobijanja proizvoda sa medicinskim i nutritivnim svojstvima.

7. LITERATURA

- Adriano, D. C. (1986): Trace elements in the terrestrial environment Springer-Verlag. *New York*, 219-262.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza, I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., Iqbal, Z. (2014): Role of selenium in male reproduction—A review. *Animal reproduction science* 146: 55-62.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., Pintado, M. (2012): A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Medica* 78: 1707–1718.
- Amoako, P. O., Uden, P. C., Tyson, J. F. (2009): Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno) cysteine and other selenium compounds. *Analytica chimica acta* 652: 315-323.
- Andrews, E. D., Hartley, W. J., Grant, A. B. (1968): Selenium-responsive diseases of animals in New Zealand. *New Zealand veterinary journal* 16: 3-17.
- Altundag, H., Tuzen, M. (2011): Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2800-2807.
- Alzorqi, I., Sudheer, S., Lu, T. J., Manickam, S. (2017): Ultrasonically extracted b-D-glucan from artificially cultivated mushroom, characteristic properties and antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry* 35: 531-540.
- Arnaudguilhem, C., Bierla, K., Ouerdane, L., Preud'homme, H., Yiannikouris, A., Lobinski, R. (2012): Selenium metabolomics in yeast using complementary reversed-phase/hydrophilic ion interaction (HILIC) liquid chromatography–electrospray hybrid quadrupole trap/Orbitrap mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 757: 26-38.
- Arulpriya, P., Lalitha, P., Hemalatha, S. (2010): Invitro antioxidant testing of the extracts of *Samanea saman* (Jacq.) Merr. *Der Chemica Sinica*, 1: 73-79.
- Azevedo, M. F., Barra, G. B., Naves, L. A., Ribeiro Velasco, L. F., Godoy Garcia Castro, P., De Castro, L. C. G., et al. (2010): Selenoprotein-related disease in a young

- girl caused by nonsense mutations in the SBP2 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology i Metabolism* 95: 4066-4071.
- Backović, D., Marinković, J., Jorga, J., Pavlica, M., Maksimović, Z., Nikolić, M. (1999): Environmental factors, health-related habits, and serum selenium levels in cancer patients and healthy controls. *Biological trace element research* 67: 55-62.
- Bakirdere, S., Volkan, M., Ataman, O. Y. (2015): Speciation of selenium in supplements by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Letters* 48: 1511-1523.
- Bala, N., Aitken, E. A., Cusack, A., Steadman, K. J. (2012): Antimicrobial potential of Australian macrofungi extracts against foodborne and other pathogens. *Phytotherapy Research* 26: 465-469.
- Barceloux D. G. (1999): Selenium. *Clinical Toxicology* 37: 145-172.
- Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M, Ferreira, I. C. F. R. (2007): Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius sp.* mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 8766-8771.
- Baum, M. K., Shor-Posner, G., Lai, S., Zhang, G., Lai, H., Fletcher, M. A., et al. (1997): High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 15: 370-374.
- Beers, M. H., Berkow, R. (1999): *The Merck manual of diagnosis and therapy* (No. Ed. 17). Merck and Co. Inc..
- Beck, M. A., Levander, O. A., Handy, J. (2003): Selenium deficiency and viral infection. *The Journal of nutrition* 133: 1463S-1467S.
- Behne, D., Hofer, T., von Berswordt-Wallrabe, R., Elger, W. (1982): Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *The Journal of nutrition* 112: 1682-1687.
- Behne, D., Duk, M., Elger, W. (1986): Selenium content and glutathione peroxidase activity in the testis of the maturing rat. *The Journal of nutrition* 116: 1442-1447.

- Bell, J. G., Cowey, C. B. (1989): Digestibility and bioavailability of dietary selenium from fishmeal, selenite, selenomethionine and selenocystine in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 81: 61-68.
- Belmar-Beiny, M. T., Thomas, C. R. (1991): Morphology and clavulinic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 456-62.
- Beluhan, S., Ranogajec, A. (2011): Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry* 124: 1076-1082.
- Bermek, H., Gülseren, İ., Li, K., Jung, H., Tamerler, C. (2004): The effect of fungal morphology on ligninolytic enzyme production by a recently isolated wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LSK-27. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 345-349.
- Bhatia, P., Aureli, F., D'Amato, M., Prakash, R., Cameotra, S. S., Nagaraja, T. P., Cubadda, F. (2013): Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food chemistry* 140: 225-230.
- Bhatia, P., Bansal, C., Prakash, R., Nagaraja, T. P. (2014): Selenium uptake and associated anti-oxidant properties in *Pleurotus fossulatus* cultivated on wheat straw from seleniferous fields. *Acta Alimentaria* 43: 280-287.
- Bierla, K., Szpunar, J., Yiannikouris, A., Lobinski, R. (2012): Comprehensive speciation of selenium in selenium-rich yeast. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 41: 122-132.
- Birringer, M., Pilawa, S., Flohé, L. (2002): Trends in selenium biochemistry. *Natural product reports* 19: 693-718.
- Bleys, J., Navas-Acien, A., Guallar, E. (2007): Serum selenium and diabetes in US adults. *Diabetes care* 30: 829-834.
- Borràs, E., Blánquez, P., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T. (2008): *Trametes versicolor* pellets production: Low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* 42: 61-66.

- Bolla, K., Gopinath, B. V., Shaheen, S. Z., Charya, M. S. (2010): Optimization of carbon and nitrogen sources of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Trametes versicolor*. International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research 1:15-21.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72: 248-254.
- Braun, S., Vecht-Lifshitz, S. E. (1991): Mycelial morphology and metabolite production. Trends in Biotechnology 9: 63-68.
- Brown, K. M., Arthur, J. R. (2001): Selenium, selenoproteins and human health: a review. Public health nutrition 4: 593-599.
- Brown, G. D., Gordon, S. (2005): Immune recognition of fungal β -glucans. Cellular microbiology 7: 471-479.
- B'Hymer, C., Caruso, J. A. (2006): Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1114: 1-20.
- Burk, R. F., Hill, K. E. (2009): Selenoprotein P—expression, functions, and roles in mammals. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1790: 1441-1447.
- Campos, J. A., Tejera, N. A., Sánchez, C. J. (2009): Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. Biometals 22: 835-841.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., Gooday, G. W. (2001): The fungi. Gulf Professional Publishing.
- Carević, M., Veličković, D., Stojanović, M., Milosavić, N., Rogniaux, H., Ropartz, D., Bezbradica, D. (2015): Insight in the regioselective enzymatic transgalactosylation of salicin catalyzed by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. Process Biochemistry 50: 782-788.
- Chan, G. C. F., Chan, W. K., Sze, D. M. Y. (2009): The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. Journal of hematology & Oncology 2: 1-11.

- Chasteen, T. G., Bentley, R. (2003): Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical reviews* 103: 1-26.
- Cheung, L. M., Cheung, P.C.K., Ooi, V. E. C. (2003): Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81: 249-255.
- Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., Fukuoka, F. (1969): Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. *Nature* 222: 687-688.
- Chow, L. W., Lo, C. S., Loo, W. T., Hu, X. C., Sham, J. S. (2003): Polysaccharide peptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulating cyclin D 1 gene. *The American journal of Chinese medicine* 31: 1-9.
- Chu, K. K. W., Ho, S. S. S., Chow H. A. L. (2002): *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *The Journal of clinical pharmacology* 42: 976-984.
- Clark, L. C., Combs, G. F., Turnbull, B. W., Slate, E. H., Chalker, D. K., Chow, J., et al. (1996): Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial. *Jama* 276: 1957-1963.
- Clinton Jr, M. (1947): Selenium fume exposure. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology* 29: 225-6.
- Combs Jr, G. F., Combs, S. B. (1986): *The role of selenium in nutrition*. Academic Press, Inc., Orlando, Fl.
- Couto, S. R., Toca-Herrera, J. L. (2007): Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances* 25: 558-569.
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M., Luyben, K. C. A. M. (1997): Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 55: 715-26.
- Cui J., Chisti Y., (2003): Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances* 21:109-122.
- Çoban, E. P., Isman, B., Biyik, H. H. (2008): Effects of protein bound polysaccharide against some microorganisms. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 38: 150-155.

- Čuvarđić, M. (2000): Selen u zemljištima Vojvodine i njegova pristupačnost. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija.
- Čuvarđić, M. S. (2003): Selenium in soil. Zbornik matice srpske za prirodne nauke 104: 23-37.
- Danscher, G., Stoltenberg, M. (2006): Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. Progress in histochemistry and cytochemistry 41: 57-139.
- Daniel, O., Schonholzer, F., Zeyer, J. (1995): Quantification of fungal hyphae in leaves of deciduous trees by automated image analysis. Applied and Environmental Microbiology 61: 3910-3918.
- Davidson, P. M., Parish, M. E. (1989): Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food technology (USA).
- da Silva, M. C., Naozuka, J., Oliveira, P. V., Vanetti, M. C., Bazzolli, D. M., Costa, N. M., Kasuya, M. C. (2010): In vivo bioavailability of selenium in enriched *Pleurotus ostreatus* mushrooms. Metallomics 2: 162-166.
- Danscher, G., Stoltenberg, M. (2006): Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans,(2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals,(3) metal ions liberated from metal implants and particles. Progress in histochemistry and cytochemistry 41: 57-139.
- Depciuch, J., Sowa-Kućma, M., Nowak, G., Dudek, D., Siwek, M., Styczeń, K., Parlińska-Wojtan, M. (2016): Phospholipid-protein balance in affective disorders: Analysis of human blood serum using Raman and FTIR spectroscopy. A pilot study. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 131: 287-296.
- Derumeaux, H., Valeix, P., Castetbon, K., Bensimon, M., Boutron-Ruault, M. C., Arnaud, J., Hercberg, S. (2003): Association of selenium with thyroid volume

- and echostructure in 35-to 60-year-old French adults. *European Journal of Endocrinology* 148: 309-315.
- Dernovics, M., Stefánka, Z., Fodor, P. (2002): Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Analytical and bioanalytical chemistry* 372: 473-480.
- Dix, N. J., Webster, J. (1995): *Fungal ecology* Chapman and Hall London.
- Díaz-Alarcón, J. P., Navarro-Alarcón, M., López-García de la Serrana, H., López-Martínez, M. C. (1996): Determination of selenium in meat products by hydride generation atomic absorption spectrometry selenium levels in meat, organ meats, and sausages in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1494-1497.
- DRI (2000): Selenium. In *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids*. Washington, DC: Institute of Medicine.
- Du, M., Zhao, L., Li, C., Zhao, G., Hu, X. (2007): Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. *European Food Research and Technology* 224: 659-665.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamitton, J. K., Reders, P. A., i Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Duvnjak, D., Pantić, M., Pavlović, V., Nedović, V., Lević, S., Matijašević, D. et al. (2016): Advances in batch culture fermented *Coriolus versicolor* medicinal mushroom for the production of antibacterial compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 34: 1-8.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2006): Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry* 385: 1304-1323.
- Đurovka, M., Mišković, A., Cvetić, Z. (2001): Uticaj različitih supstrata na brzinu rasta i prinos gljive bukovače. *Letopis naučnih radova Poljoprivrednog fakulteta* 25: 25-31.

- Ebert, R., i Jakob, F. (2007): Selenium deficiency as a putative risk factor for osteoporosis. In: International Congress Series (Vol. 1297, pp. 158-164). Elsevier.
- (EC) L330/11, Commission regulation (EC) No 1750/2006 of 27 November 2006. O J of the EU.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2014): Scientific Opinion on Safety and efficacy of Sel-Plex® (organic form of selenium produced by *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060) for all species. The EFSA Journal 2011; 9(4):2110.
- Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I., Temur, N. (2007): Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis 20: 337-345.
- El-Ramady, H., Abdalla, N., Alshaal, T., Domokos-Szabolcsy, E., Elhawat, N., Prokisch, J., et al. (2015): Selenium in soils under climate change, implication for human health. Environmental chemistry letters 13: 1-19.
- Ermakov, V., Jovanović, L. (2010): Selenium deficiency as a consequence of human activity and its correction. Journal of Geochemical Exploration 107: 193-199.
- Estrada, A. E. R., Lee, H. J., Beelman, R. B., del Mar Jimenez-Gasco, M., Royse, D. J. (2009): Enhancement of the antioxidants ergothioneine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* basidiomata through cultural practices. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 1597-1607.
- European Commission, 1998. COUNCIL DIRECTIVE 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. In: 330 L (Ed.), Official Journal of the European Communities, pp. 32-54
- Falandysz, J. (2008): Selenium in edible mushrooms. Journal of Environmental Science and Health Part C 26: 256-299.
- Falandysz, J. (2013): Review: On published data and methods for selenium in mushrooms. Food chemistry 138: 242-250.
- Fan, A. M., Kizer, K. W. (1990): Selenium. Nutritional, toxicologic, and clinical aspects. Western Journal of Medicine 153: 160.

- Fernandes, A. P., Gandin, V. (2015): Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1850: 1642-1660.
- Fernández-Martínez, A., Charlet, L. (2009): Selenium environmental cycling and bioavailability: a structural chemist point of view. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 8: 81-110.
- Free, S. J. (2013): In: Friedmann T., Dunlap, T. J., Goodwin, S. F., (Eds.), *Advances in Genetics*, Vol. 81: Fungal cell wall organization and biosynthesis. Academic Press, Burlington, pp. 33-82.
- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W. (2006): FTIR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 64: 63-77.
- Gadd, G. M. (2004): Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18: 60-70.
- García, M. S. (2013): Emerging role of natural antioxidants in chronic disease prevention with an emphasis on vitamin E and selenium. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants*, 419.
- Gergely, V., Kubachka, K. M., Mounicou, S., Fodor, P., Caruso, J. A. (2006): Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1101: 94-102.
- Gladyshev, V. N., Hatfield, D. L. (1999): Selenocysteine-containing proteins in mammals. *Journal of biomedical science* 6: 151-160.
- Glattre, E., Thomassen, Y., THORESEN, S. Ø., Haldorsen, T., Lund-Larsen, P. G., Theodorsen, L., Aaseth, J. (1989): Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. *International journal of epidemiology* 18: 45-49.
- Goldhaber, S. B. (2003): Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38: 232-242.
- Gonzaga, M. L. C., Menezes, T. M. F., de Souza, J. R. R., Ricardo, N. M. P. S., Soares, S. D. A. (2013): Structural characterization of β glucans isolated from *Agaricus*

- blazei* Murill using NMR and FTIR spectroscopy. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(2),152-156.
- Gromadzińska, J., Reszka, E., Bruzelius, K., Wąsowicz, W., Åkesson, B. (2008): Selenium and cancer: biomarkers of selenium status and molecular action of selenium supplements. *European journal of nutrition* 47: 29-50.
- YouGuo, C., Zongji, S., XiaoPing, C. (2009): Modulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats. *Carbohydrate Polymers* 78: 258-262.
- Hartikainen, H. (2005): Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 309-318.
- Hawkes, W. C., Turek, P. J. (2001): Effects of dietary selenium on sperm motility in healthy men. *Journal of andrology* 22: 764-772.
- He, F., Yang, Y., Yang, G., Yu, L. (2010): Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control* 21: 1257–1262.
- Hill, K. E., Burk, R. F. (1997): Selenoprotein P: recent studies in rats and in humans. *Biomedical and environmental sciences: BES* 10: 198-208.
- Huang, S. J., Tsai, S. Y., Mau, J. L. (2006): Antioxidant properties of methanolic extracts from *Agrocybe cylindracea*. *LWT-Food Science and Technology* 39: 379-387.
- Huang, B., Zhang, J., Hou, J., Chen, C. (2003): Free radical scavenging efficiency of Nano-Se in vitro. *Free Radical Biology and Medicine* 35: 805-813.
- Hurst, R., Siyame, E. W., Young, S. D., Chilimba, A. D., Joy, E. J., Black, C. R., et al. (2013): Soil-type influences human selenium status and underlies widespread selenium deficiency risks in Malawi. *Scientific reports* 3: 1425.
- Ina, K., Kataoka, T., Ando, T. (2013): The use of lentinan for treating gastric cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 13: 681-688.

- Ip, C., Ganther, H. E. (1994): Pears. In: Burk, R. F. (Eds.), Selenium in biology and human health, Novel strategies in selenium cancer chemoprevention research. Springer, New York, pp. 169-180.
- Ip, C., Thompson, H. J., Zhu, Z., Ganther, H. E. (2000): In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer research* 60: 2882-2886.
- Ivarsson, M., Holmström, S. (2012): In V. Kazmiruk (Eds.), The Use of ESEM in Geobiology, The Scanning Electron Microscope. InTech, Open Access Publisher, pp. 799-818.
- Jiang, P., Yuan, L., Cai, D., Jiao, L., Zhang, L. (2015): Characterization and antioxidant activities of the polysaccharides from mycelium of *Phellinus pini* and culture medium. *Carbohydrate polymers* 117: 600-604.
- Johnson, C. C., Ge, X., Green, K. A., Liu, X. (2000): Selenium distribution in the local environment of selected villages of the Keshan Disease belt, Zhangjiakou District, Hebei Province, People's Republic of China. *Applied Geochemistry* 15: 385-401.
- Jovic, V., Milic, S., Popadic, D. (1995): Selenium in some metamorphic rocks in Serbia. In: Maksimovic Z., Petrovic V., Spuzic I., Gasic M. (Eds.), Proceedings of the Conference on Selenium, Serbian Academy Sci. Arts, Vol. 78, pp. 21-27.
- Justo, A., Hibbett, D. S. (2011): Phylogenetic classification of *Trametes* (Basidiomycota, Polyporales) based on a five-marker dataset. *Taxon* 60: 1567-1583.
- Kadhim, H., Graham, C., Barratt, P., Evans, C. S., Rastall, R. A. (1999): Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 303-307.
- Kalač, P. (2010): Trace element contents in European species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000–2009. *Food Chemistry* 122: 2-15.
- Kápolna, E., Fodor, P. (2007): Bioavailability of selenium from selenium-enriched green onions (*Allium fistulosum*) and chives (*Allium schoenoprasum*) after

- 'in vitro'gastrointestinal digestion. International Journal of Food Sciences and Nutrition 58: 282-296.).
- 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.
- Kaviyarasan, V., Shenbagaraman, R., Singh, M. (2014): Antiproliferative activity of bioactive compounds from mushrooms of Indian isolates. In: Singh, M. (Ed.), Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), Volume I and II New Delhi, India, pp. 385-393.
- Kayode, R. M. O., Olakulehin, T. F., Adedeji, B. S., Ahmed, O., Aliyu, T. H., Badmos, A. H. A. (2015): Evaluation of amino acid and fatty acid profiles of commercially cultivated oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*) grown on gmelina wood waste. Nigerian Food Journal 33: 18-21.
- Kieliszek, M., Błażej, S., Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A. (2015): Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. Applied microbiology and biotechnology 99: 5373-5382.
- Kieliszek, M., Błażej, S. (2013): Selenium: significance, and outlook for supplementation. Nutrition, 29: 713-718.
- Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., Yun, J. W. (2005): Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. Bioresource Technology 96: 1175-1182.
- Kipp, A. P., Strohm, D., Brigelius-Flohé, R., Schomburg, L., Bechthold, A., Leschik-Bonnet, E., et al. (2015): Revised reference values for selenium intake. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 32: 195-199.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., i Možina, S. S. (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. Journal of microbiological methods 81: 121-126.
- Klaus A., Savić M., Grubišić M., Nikšić M., (2009): The growth of mushroom *Trametes versicolor* under the influence of some mineral rows, Abstracts of

- the 5th International Medicinal Mushroom Conference, 5th-8th September., Nantong, China, pp. 154-155.
- Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Zizak, Z., et al. (2015): Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. *Food Research International* 67: 272-283.
- Klimaszewska, M., Górska, S., Dawidowski, M., Podsadni, P., Turło, J. (2016): Biosynthesis of Se-methyl-seleno-l-cysteine in Basidiomycetes fungus *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. *SpringerPlus* 5: 733.
- Kosanić, M., Ranković, B., Rančić, A., Stanojković, T. (2016): Evaluation of metal concentration and antioxidant, antimicrobial, and anticancer potentials of two edible mushrooms *Lactarius deliciosus* and *Macrolepiota procera*. *Journal of food and drug analysis* 24: 477-484.
- Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, G. F. P. J., Van Griensven, D. L. J. L. (2011): Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry* 129: 1667-1675.
- Kozarski, M. S. (2012a): Hemijska karakterizacija, antioksidativna i antimikrobna svojstva polisaharidnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva. Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvić, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D., et al. (2012b): Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of food composition and analysis* 26: 144-153.
- Krinsky, N. I. (1989): Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine* 7: 617-635.
- Kronrad, L., Hladik, V. (1972): A method for preparation of selenourea-75Se. *The International journal of applied radiation and isotopes* 23: 237.

- Kryukov, G. V., Castellano, S., Novoselov, S. V., Lobanov, A. V., Zehtab, O., Guigó, R., Gladyshev, V. N. (2003): Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443.
- Kubachka, K. M., Hanley, T., Mantha, M., Wilson, R. A., Falconer, T. M., Kassa, Z., et al. (2017): Evaluation of selenium in dietary supplements using elemental speciation. *Food Chemistry* 218: 313-320.
- Kula, I., Solak, M. H., Uğurlu, M., Işıloğlu, M., Arslan, Y. (2011): Determination of mercury, cadmium, lead, zinc, selenium and iron by ICP-OES in mushroom samples from around thermal power plant in Muğla, Turkey. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 87: 276-281.
- Lavu, R. V. S., Van De Wiele, T., Pratti, V. L., Tack, F., Du Laing, G. (2016): Selenium bioaccessibility in stomach, small intestine and colon: Comparison between pure Se compounds, Se-enriched food crops and food supplements. *Food chemistry* 197: 382-387.
- Le Tham, X., Matsushashi, S., Kume, T. (1999): Growth and fruitbody formation of *Ganoderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. *Mycoscience* 40: 87-92.
- Lee, K. M., Lee, S. Y., Lee, H. Y. (1999): Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an Air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88: 646-650.
- Lee, B. C., Bae, J. T., Pyo, H. B., Choe, T. B., Kim, S. W., Hwang, H. J., Yun, J. W. (2004): Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 369-376.
- Li, W. R., Xie, X. B., Shi, Q. S., Zeng, H. Y., You-Sheng, O. Y., Chen, Y. B. (2010): Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 85: 1115-1122.
- Li, Q., Wang, W., Zhu, Y., Chen, Y., Zhang, W., Yu, P., et al. (2017): Structural elucidation and antioxidant activity of a novel Se-polysaccharide from Se-enriched *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Polymers* 161: 42-52.

- Lima, A. T., Santos, M. N., de Souza, L. A., Pinheiro, T. S., Paiva, A. A., Dore, C. M., et al. (2016): Chemical characteristics of a heteropolysaccharide from *Tylopilus ballouii* mushroom and its antioxidant and anti-inflammatory activities. *Carbohydrate polymers* 144: 400-409.
- Lin, F.Y., Lai, Y. K., Yu H. C., Chen, N. Y., Chang, C. Y., Lo, H. C., et al. (2008): Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. *Food Chemistry* 110: 446–453.
- Liu, J.X., Zhou, J.Y., Liu, T.F., (1999): In: Yang, Q.Y. (Ed.), *Advanced Research in PSP 1999*. Phase III clinical trial for the Yun Zhi polysacchride (PSP) capsules. The Hong Kong Association for Health Care Limited, Hong Kong, pp. 295–303.
- Liu, K., Chen, F., Zhao, Y., Gu, Z., i Yang, H. (2011): Selenium accumulation in protein fractions during germination of Se-enriched brown rice and molecular weights distribution of Se-containing proteins. *Food Chemistry* 127: 1526-1531.
- Liu, Y., Sun, J., Rao, S., Su, Y., Yang, Y. (2013): Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and chemical toxicology* 57: 39-45.
- Loflin, J., Lopez, N., Whanger, P. D., Kioussi, C. (2006): Selenoprotein W during development and oxidative stress. *Journal of inorganic biochemistry* 100: 1679-1684.
- Loo, B. H., Lee, Y. G., Yazid, Z. (1985): Molecular interaction and orientation of selenourea on copper and silver electrode surfaces: A surface-enhanced Raman spectroscopic study. *Chemical physics letters* 115: 134-138.
- Lü, J., i Jiang, C. (2005): Selenium and cancer chemoprevention: hypotheses integrating the actions of selenoproteins and selenium metabolites in epithelial and non-epithelial target cells. *Antioxidants & redox signaling* 7: 1715-1727.

- Lübbert, A. (2003): Optimization of Bioprocesses. In: Berovič, M., Kieran P. (Eds.), Bioprocess engineering. Faculty of Chemistry and Chemical Technology, University of Ljubljana, Slovenia, pp. 365-381.
- Ma, Y., Mao, D., Geng, L., Wang, Z., Xu, C. (2013): Production, fractionation, characterization of extracellular polysaccharide from a newly isolated *Trametes gibbosa* and its hypoglycemic activity. *Carbohydrate Polymers* 96: 460– 465.
- Maksimović, Z. J., Djujić, I., Jović, V., Ršumović, M. (1992): Selenium deficiency in Yugoslavia. *Biological trace element research* 33: 87-196.
- Manjunathan, J., Kaviyarasan, V. (2010): Solvent based effectiveness of antibacterial activity of edible mushroom *Lentinus tuberregium* (Fr.). *International journal of PharmTech research* 2: 1910-1912.
- Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Łapienis, G., Ślusarczyk, J., Suchocki, P., et al. (2009): Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. *Enzyme and Microbial Technology* 44: 334-343.
- Manzi, P., Pizzoferrato L. (2000): Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68: 315-318.
- Mao, X. B., Zhong, J. J. (2004): Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors. *Biotechnology Progress*,20: 1408-1413.
- Marcocci, C., Kahaly, G. J., Krassas, G. E., Bartalena, L., Prummel, M., Stahl, M., et al. (2011): Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *New England Journal of Medicine* 364: 1920-1931.
- Maseko, T., Callahan, D. L., Dunshea, F. R., Doronila, A., Kolev, S. D., Ng, K. (2013): Chemical characterisation and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus*. *Food chemistry* 141: 3681-3687.
- Matijašević, D., Pantić, M., Rašković, B., Pavlović, V., Duvnjak, D., Sknepnek, A., Nikšić, M. (2016). The antibacterial activity of *Coriolus versicolor* methanol extract and its effect on ultrastructural changes of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*. *Frontiers in Microbiology* 7.

- Mau, J. L., Lin, H. C., Chen, C. C. (2002): Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry* 50: 6072-6077.
- Mayland, H. F., James, L. F., Panter, K. E., Sonderegger, J. L. (1989): Selenium in seleniferous environments. *Selenium in Agriculture and the Environment, (seleniuminagric)* 15-50.
- Mehta, S., Jandaik, S. (2012): In vitro Comparative Evaluation of Antibacterial Activity of Fruiting Body and Mycelial Extracts of *Ganoderma lucidum* against Pathogenic Bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 6: 1997-2001.
- Metanis, N., Hilvert, D. (2014): Natural and synthetic selenoproteins. *Current opinion in chemical biology* 22: 27-34.
- Meng, F. Y., Liu, X. N., Jia, L., Song, Z., Deng, P., Fan, K. M. (2010): Culture optimization and amino acid composition of Cr-enriched mycelia of *Pleurotus cornucopiae* SD-01. *Food Technology and Biotechnology* 48: 107-113.
- Milojković, J. V. (2015): Biosorpcija odabranih teških metala kompostom *Myriophyllum spicatum*. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Milovanović, I., Brčeski, I., Stajić, M., Korać, A., Vukojević, J., Knežević, A. (2014): Potential of *Pleurotus ostreatus* mycelium for selenium absorption. *The Scientific World Journal* 2014: 1-8.
- Mitchell, D., Berovič, M. (2003): Solid state fermentations. In: Berovič, M., Kieran P. (Eds.), *Bioprocess engineering, Faculty of Chemistry and Chemical Technology, Univesity of Ljubljana, Slovenia*, pp. 202-230.
- Mitchell, K., Mason, P. R., Van Cappellen, P., Johnson, T. M., Gill, B. C., Owens, J. D., et al. (2012): Selenium as paleo-oceanographic proxy: A first assessment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 89: 302-317.
- Mohaček-Grošev, V., Božac, R., Puppels, G. J. (2001): Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 57: 2815-2829.

- Moharram, H. A., Salama, M. F., Hussien, A. A. (2008): Characterization of oyster mushroom mycelia as a food supplement. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2: 632-642.
- Moir, D. C., Masters, H. G. (1970): Selenium deficiency and hepatitis dietica in pigs. *Aust Veterinary journal* 55: 360-366.
- Montes-Bayón, M., Molet, M. J. D., González, E. B., Sanz-Medel, A. (2006): Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68: 1287-1293.
- Moore, D. (2005): Principles of Mushroom Developmental Biology. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 7: 79-101.
- Motsenbocker, M. A., Tappel, A. L. (1982): A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 719: 147-153.
- Nacamulli, D., Mian, C., Petricca, D., Lazzarotto, F., Barollo, S., Pozza, D., et al. (2010): Influence of physiological dietary selenium supplementation on the natural course of autoimmune thyroiditis. *Clinical endocrinology* 73: 535-539.
- Nagy, G., Benko, I., Kiraly, G., Voros, O., Tanczos, B., Sztrik, A., et al. (2015): Cellular and nephrotoxicity of selenium species. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30: 160-170.
- Navarro-Alarcon, M., Cabrera-Vique, C. (2008): Selenium in food and the human body: a review. *Science of the total environment* 400: 115-141.
- Negro, R., Greco, G., Mangieri, T., Pezzarossa, A., Dazzi, D., Hassan, H. (2007): The influence of selenium supplementation on postpartum thyroid status in pregnant women with thyroid peroxidase autoantibodies. *The Journal of Clinical Endocrinology i Metabolism* 92: 1263-1268.
- Neve, J. (1999): Combined selenium and iodine deficiency in Kashin-Beck osteoarthropathy. *Selenium-Tellurium Development Association. Bulletin*, (mars).

- Niedzielski, P., Rudnicka, M., Wachelka, M., Kozak, L., Rzany, M., Wozniak, M., Kaskow, Z. (2016): Selenium species in selenium fortified dietary supplements. *Food chemistry* 190: 454-459.
- Nigam, P., Armour, G., Banat, I. M., Singh, D., Marchant, R. (2000): Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresource technology* 72: 219-226.
- Niki, E. (2010): Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and Medicine* 49: 503-515.
- Ninomiya, M., Garud, D. R., Koketsu, M. (2010): Selenium-containing heterocycles using selenoamides, selenoureas, selenazadienes, and isoselenocyanates. *Heterocycles* 81: 2027-2055.
- Nowacka, N., Nowak, R., Drozd, M., Olech, M., Los, R., Malm, A. (2014). Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland. *LWT - Food Science and Technology* 59: 689-694.
- Ogra, Y., Ishiwata, K., Encinar, J. R., Łobiński, R., Suzuki, K. T. (2004): Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(5-6), 861-866.
- Oldfield, J. E., Muth, O. H., Schubert, J. R. (1960): Selenium and vit. E as related to growth and white muscle disease in lambs. *Experimental Biology and Medicine* 103: 799-800.
- Ohtsuka, S., Ueno, S., Yoshikumi, C., Hirose, F., Ohmura, Y., Wada, T., et al. (1973): Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of Basidiomycetes. UK Patent, 1331513(26), 02.
- Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., Özler, M. A. (2011): In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1353-1360.

- Packer, H. L., Thomas, C. R. (2009): Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 870-881.
- Pan, D., Wang, Q., Jiang, S., Ji, X., An, L. (2007): Low-temperature synthesis of oil-soluble CdSe, CdS, and CdSe/CdS core-shell nanocrystals by using various water-soluble anion precursors. *The Journal of Physical Chemistry C* 111: 5661-5666.
- Panda, T., Rameshaiah, G. N. (2009): Application of actinobacterial and fungal morphology on the design of operating strategies in bioprocess development. *The Open Biotechnology Journal* 3: 31-39.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C. R., Nigam, P. (1999): Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science* 77: 149-162.
- Pakdaman, A. (1998): Symptomatic treatment of brain tumor patients with sodium selenite, oxygen, and other supportive measures. *Biological trace element research* 62: 1-6.
- Pappa, E. C., Pappas, A. C., Surai, P. F. (2006): Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. *Science of the Total Environment* 372: 100-108.
- Pappas, A. C., Zoidis, E., Surai, P. F., Zervas, G. (2008): Selenoproteins and maternal nutrition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 151: 361-372.
- Park, J. H., Kim, Y. S., Lee, H. L., Shim, J. Y., Lee, K. S., Oh, Y. J., et al. (2006): Expression of peroxiredoxin and thioredoxin in human lung cancer and paired normal lung. *Respirology* 11: 269-275.
- Papagianni, M. (2004): Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances* 22: 189-259.
- Pedrero, Z., Madrid, Y. (2009): Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. *Analytica chimica acta* 634: 135-152.
- Pešić, M., Radojković, D. (2015): Selenium substitution: Effect on thyroid function. *Acta medica Medianae* 54: 56-59.

- 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: 191-200.
- Piepponen, S., Liukkonen-Lilja, H., Kuusi, T. (1983): The selenium content of edible mushrooms in Finland. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 177: 257-260.
- Połatajko, A., Śliwka-Kaszyńska, M., Dernovics, M., Ruzik, R., Encinar, J. R., Szpunar, J. (2004): A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 19: 114-120.
- Poluboyarinov, P. A., Vikhreva, V. A., Leshchenko, P. P., Aripovskii, A. V., Likhachev, A. N. (2009): Elemental selenium formation upon destruction of the organoselenium compound DAFS-25 molecule by growing fungal mycelium. Moscow University biological sciences bulletin 64: 164-168.
- Ponce de León, C. A., Bayón, M. M., Paquin, C., Caruso, J. A. (2002): Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. Journal of applied microbiology 92: 602-610.
- Puttaraju, N. G., Venkateshaiah, S. U., Dharmesh, S. M., Urs, S. M. N., Somasundaram, R. (2006): Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. Journal of agricultural and food chemistry 54: 9764-9772.
- Que, Y., Sun, S., Xu, L., Zhang, Y., Zhu, H., (2014): High-level coproduction, purification and characterisation of laccase and exopolysaccharides by *Coriolus versicolor*. Food Chemistry 159: 208–213.
- Quereshi, S., Pandey, A. K., Sandhu, S. S. (2010): Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. People's Journal of Scientific Research 3: 9-14.
- Ramaekers, V. T., Calomme, M., Berghe, D. V., Makropoulos, W. (1994): Selenium deficiency triggering intractable seizures. Neuropediatrics 25: 217-223.
- Ramesh, C. H., Pattar, M. G. (2010): Antimicrobial properties, antioxidant activity and bioactive compounds from six wild edible mushrooms of western ghats of Karnataka, India. Pharmacognosy research 2: 107.

- Rau, U., Kuenz, A., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J., Cicek, H. (2009): Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. *Applied microbiology and biotechnology* 81: 827-837.
- Rayman, M. P. (2000): The importance of selenium to human health. *The lancet* 356: 233-241.
- Rayman, M. P. (2004): The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up?. *British Journal of Nutrition* 92: 557-573.
- Rayman, M. P. (2005): Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society* 64: 527-542.
- Rayman, M., Angus, F., Goenaga-Infante, H. (2007): Bioavailability and speciation of selenium from selenium-enriched mushrooms. In: Drew J. E. (Ed.), *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, England, Vol. 66, pp. 55A.
- Rayman, M. P., Infante, H. G., Sargent, M. (2008): Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British Journal of Nutrition* 100: 238-253.
- Rayman, M. P. (2011): Selenium and adverse health conditions of human pregnancy. In: Hatfield, D.L., Berry M.J., Gladyshev, V.N. (Eds.), *Selenium*. Springer, New York. pp. 531-544.
- Rayman, M. P. (2012a): Selenium and cancer prevention. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 10 (Suppl. 4), A1.
- Rayman, M. P. (2012b): Selenium and human health. *The Lancet* 379: 1256-1268.
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C. O., Lewis, G., Krissansen, G. W., Buchanan, P. K. (2014): Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 3: 41-51.
- Reyes, L. H., Encinar, J. R., Marchante-Gayón, J. M., Alonso, J. I. G., Sanz-Medel, A. (2006): Selenium bioaccessibility assessment in selenized yeast after "in vitro" gastrointestinal digestion using two-dimensional chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1110: 108-116.

- Reeves, M. A., Hoffmann, P. R. (2009): The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cellular and molecular life sciences* 66: 2457-2478.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigam, P. (2001): Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology* 77: 247-255.
- Robinson, T., Nigam, P. (2003): Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 197-203.
- Rodrigues, D., Freitas, A. C., Sousa, S., Amorim, M., Vasconcelos, M. W., da Costa, J. P., et al. (2017): Chemical and structural characterization of *Pholiota nameko* extracts with biological properties. *Food Chemistry* 216: 176-185.
- Rosales, E., Gundi, M., Sanromán, M. (2004): Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. *Journal of Food Engineering* 64: 423-428.
- Roszak, D. B., Colwell, R. R. (1987): Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews* 51: 365.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., Hoekstra, W. (1973): Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Ruthes, A. C., Smiderle, F. R., Iacomini, M. (2015): D-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate polymers* 117: 753-761.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321-324.
- Sappey, C., Legrand-Poels, S., Best-Belpomme, M., Favier, A., Rentier, B., Piette, J. (1994): Stimulation of glutathione peroxidase activity decreases HIV type 1 activation after oxidative stress. *AIDS research and human retroviruses* 10: 451-461.

- Savić, M., Klimaszewska, M., Bamburowicz-Klimkowska, M., Suchocki, P., Niksić, M., Szutowski, M., et al., (2016): A Search for the Optimum Selenium Source to Obtain Mushroom-Derived Chemopreventive Preparations. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 18: 279-289.
- Savić, M., Anđelković, I., Duvnjak, D., Matijašević, D., Avramović, A., Nikšić, M. (2012): The fungistatic activity of organic selenium and its application to production of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus spp.* *Archive of Biological Science* 64: 1455-1463.
- Santos, S., Ungureanu, G., Boaventura, R., Botelho, C. (2015): Selenium contaminated waters: an overview of analytical methods, treatment options and recent advances in sorption methods. *Science of The Total Environment* 521: 246-260.
- Sánchez, Ó. J., Montoya, S., Vargas, L. M. (2015): Polysaccharide Production by Submerged Fermentation. *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* 14: 451-473.
- SCF, Scientific Committee on Food. (2000): Opinion of the scientific committee of food of the tolerable upper intake level of selenium. SCF/CS/NUT/UPPLEV/25 Final, Brussel, Belgium, 18 pp.
- Schwarz, K., Foltz, C. M. (1957): Selenium as an integral part of factor-3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society* 79: 3292-3293.
- Schweizer, U., Bräuer, A. U., Köhrle, J., Nitsch, R., Savaskan, N. E. (2004): Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research Reviews* 45: 164-178.
- Selenium (2015): 21 CFR 573.
- Shakeri, A., Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Rassam, G., Asili, J. (2014): Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *Kopetdaghensis*. *Industrial Crops and Products* 58: 315-321.
- Shang, D. J., Wang, G. L. (1999): Comparison of selenium accumulation ability in the mycelia of four edible fungi. *Acta Edulis Fungi* 6:17-20.

- Shih, I. L., Tsai, K. L., Hsieh, C. (2007): Effects of culture conditions on the mycelial growth and bioactive metabolite production in submerged culture of *Cordyceps militaris*. *Biochemical Engineering Journal* 33: 193-201.
- Sirichakwal, P. P., Puwastien, P., Polngam, J., Kongkachuichai, R. (2005): Selenium content of Thai foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 47-59.
- Smolskaitė, L., Venskutonis, P. R., Talou, T. (2015): Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species. *LWT-Food Science and Technology* 60: 462-471.
- Soares, A. A., de Souza, C. G. M., Daniel, F. M., Ferrari, G. P., da Costa, S. M. G., Peralta, R. M. (2009): Antioxidant activity and total phenolic content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in two stages of maturity. *Food Chemistry* 112: 775-781.
- Soerensen, J., Jakupoglu, C., Beck, H., Förster, H., Schmidt, J., Schmahl, W., et al., (2008): The role of thioredoxin reductases in brain development. *PLoS One* 3: e1813.
- Soothill, E., i Fairhurst, A. (1978): *The new field guide to fungi*. Michael Joseph Ltd., London.
- Spadoni, M., Voltaggio, M., Carcea, M., Coni, E., Raggi, A., Cubadda, F. (2007): Bioaccessible selenium in Italian agricultural soils: Comparison of the biogeochemical approach with a regression model based on geochemical and pedoclimatic variables. *Science of the total environment* 376: 160-177.
- Spolar, M. R., Schaffer, E. M., Beelman, R. B., Milner, J. A. (1999): Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushrooms suppress 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer letters* 138: 145-150.
- Statwick, J., Sher, A. A. (2017): Selenium in soils of western Colorado. *Journal of Arid Environments* 137: 1-6.
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Klotz, L. O. (2016): Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. *Archives of biochemistry and biophysics* 595: 113-119.

- Stewart, M. S., Davis, R. L., Walsh, L. P., Pence, B. C. (1997): Induction of differentiation and apoptosis by sodium selenite in human colonic carcinoma cells (HT29). *Cancer letters* 117: 35-40.
- Stijve, T., Besson, R. (1976): Mercury, cadmium, lead and selenium content of mushroom species belonging to the genus *Agaricus*. *Chemosphere* 5: 151-158.
- Stojanović, M., Nikšić, M. (2003): Laboratorijska uputstva za vežbe it tehnološke mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 41-44.
- Stranges, S., Sieri, S., Vinceti, M., Grioni, S., Guallar, E., Laclaustra, M., et al., (2010): prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. *BMC Public Health* 10: 1.
- Su, M. S., Shyu, Y. T., Chien, P. J. (2008): Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry* 111: 892-896.
- Surai, P. F. (2006): Selenium in nutrition and health. Nottingham University Press, Nottingham.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., et al. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate polymers* 76: 548-556.
- Synytsya, A., Novák, M. (2013): Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydrate polymers* 92: 792-809.
- Szwengiel, A., i Stachowiak, B. (2016): Deproteinization of water-soluble β -glucan during acid extraction from fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Carbohydrate polymers* 146: 310-319.
- Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M., Machová, E. (1999): Microbial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate polymers* 38: 247-253.
- Takahashi, H., Nishina, A., Fukumoto, R. H., Kimura, H., Koketsu, M., Ishihara, H. (2005): Selenoureas and thioureas are effective superoxide radical scavengers in vitro. *Life sciences* 76: 2185-2192.

- Tamura, T., Stadtman, T. C. (1996): A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 1006-1011.
- Tang, Y. J., Zhu, L. W., Li, H. M., Li, D.S. (2007): Submerged culture of mushrooms in bioreactors – challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology i Biotechnology* 45: 221–229.
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., Tarun, A. S. (2000): Selenium in higher plants. *Annual review of plant biology* 51: 401-432.
- Thavarajah, P., Combs Jr, G. F. (2013): In: Preedy, V.R., et al. (Eds.), *Handbook of Food Fortification and Health: From Concepts to Public Health Application, Volume 1: Lentils (*Lens culinaris* L.) as a source of dietary selenium*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 255-264.
- Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y. J., Pussemier, L. (2012): Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry* 130: 767-784.
- Thomson, C. D. (2011): Chapter 29, Brazil Nuts (*Bertholletia excelsa*): Improved Selenium Status and Other Health Benefits. In: Preedy, V. R., Watson, R. R., Patel, V. B., (Eds.), *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, Academic Press, pp. 245-252.
- Tinggi, U. (2008): Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental health and preventive medicine* 13: 102-108.
- Tsai, S. Y., Huang, S. J., Mau, J. L. (2006): Antioxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea*. *Food chemistry* 98: 670-677.
- Tsang, K. W., Lam, C. L., Yan, C., Mak J. C., Ooi, G. C., Ho, J. C., et al., (2003): *Coriolus versicolor* polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. *Respiratory Medicine* 97: 618–624.
- Tsivileva, O. M., Loshchinina, E. A., Pankratov, A. N., Burashnikova, M. M., Yurasov, N. A., Bylinkina, et al., (2012): Biodegradation of an organoselenium compound to elemental selenium by *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushroom. *Biological trace element research* 149: 97-101.

- Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., Gezer, K. (2007): Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry 101: 267–273.
- Turło, J. (2014): The biotechnology of higher fungi - current state and perspectives. Folia Biologica et Oecologica 10: 49-65.
- Turło, J., Gutkowska, B., Malinowska, E. (2007). Relationship between the selenium, selenomethionine, and selenocysteine content of submerged cultivated mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.). Acta Chromatographica 18: 36-48.
- Turło, J., Gutkowska, B., Herold, F. (2010a). Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food and Chemical Toxicology 48:1085–1091.
- Turło, J., Gutkowska, B., Herold, F., Klimaszewska, M., i Suchocki, P. (2010b). Optimization of selenium-enriched mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.) pegler as a food supplement. Food Biotechnology 24: 180-196.
- Ullah, M. A., Kadhim, H., Rastall, R. A., Evans, C. S. (2000): Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. Applied microbiology and biotechnology 54: 832-837.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohé, L. (1999): Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science 285: 1393-1396.
- USEPA, (2009): National Primary Drinking Water Regulations, List of Contaminants and their (MCLs). EPA 816-F-09-0004. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Vaishnav, R. A., Getchell, M. L., Huang, L., Hersh, M. A., Stromberg, A. J., Getchell, T. V. (2008): Cellular and molecular characterization of oxidative stress in olfactory epithelium of Harlequin mutant mouse. Journal of neuroscience research 86: 165-182.
- Van Der Torre, H. W., Van Dokkum, W., Schaafsma, G., Wedel, M., Ockhuizen, T. (1991): Effect of various levels of selenium in wheat and meat on blood Se

- status indices and on Se balance in Dutch men. *British Journal of Nutrition* 65: 69-80.
- van Elteren, J. T., Woroniecka, U. D., Kroon, K. J. (1998): Accumulation and distribution of selenium and cesium in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*—A radiotracer-aided study. *Chemosphere* 36: 1787-1798.
- Veličković, Z. S. (2013): Modifikacija i primena višeslojnih ugljeničnih nanocevi za izdvajanje arsena iz vode. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija.
- Vesentini, D., Dickinson, D. J., Murphy, R. J. (2005): The production of extracellular mucilaginous material (ECMM) in two wood-rotting basidiomycetes is affected by growth conditions. *Mycologia* 97: 1163-1170.
- Vrvić, M., Vučetić, J., Matić, V., Veljković, V. i Lazić, M. (1988): Biotehnološki postupak za dobijanje stabilnog prehrambenog proizvoda na bazi modifikovanog selenskog kvasca. PP 1930/88 od 17.10.1988, Savezni zavod za patente, Beograd.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Higton, G. (2001): *Industrial microbiology: an introduction*. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M. (2001): Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* 78: 293-300.
- Wang, L., Wang, G., Zhang, J., Zhang, G., Jia, L., Liu, X., et al. (2011a): Extraction optimization and antioxidant activity of intracellular selenium polysaccharide by *Cordyceps sinensis* SU-02. *Carbohydrate Polymers* 86: 1745-1750.
- Wang, L. C., Zhang, K., Di, L. Q., Liu, R., Wu, H. (2011b): Isolation and structural elucidation of novel homogenous polysaccharide from *Mastra veneriformis*. *Carbohydrate polymers* 86: 982-987.
- Wani, B. A., Bodha, R. H., Wani, A. H. (2010): Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research* 4: 2598-2604.

- Wasser, S. P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology* 60: 258-274.
- Webster, J., i Weber, R. (2007): *Introduction to fungi*. Cambridge University Press, New York.
- Whanger, P. D. (2004): Selenium and its relationship to cancer: an update. *British journal of nutrition* 91: 11-28.
- White, P. C. (1984). Recent developments in detection techniques for high-performance liquid chromatography. Part I. Spectroscopic and electrochemical detectors. A review. *Analyst* 109: 677-697.
- White, C., Wilkinson, S. C., i Gadd, G. M. (1995). The role of microorganisms in biosorption of toxic metals and radionuclides. *International Biodeterioration i Biodegradation* 35: 17-40.
- WHO (2011): *Guidelines for Drinking-water Quality*. 4th ed. (Geneva).
- Wu, M., Porres, J. M., Cheng, W. H. (2013): In: Watson, R. R., Preedy, V. R. (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for the Aging Population: Selenium, Selenoproteins, and Age-Related Disorders*. Elsevier Inc., pp. 227.
- Wu, Z., Yang, Z., Gan, D., Fan, J., Dai, Z., Wang, X., et al. (2014): Influences of carbon sources on the biomass, production and compositions of exopolysaccharides from *Paecilomyces hepiali* HN1. *Biomass and Bioenergy* 67: 260-269.
- 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: 402-407.
- Xiao, J., Sun, J., Yao, L., Zhao, Q., Wang, L., Wang, X., et al. (2012): Physicochemical characteristics of ultrasonic extracted polysaccharides from *Cordyceps cephalosporium* mycelia. *International Journal of Biological Macromolecules* 51: 64-69.

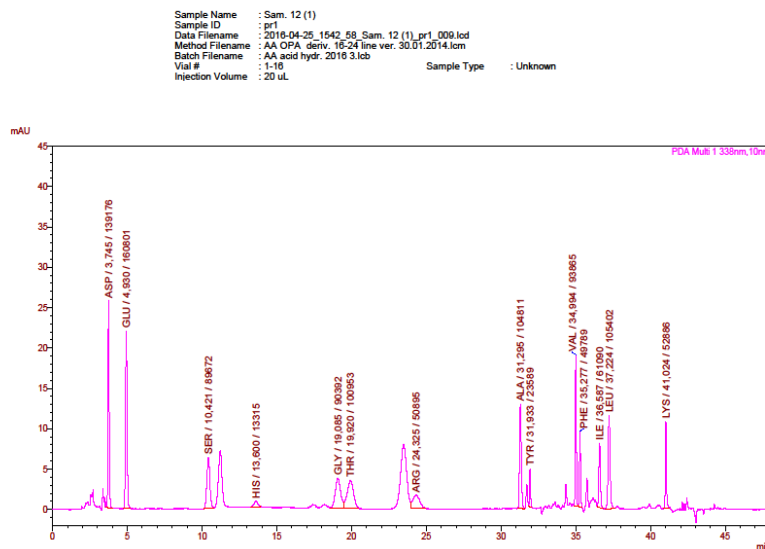
- Xingbin, Y., Yan, Z., Qingwei, W., Haifang, W. A. N. G., Qibing, M. E. I. (2005): Analysis of the monosaccharide components in *Angelica* polysaccharides by high performance liquid chromatography. *Analytical Sciences* 21: 1177-1180.
- Xu, C. P., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., Yun, J. W. (2003): Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochemistry* 38: 1025-1030.
- Yamashita, I., Iwahori, K., Kumagai, S. (2010): Ferritin in the field of nanodevices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1800: 846-857.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., Terao, J. (1998): HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 62: 1201-1204.
- Yan, J. K., Wang, W. Q., Li, L., Wu, J. Y. (2011): Physicochemical properties and antitumor activities of two α -glucans isolated from hot water and alkaline extracts of *Cordyceps* (Cs-HK1) fungal mycelia. *Carbohydrate Polymers* 85: 753-758.
- Yang, J.P., Hsu, T., Lin, F., Hsu, W., Chen, Y. (2012): Potential antidiabetic activity of extracellular polysaccharides in submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor* LH1. *Carbohydrate Polymers* 90: 174-180.
- Yeung, J. H., Or, P. M. (2007): Effects of polysaccharide peptides from COV-1 strain of *Coriolus versicolor* on glutathione and glutathione-related enzymes in the mouse. *Food and chemical toxicology* 45: 953-961.
- Yu, M. W., Horng, S., Hsu, K. H., Chiang, Y. C., Liaw, Y. F., Chen, C. J. (1999): Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection. *American journal of epidemiology*, 150: 367-374.
- Yu, T., Yang, Z., Lv, Y., Hou, Q., Xia, X., Feng, H., et al (2014): The origin and geochemical cycle of soil selenium in a Se-rich area of China. *Journal of Geochemical Exploration* 139: 97-108.

- Zaidi, K.U., Jain, R., Quereshi, S. (2013): On the novel inhibitory action of mushroom extract of *Coriolus versicolor* and its bioactivity against drug resistant bacteria *Salmonella Typhimurium* (MTCC 3241). *International journal of applied biology and pharmaceutical technology* 4: 4-11.
- Zaidman, B. Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S. P. (2005): Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 453-468.
- Zachara, B. A., Pawluk, H., Bloch-Boguslawska, E., Śliwka, K. M., Korenkiewicz, J., Skok, Ż., Ryć, K. (2001): Tissue Level, Distribution and Total Body Selenium Content in Healthy and Diseased Humans in Poland. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 56: 461-466.
- Zhang, C., Li, S., Zhang, J., Hu, C., Che, G., Zhou, M., Jia, L. (2016): Antioxidant and hepatoprotective activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus eryngii* SI-04. *International journal of biological macromolecules* 91:568-577.
- Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., & Cheung, P. C. (2011): Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food hydrocolloids* 25: 196-206.
- Zhao, L., Zhao, G., Zhao, Z., Chen, P., Tong, J., Hu, X. (2004): Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 3954-3959.
- Zhao, L., Zhao, G., Du, M., Zhao, Z., Xiao, L., Hu, X. (2008): Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *European Food Research and Technology* 226: 499-505.
- Zhou, S., Feng, P., Tang, L. (1994): Rheological behavior of mycelial suspensions of *Polystictus versicolor* during cultivation in an internal airlift-loop reactor by submerged culture. *Huagon Xuebao* 45: 371- 374.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., Xu, B. (2015): Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis* 41: 165-173.

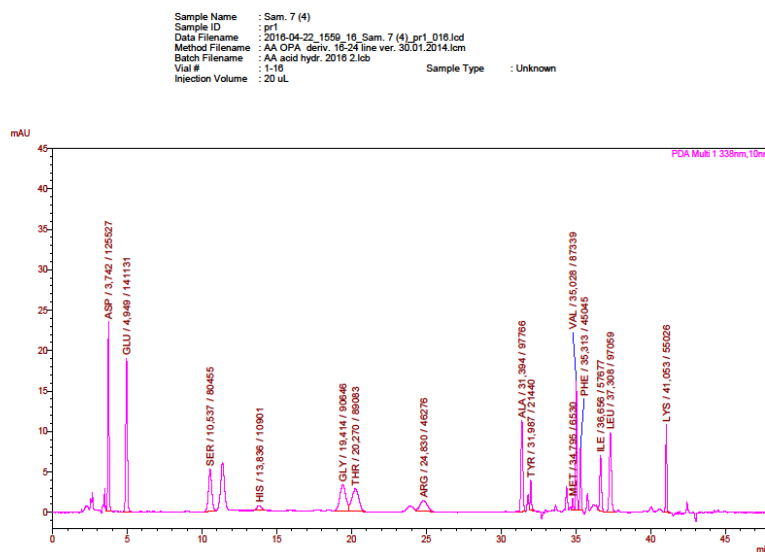
Žnidaršič, P., Pavko, A. (2001): The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology* 39: 237-252.

8. PRILOG

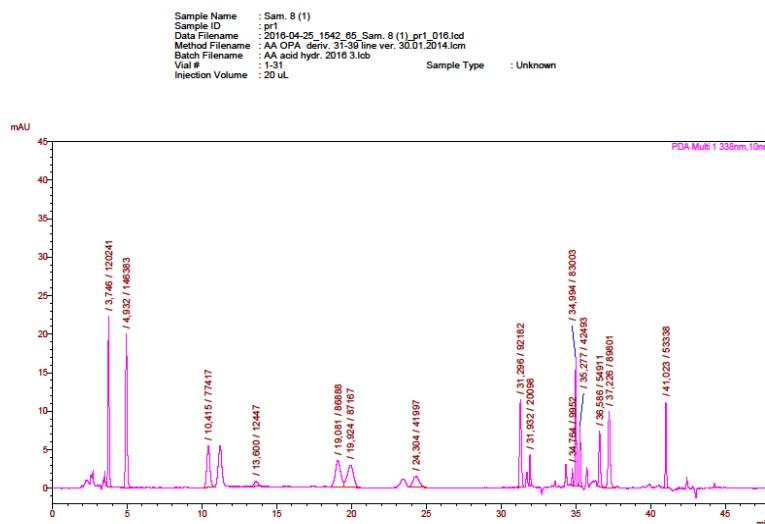
8.1 Prilog A. Hromatogrami ukupnih aminokiselina plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive *C. versicolor*



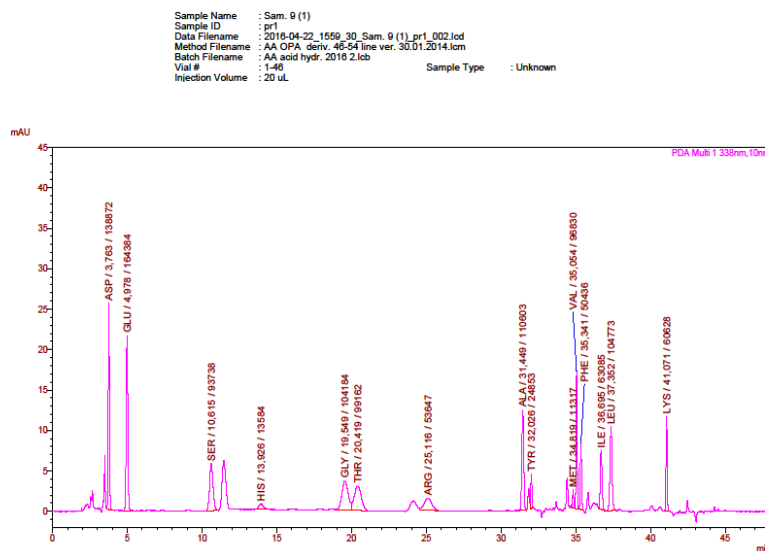
Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu (KPT).



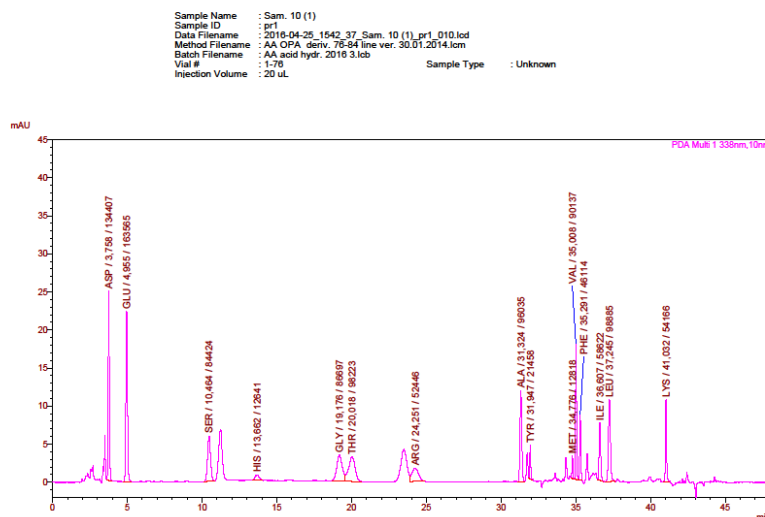
Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu obogaćenom selenouream u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

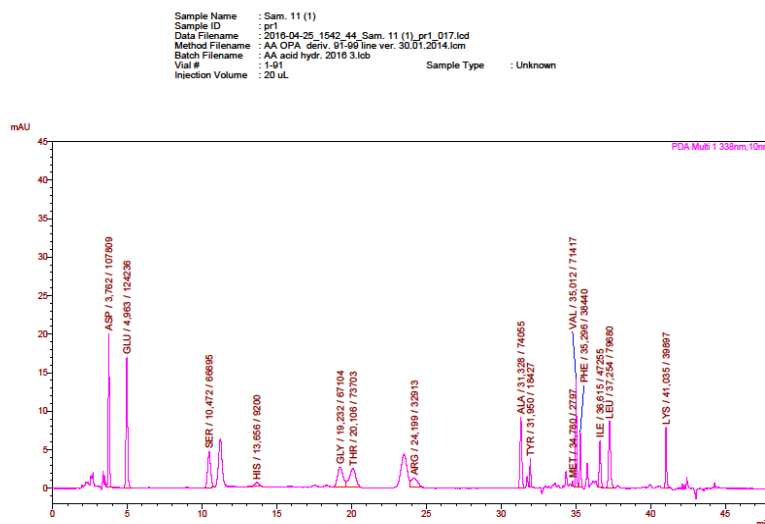
Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SU 25 PT).



Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SP 10 PT).

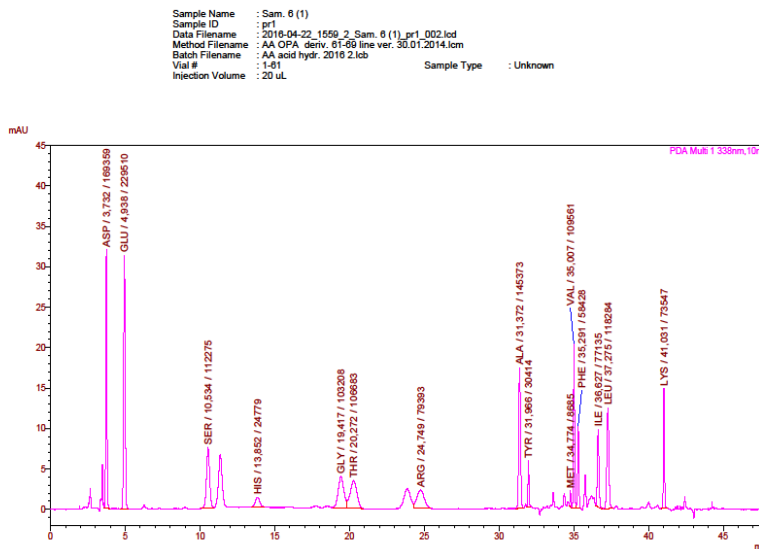
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rase na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SP 25 PT).

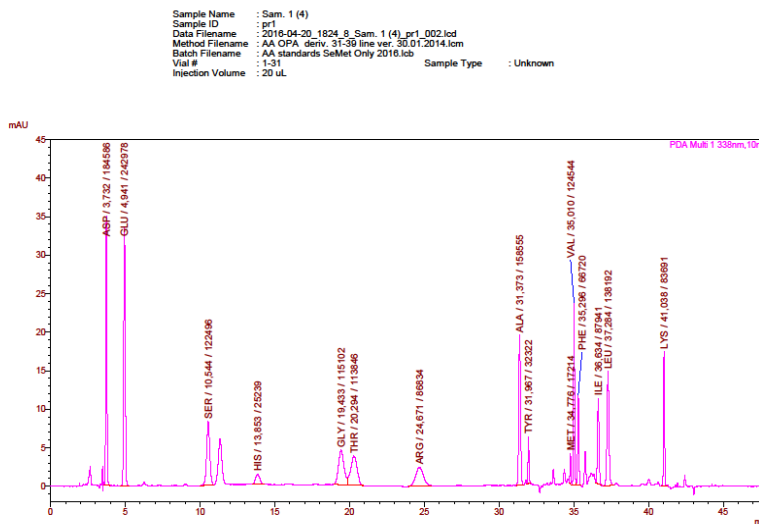


Ukupan aminokiselinski sastav plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rase na čvrstom supstratu obogaćenom natrijum selenitom u koncentraciji od 10 mgSe kg⁻¹ (SeO₃²⁻ 10 PT).

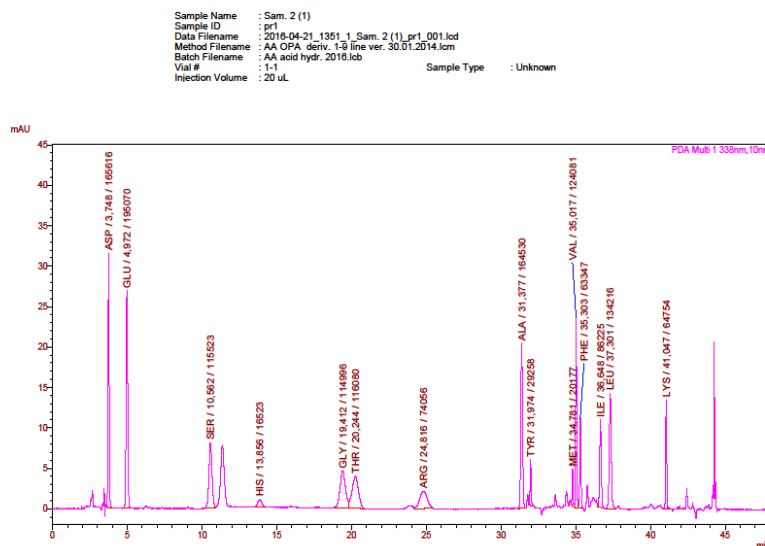
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*



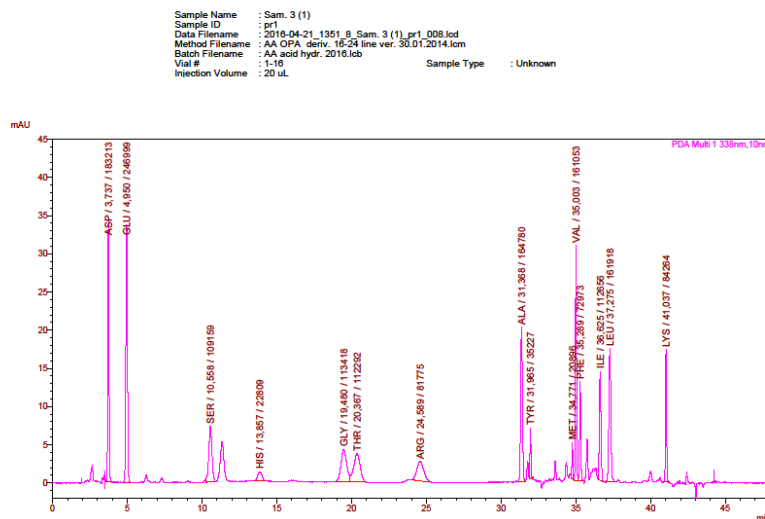
Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi (Ksub).



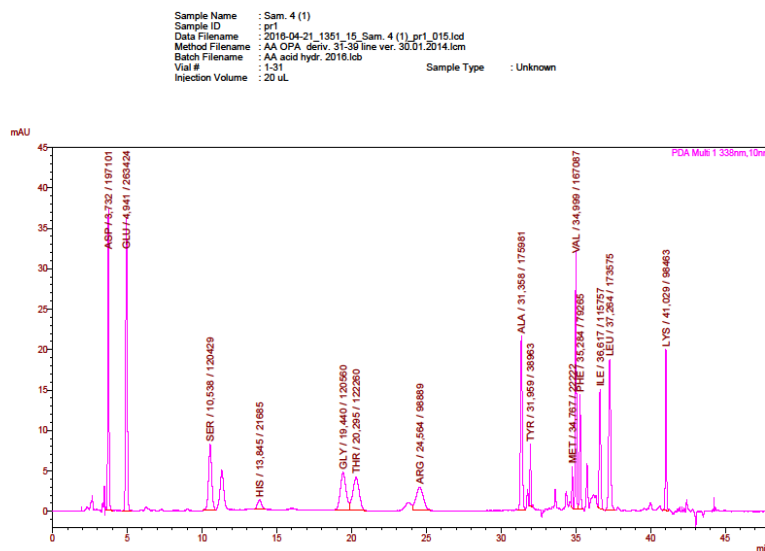
Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SU 10 sub).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

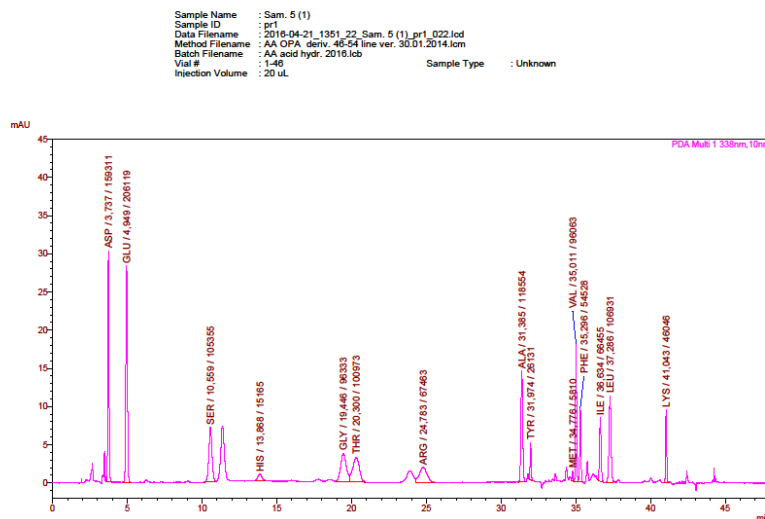
Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SU 25 sub).



Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SP 10 sub).

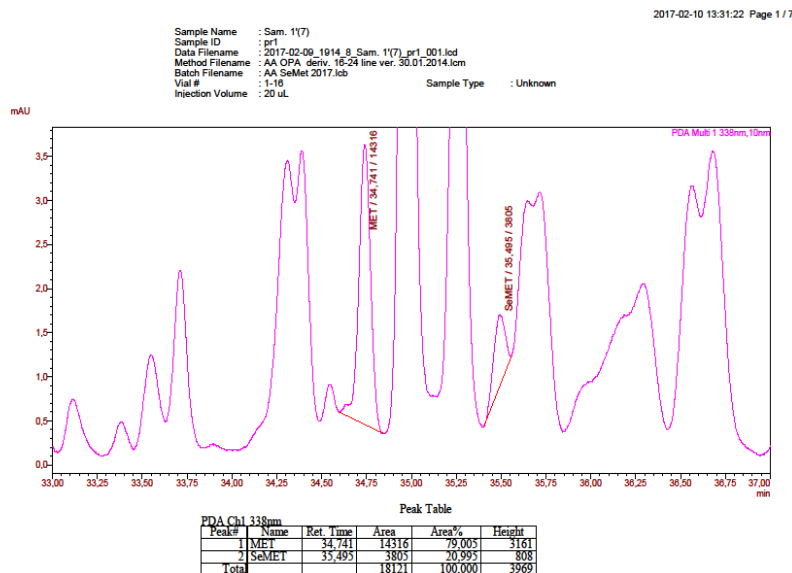
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex[®]-om u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SP 25 sub).

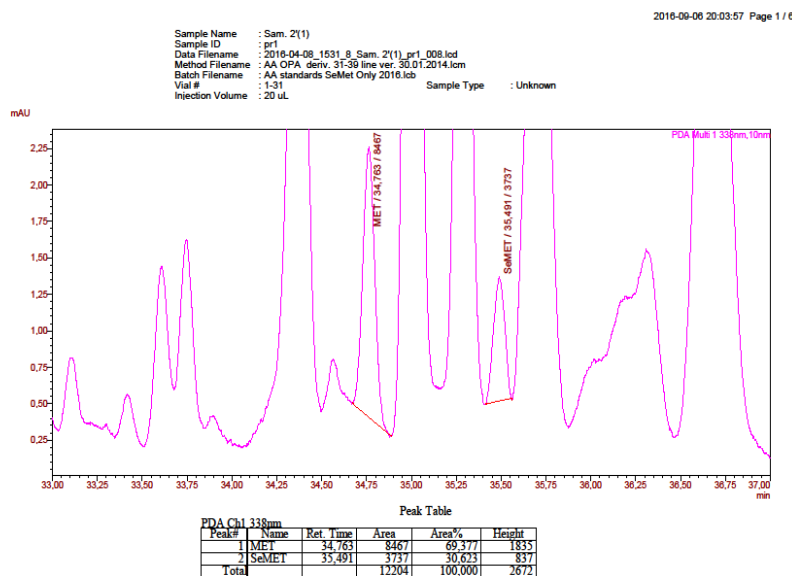


Ukupan aminokiselinski sastav micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SeO₃²⁻ 10 sub).

8.2 Prilog B. Hromatogrami L-selenometionina, L-metionina i S-metil-seleno-L-cisteina micelijuma selenom obogaćene gljive *C. versicolor*

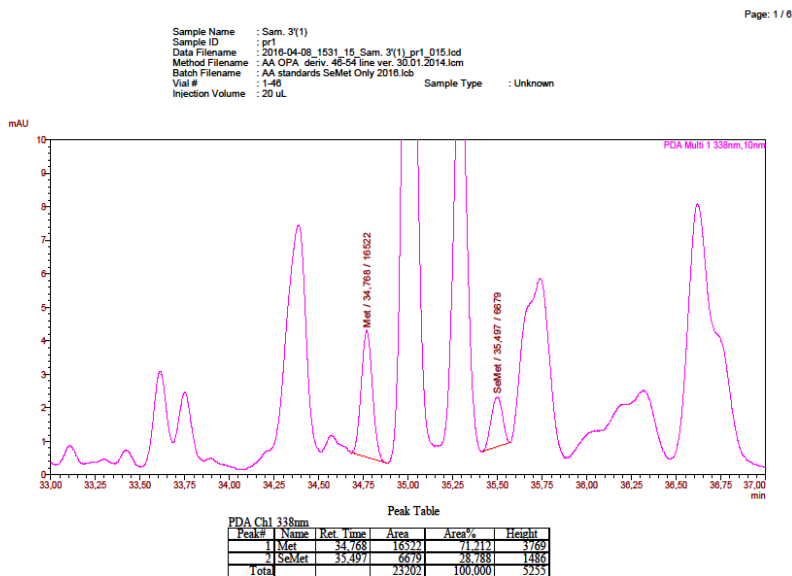


Sadržaj L-selenometionina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SU 10 sub).

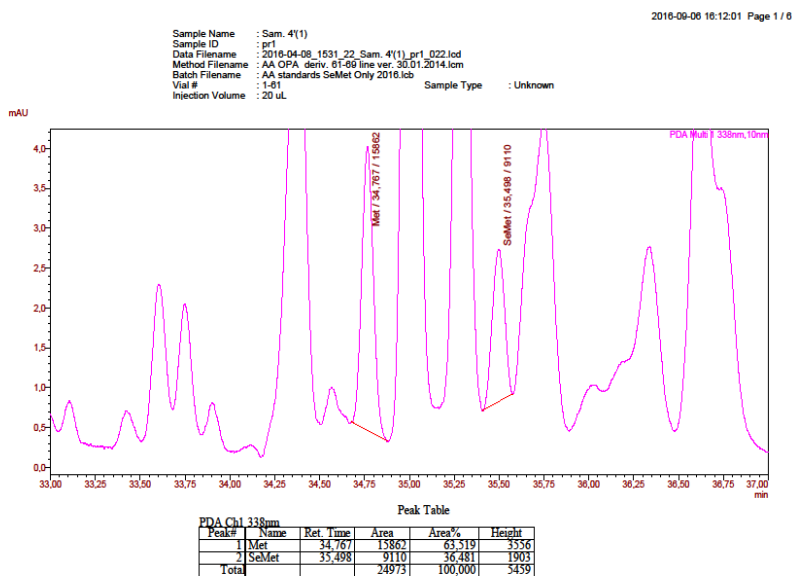


Sadržaj L-selenometionina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SU 25 sub).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

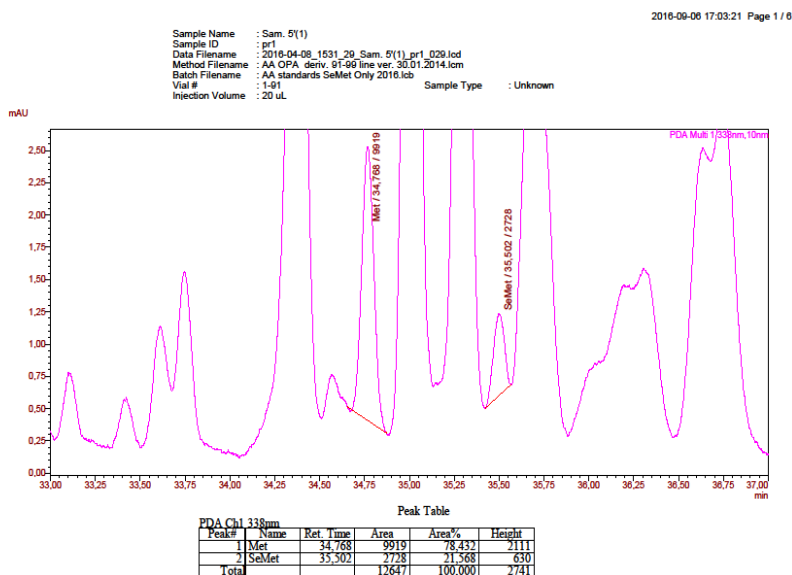


Sadržaj L-selenometionina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SP10 sub).

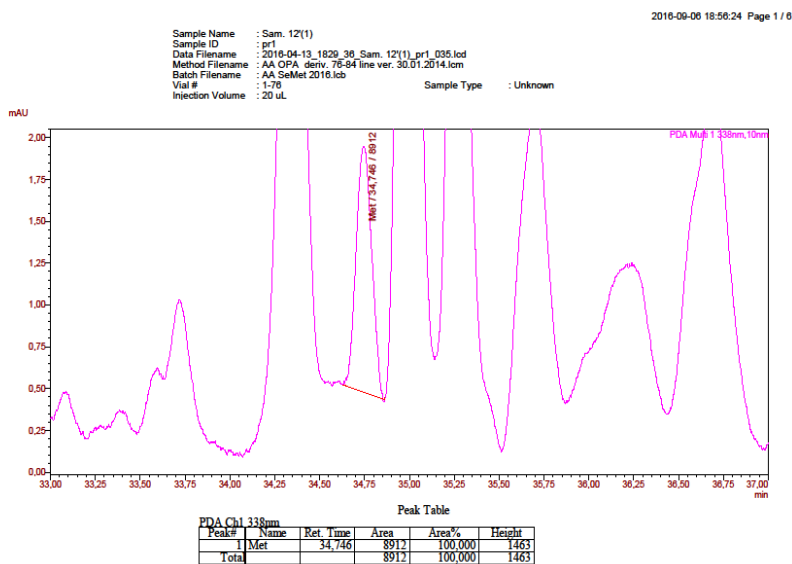


Sadržaj L-selenometionina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SP 25 sub).

Akumulacija seleno u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

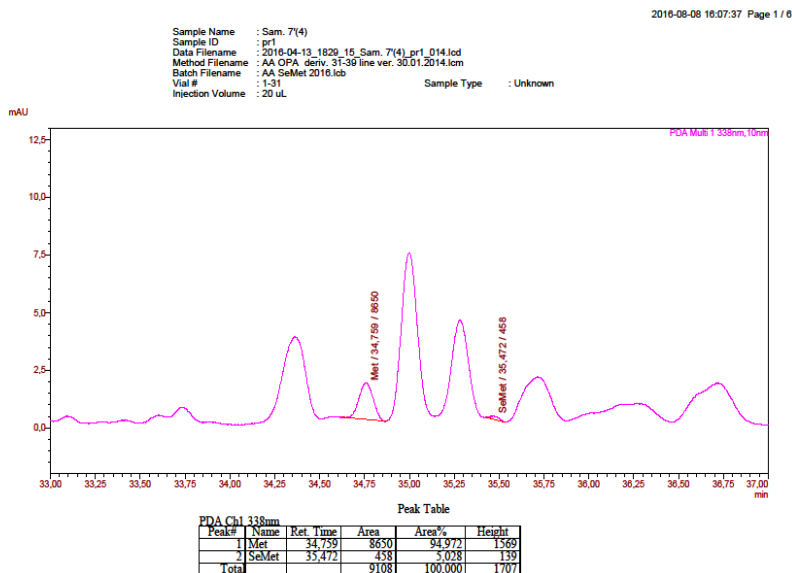


Sadržaj L-selenometionina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj natrijum selenitom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SeO₃²⁻ 10 sub).

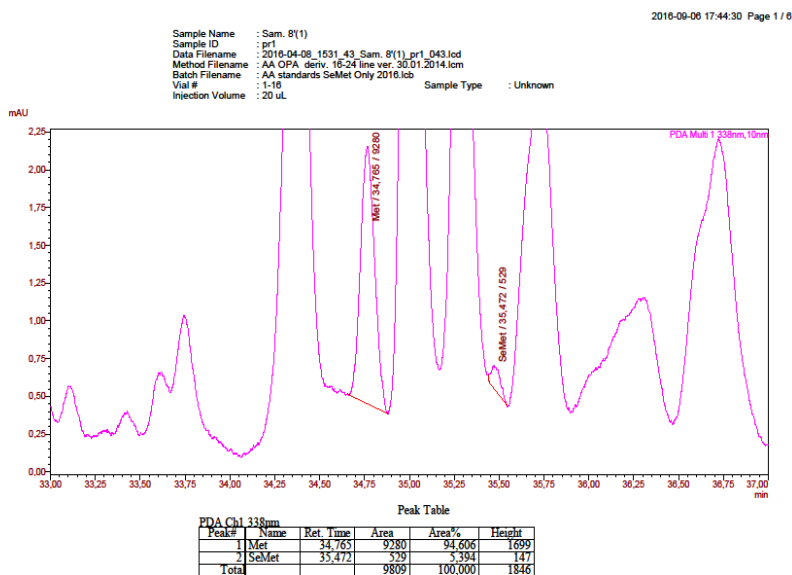


Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu (KPT).

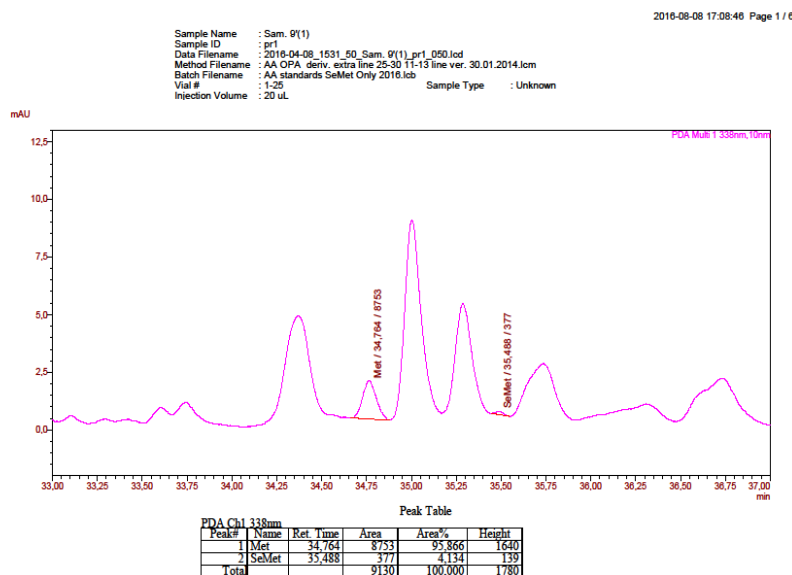
Akumulacija seleno u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*



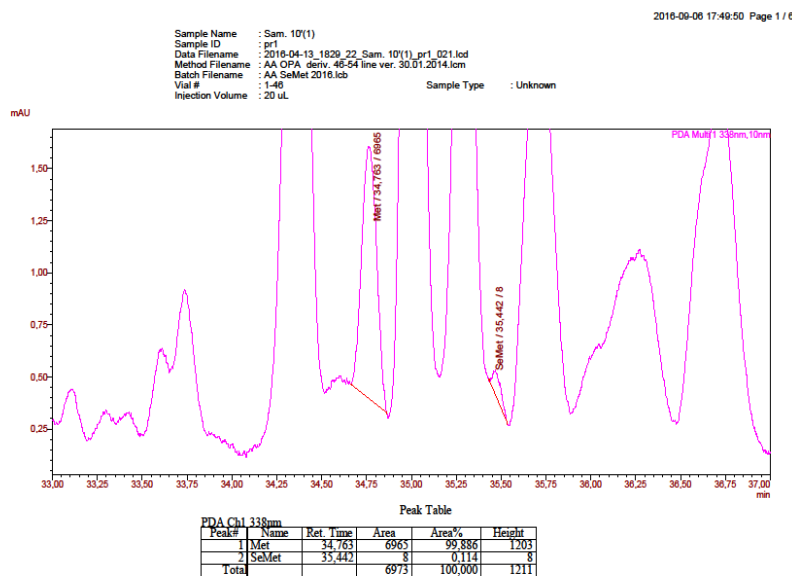
Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* gajenje na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT).



Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SU 25 PT).

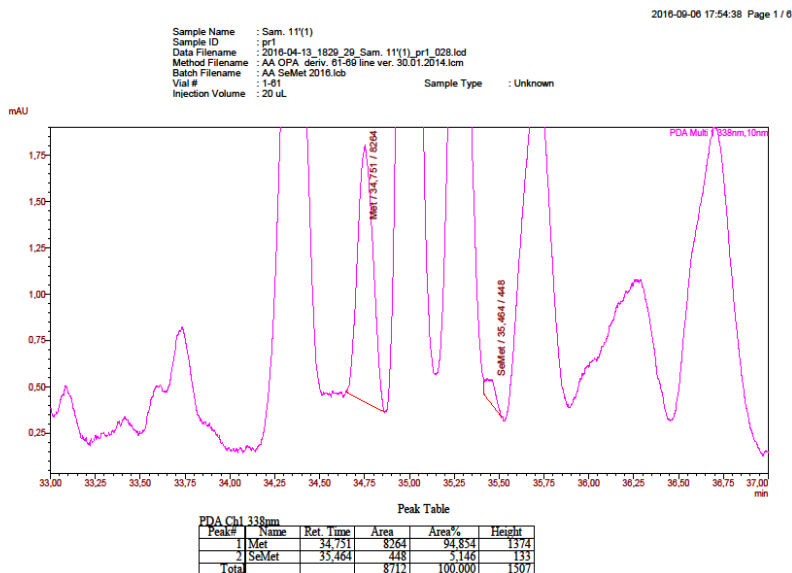
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SP 10 PT).

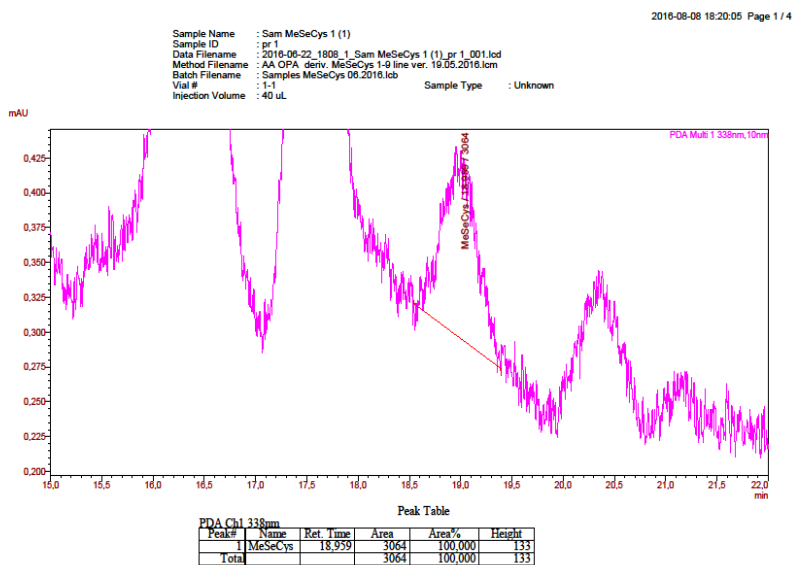


Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SP 25 PT).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

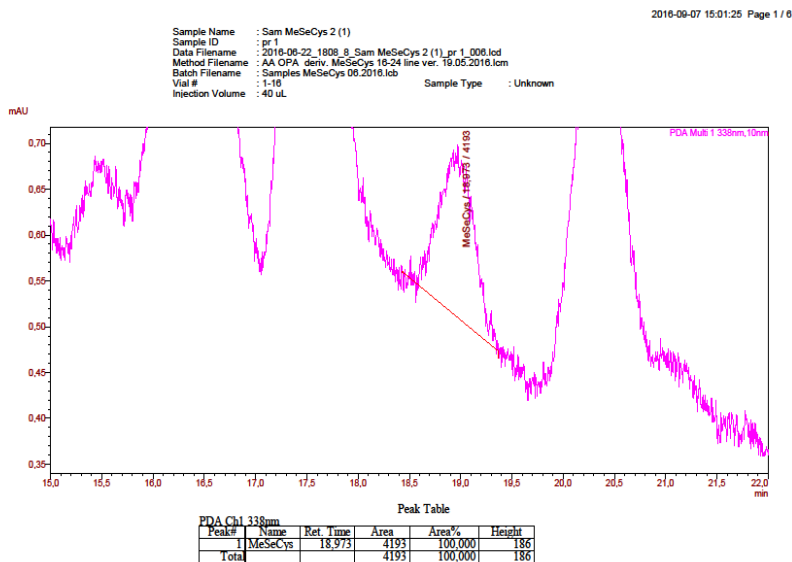


Sadržaj L-selenometionina u plodonosnim telima gljive *C. versicolor* rasle na čvrstom supstratu obogaćenom natrijum selenitom u koncentraciji od 10 mg Sekg⁻¹ (SeO₃²⁻ 10 PT).

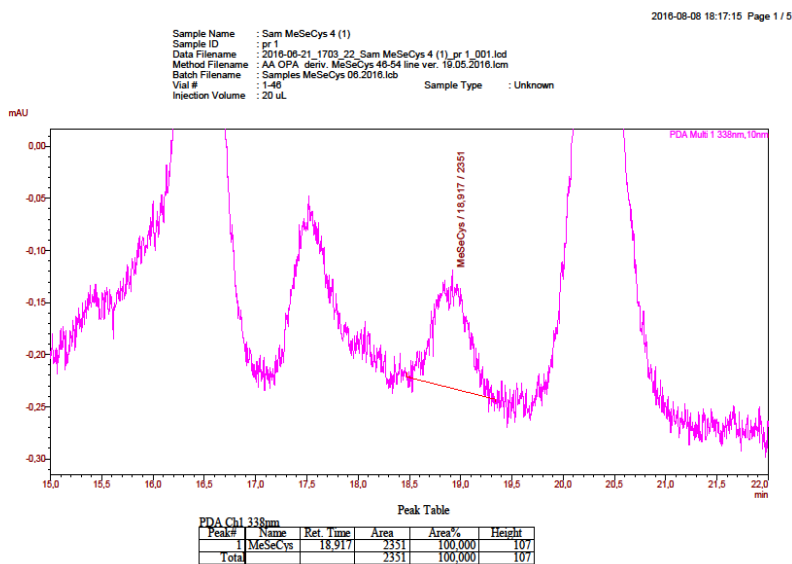


Sadržaj Seleno-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SU 10 sub).

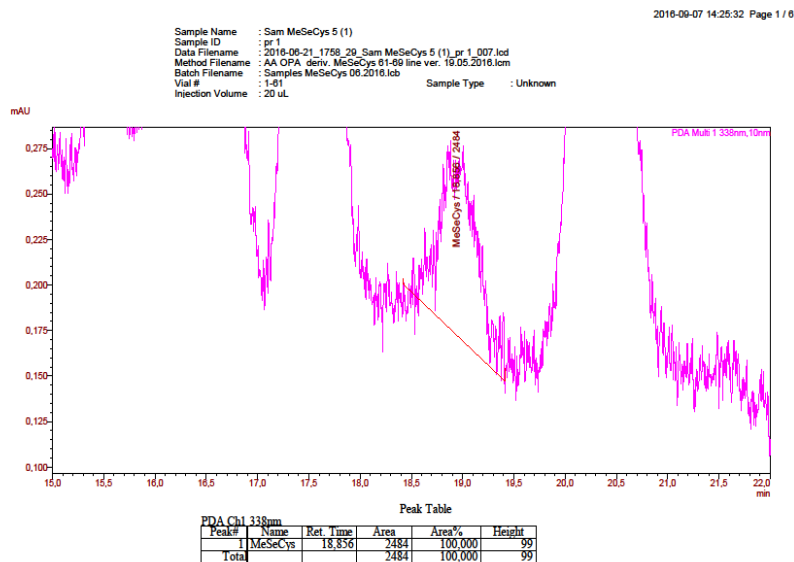
Akumulacija seleno u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*



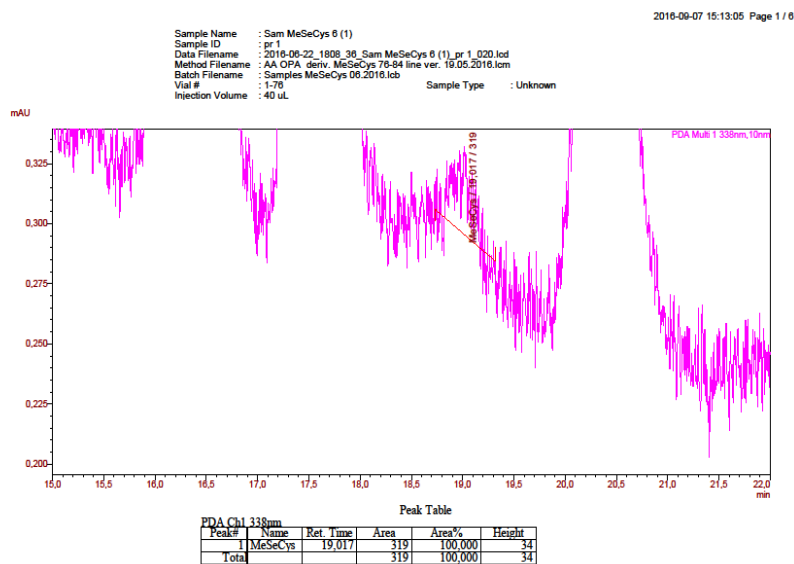
Sadržaj seleno-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SU 25 sub).



Sadržaj seleno-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SP 10 sub).

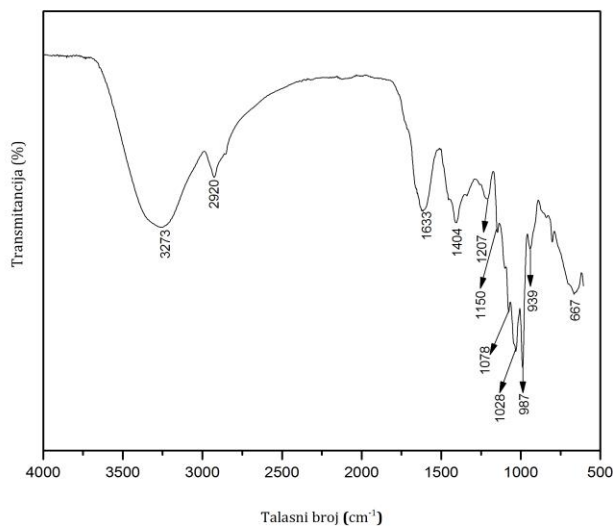
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Sadržaj seleno-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenju Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se L⁻¹ (SP 25 sub).

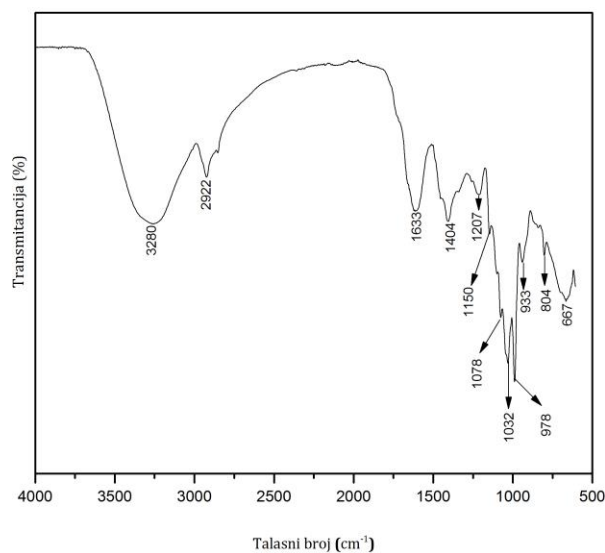


Sadržaj Seleno-metil-seleno-L-cisteina micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi obogaćenju natrijum selenitom u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SeO₃²⁻ 10 sub).

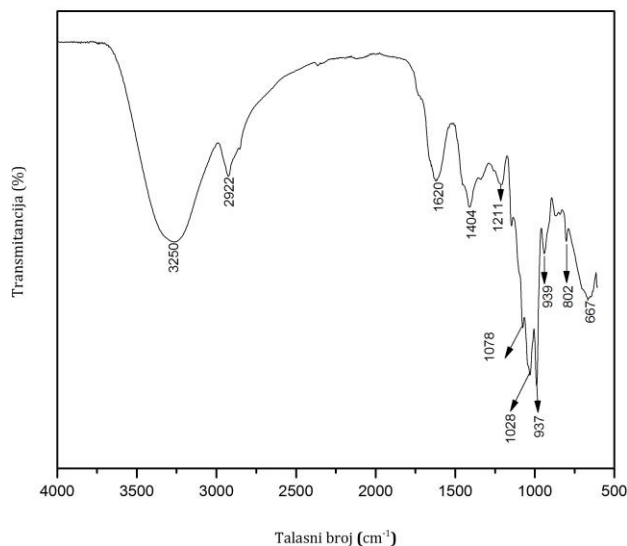
8.3 Prilog C. FTIR spektri metanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelijuma selenom obogaćene gljive *C. versicolor*



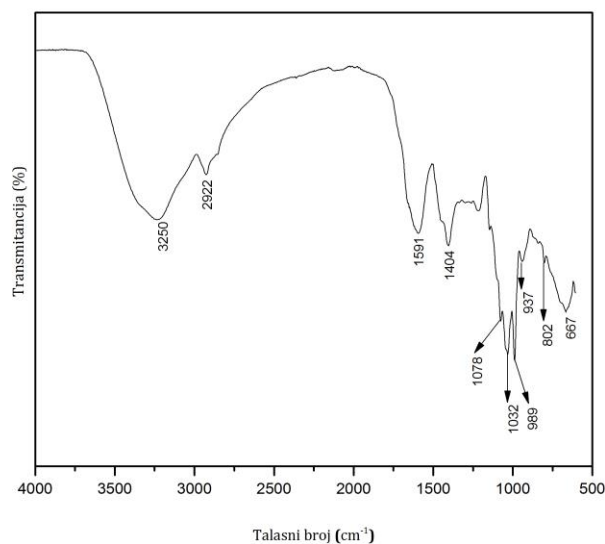
FTIR spekter metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* gajenje na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT_{eks}).



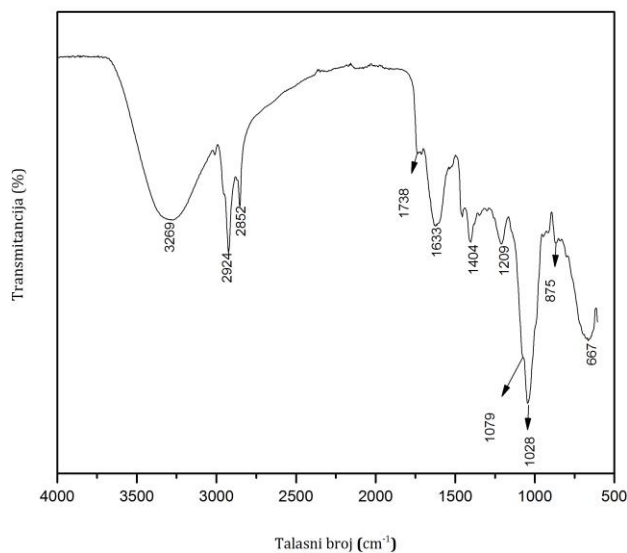
FTIR spekter metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SU 25 PT_{eks}).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

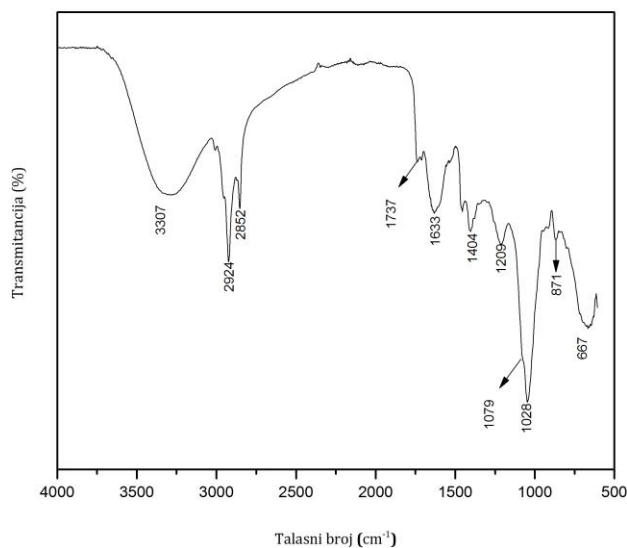
FTIR spektar metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* gajenje na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SP 10 PT_{eks}).



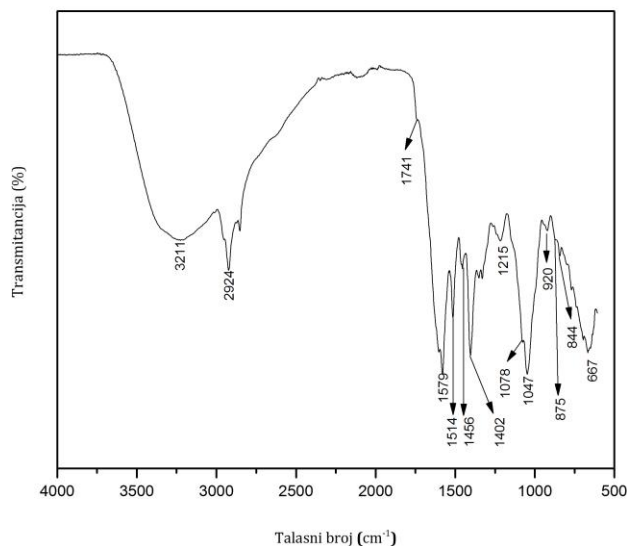
FTIR spektar metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* gajenje na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se kg⁻¹ (SP 25 PT_{eks}).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

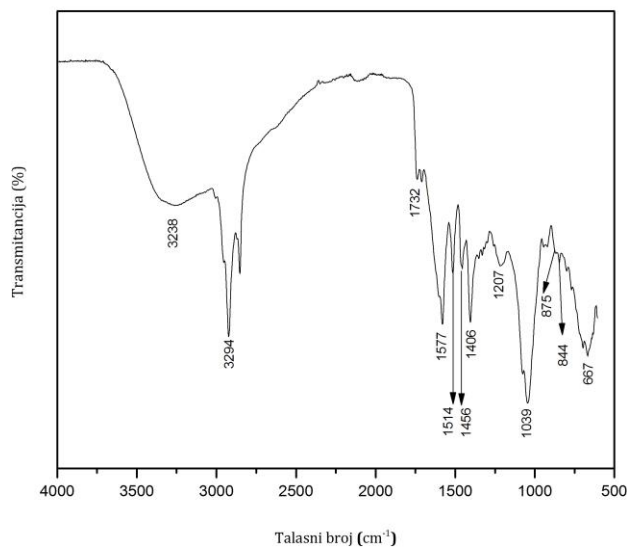
FTIR spektar metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se mL⁻¹ (SU 10 subeks).



FTIR spektar metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj selenoureom u koncentraciji od 25 mg Se mL⁻¹ (SU 25 subeks).

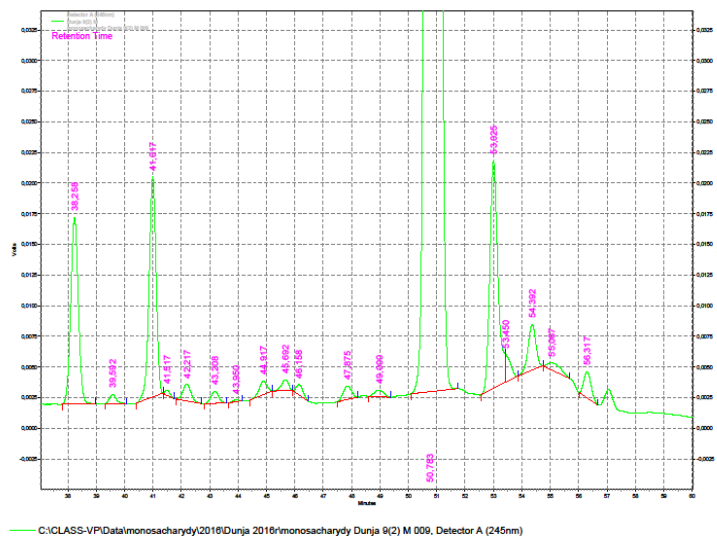
Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

FTIR spektar metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se mL⁻¹ (SP 10 subeks).

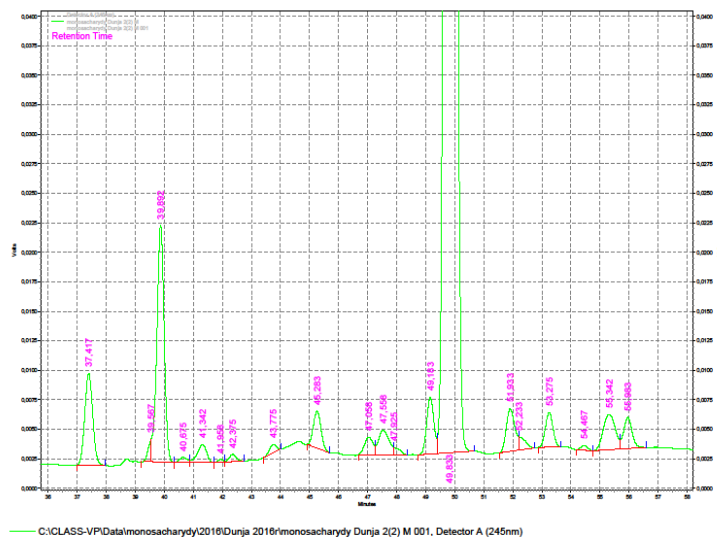


FTIR spektar metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje submerzno u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 25 mg Se mL⁻¹ (SP 25 subeks).

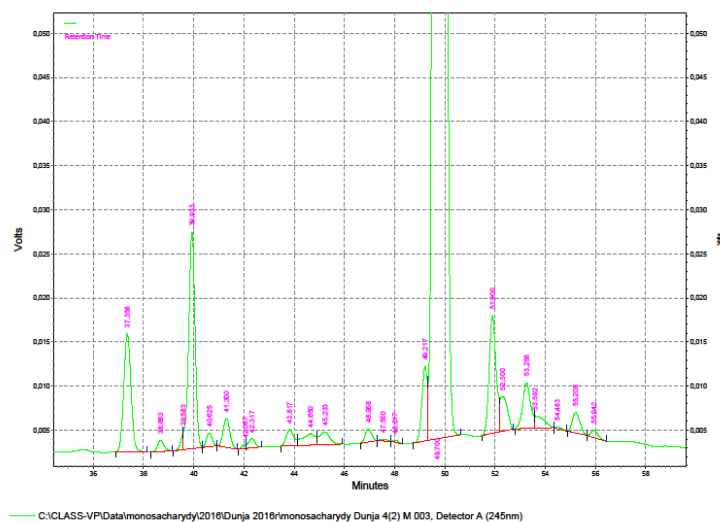
8.4 Prilog D. Hromatogrami monosaharida metanolnih ekstrakta gljive *C. versicolor*



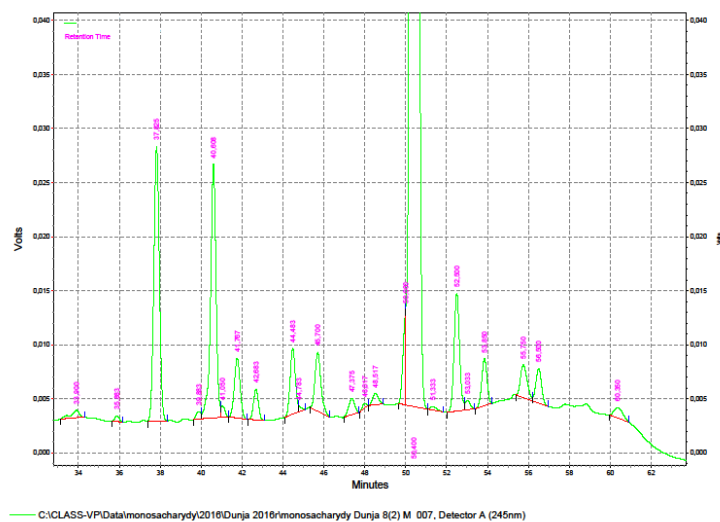
Monosaharidni sastav metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* gajenih na čvrstom supstratu (KPT_{eks}).



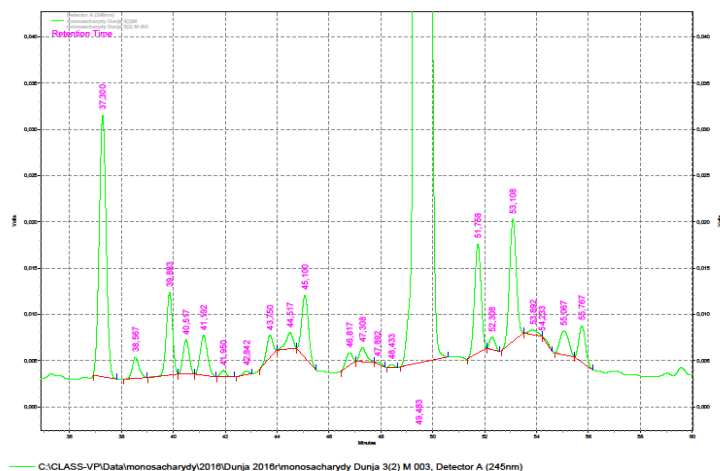
Monosaharidni sastav metanolnog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* gajenje na čvrstom supstratu obogaćenom Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SP 10 PT_{eks}).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

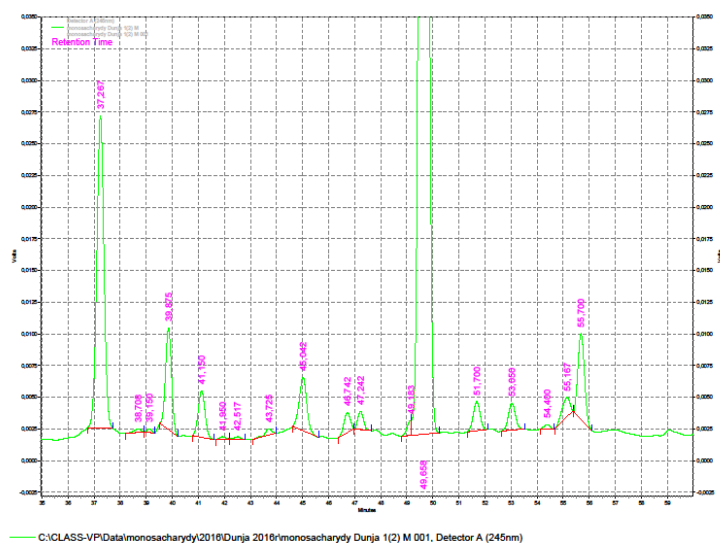
Monosaharidni sastav metanolo­nog ekstrakta plodonosnih tela gljive *C. versicolor* rastle na čvrstom supstratu obogaćenom selenoureom u koncentraciji od 10 mg Se kg⁻¹ (SU 10 PT_{eks}).



Monosaharidni sastav metanolo­nog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajene u tečnoj podlozi (Ksub).

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Monosaharidni sastav metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje u tečnoj podlozi obogaćenoj selenouream u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SU 10 sub_{eks}).



Monosaharidni sastav metanolnog ekstrakta micelijuma gljive *C. versicolor* gajenje u tečnoj podlozi obogaćenoj Sel-Plex®-om u koncentraciji od 10 mg Se L⁻¹ (SP 10 sub_{eks}).

Biografija autora

Dunja K. Duvnjak rođena je 08.08.1986. godine u Pančevu, Republika Srbija. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu 2010. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 9.06 (devet nula šest). Diplomski rad "*Rizici od pojave mikotoksina u hrani*", odbranila je ocenom 10 (deset). Na doktorske akademske studije na istom fakultetu upisana je 2010. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija.

U periodu između 2011. i 2015 godine, bila je angažovana kao stipendista-doktorant na nacionalnom projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u okviru integralnih i interdisciplinarnih istraživanja. Od 2015. god je angažovana kao istraživač saradnik na Poljoprivrednom fakultetu.

Autor je i koautor tri naučna rada sa ISI liste objavljenih u vodećim međunarodnim časopisima kao i deset saopštenja objavljenih na domaćim i međunarodnim skupovima.

Dobitnik je FEMS-ove stipendije za mlade naučnike 2016. godine u okviru koje je provela tri meseca na naučnom usavršavanju na Farmaceutskom fakultetu, Medicinskog Univerziteta u Varšavi, na Katedri za sintezu lekova i farmaceutsku biotehnologiju.

Dobitnik je nagrade Fonda za mlade talente grada Pančeva za najbolje studente završnih godina, 2008 godine.

Član je udruženja Mikrobiologa Srbije od 2012. godine.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Dunja Duvnjak

Broj indeksa: TH 10/41

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom: Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, 31.3.2017. god.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Dunja Duvnjak

Broj indeksa: TH 10/41

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

Mentor: Prof. dr Miomir Nikšić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis autora

U Beogradu, 31.3.2017. god.

Izjava o korišćenju

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

Akumulacija selena u submerzno i industrijski gajenoj gljivi *Coriolus versicolor*

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

Potpis autora

U Beogradu, 31.3.2017. god.

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.