

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
HEMIJSKI FAKULTET**



**Maja S. Kozarski**

**HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA,  
ANTIOKSIDATIVNA I ANTIMIKROBNA  
SVOJSTVA POLISAHARIDNIH  
EKSTRAKATA  
ODABRANIH VRSTA GLJIVA**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2012.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF CHEMISTRY**



**Maja S. Kozarski**

**CHEMICAL CHARACTERIZATION,  
ANTIOXIDATIVE AND ANTIMICROBIAL  
PROPERTIES OF POLYSACCHARIDE  
EXTRACTS FROM THE SELECTED  
MUSHROOM SPECIES**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2012.**

***Mentori:***

Dr *Miroslav M. Vrvić*, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr *Dragica Jakovljević*, viši naučni saradnik  
Centar za hemiju - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Univerzitet u Beogradu

***Članovi komisije:***

Dr *Vele Tešević*, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

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

Dr *Nina Todorović*, viši naučni saradnik  
Centar za hemiju - Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju,  
Univerzitet u Beogradu

Dr *Ljuba Mandić*, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr *Vladimir Pavlović*, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Datum odbrane doktorske disertacije:***

***Datum promocije doktorske disertacije:***

# HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA, ANTIOKSIDATIVNA I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA ODABRANIH VRSTA GLJIVA

## IZVOD

Polisaharidi gljiva, biljaka i mikroorganizama privlače veliku pažnju zbog svojih interesantnih bioloških svojstava kao što su: antitumorno, antivirusno, antioksidativno, antikomplementarno, antikoagulaciono, hipolipidemijsko dejstvo, kao i imunomodulatorska i imunostimulativna aktivnost, što ih sve čini pogodnim za primenu u mnogim oblastima, među kojima su i prehrambena industrija, kozmetika, biomedicina, poljoprivreda, zaštita životne sredine i otpadnih voda.

Oksidativna oštećenja prirodnih i industrijski pripremljenih namirnica predstavljaju veliki ekonomski problem u prehrambenoj industriji, jer direktno utiču na karakteristike kvaliteta kao što su ukus, boja, tekstura i nutritivne vrednosti. Pored toga, može doći do nastanka potencijalno toksičnih proizvoda. Reaktivne vrste kiseonika učestvuju u patofiziologiji različitih kliničkih poremećaja, kao što su: ishemija, reperfuzione povrede, infarkt miokarda, reumatoidni artritis, neurodegenerativni poremećaji, ateroskleroza, hipertenzija, hemoragički šok i dijabetes.

Mikrobiološko kvarenje hrane i trovanje hranom su jedan od najvažnijih problema sa kojima se suočava prehrambena industrija. Alimentarne intoksikacije su danas globalni problem. Porast rezistentnosti patogena na poznate lekove stvara potrebu za razvojem novih antimikrobnih agenasa.

U ovom radu su proučavana antioksidativna i antimikrobna svojstva polisaharidnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva iz klase *Basidiomycetes*: *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus* i *Trametes versicolor*.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da polisaharidni ekstrakti, dobijeni nakon ekstrakcije vrelom vodom, alkoholne precipitacije i dijalize, predstavljaju smešu/komplekse polisaharida, proteina i fenola. Analizom monosaharidnog sastava utvrđeno je da svi ispitivani ekstrakti sadrže D-glukozu kao preovlađujuću

monosaharidnu komponentu. U većini ekstrakata su u manjoj ili većoj koncentraciji prisutni D-galaktoza, D-manoza i L-fukoza/D-ksiloza. Prisustvo uronskih kiselina potvrđeno je u polisaharidima ekstrakta gljive *G. applanatum*. Ekstrakte karakterišu različiti sadržaji  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana. Ukupan sadržaj glukana, u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima nalazio se u opsegu od 35% do 87%. Glukopiranozne monosaharidne jedinice su međusobno prevashodno povezane  $\beta$ -glikozidnim vezama (57-97%), osim u komercijalnom ekstraktu spora *G. lucidum* gde je procenat  $\alpha$ -glukana u odnosu na ukupan sadržaj glukana iznosio 94,2%. FT-IR spektroskopskom analizom čvrstih uzoraka polisaharidnih ekstrakata je utvrđeno, pored apsorpcionih traka koje potvrđuju spektralni obrazac tipičan za polisaharidne molekule i prisustvo traka koje su karakteristične za estarske veze i aromatična jedinjenja. FT-IR spektri svih ispitivanih uzoraka su takođe sadržavali i apsorpcione trake koje potiču od proteina, fenola i pigmenta. Rezultati elementalne analize su ukazali na prisustvo azota neproteinske prirode u ekstraktima.

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom utvrđena je različita površinska morfologija polisaharidnih ekstrakata.

Rezultati istraživanja su ukazali da polisaharidni ekstrakti odabranih gljiva poseduju antioksidativna i antimikrobna svojstva. Utvrđeno je da antioksidativna i antimikrobna dejstva ekstrakata pokazuju visoku termostabilnost (121 °C). Ispitivana svojstva polisaharidnih ekstrakata dobijenih vrelom vodenom ekstrakcijom i alkoholnom precipitacijom i ekstrakata koji su nakon toga bili dijalizovani i dodatno precipitirani alkoholom, bila su uporediva.

Za merenje antioksidativnih svojstava u *in vitro* uslovima, korišćene su 4 različite metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Poređene su sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, inhibicija lipidne peroksidacije i sposobnost redukcije jona gvožđa ( $\text{Fe}^{+3}$ ) kao i sposobnost heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  u sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala za ekstrakte plodonosnih tela gljiva *P. linteus*, *G. applanatum*, *L. edodes* i komercijalnog ekstrakta spora *G. lucidum* mogu se uporediti sa vrednostima  $\text{EC}_{50}$   $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline,  $\text{EC}_{50} < 0,1$  mg/mL. Ekstrakt gljive *G. applanatum* je pokazao najvišu sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije ( $\text{EC}_{50} = 2,07$  mg/mL). Vrednost  $\text{EC}_{50}$  za askorbinsku kiselinu bila je 1,64 mg/mL. Ekstrakt gljive *G. applanatum* ispoljio je i

najveću moć redukcije ( $EC_{50} = 0,18$ ). Vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti redukcije za druge polisaharidne ekstrakte kretale su se od 0,47 do preko 20 mg/mL. Visoka sposobnost redukcije većine polisaharidnih ekstrakata bila je u korelaciji sa prisustvom i količinom nepolisaharidnih komponenti. Kod nedijalizovanih polisaharidnih ekstrakata potvrđena je veoma visoka pozitivna korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za moć redukcije i ukupnog sadržaja glukana,  $\beta$ -glukana i ukupnog sadržaja polisaharida. Visoka negativna korelacija zapažena je između sadržaja fenola i  $EC_{50}$  vrednosti, kao i umerena negativna korelacija sa ukupnim sadržajem proteina.

Kod polisaharidnih ekstrakata koji su dodatno prečišćeni dijalizom i alkoholnom precipitacijom, smanjenje  $EC_{50}$  vrednosti u odnosu na moć redukcije bilo je u korelaciji sa većim sadržajem fenola i  $\alpha$ -glukana. Sa povećanjem ukupnog sadržaja fenola i  $\alpha$ -glukana, povećavala se redukciona moć ekstrakata. FT-IR analizom polisaharidnog ekstrakta gljive *G. applanatum* potvrđeno je prisustvo slobodnih/esterifikovanih C=O grupa uronskih kiselina kao strukturnih komponenti jednog (ili više) polisaharida koji se nalaze u ispitivanom ekstraktu.

Kod nedijalizovanih polisaharidnih ekstrakata najniže vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti heliranja jona gvožđa ( $Fe^{+2}$ ) zabeležene su kod komercijalnog polisaharidnog ekstrakta spora *G. lucidum*, 0,59 mg/mL i ekstrakta plodonosnih tela gljive *P. linteus*, 0,91 mg/mL. Utvrđena je pozitivna korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih polisaharida i glukana. Visoka negativna korelacija bila je sa ukupnim sadržajem fenola, kao i umerena negativna sa ukupnim sadržajem proteina. Limunska kiselina se nije pokazala kao dobar helirajući agens u ovoj metodi,  $EC_{50} > 20$  mg/mL. Kod dijalizovanih polisaharidnih ekstrakata najbolju sposobnost heliranja ispoljio je ekstrakt gljive *G. applanatum* ( $EC_{50} = 3,58$  mg/mL).

Ispitivanjem antimikrobnih svojstava polisaharidnih ekstrakata utvrđeno je da su ispitivane Gram-pozitivne vrste bakterija bile osetljivije na prisustvo ekstrakata od ispitivanih Gram-negativnih vrsta bakterija (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 12900, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 35150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736). Gotovo svi ekstrakti delovali su mikrobicidno na bakterije *E. faecalis* ATCC 29212 i *E.*

*faecalis* ATCC 49532. MIC vrednosti za polisaharidne ekstrakte dobijene iz plodonosnih tela gljiva *G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus*, *T. versicolor*, *A. brasiliensis* i komercijalnog i laboratorijskog ekstrakta spora *G. lucidum* bile su između 1,25-2,5 mg/mL. Ekstrakti su ispoljili bakteriostatsko dejstvo na sledeće Gram-pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112. MIC vrednosti ekstrakata u odnosu na *Bacillus cereus* 10876 i *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 bile su u opsegu od 2,5 do 5 mg/mL. Ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *G. applanatum* su ispoljili MIC vrednosti od 2,5 mg/mL u odnosu na *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Nijedan od ekstrakata, u ispitivanoj koncentraciji, nije imao uticaja na rast posmatranih kvasaca: *Candida albicans* ATCC 24443, *Candida albicans* ATCC 10259, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Cryptococcus neoformans* ATCC 76484.

*Ključne reči:* gljive, hrana i lekovi, polisaharidi, fenoli, proteini, antioksidativna svojstva, sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala, inhibicija peroksidacije lipida, moć redukcije, sposobnost heliranja, antimikrobna svojstva, mikrobicidno dejstvo, mikrobiostatsko dejstvo.

Naučna oblast: BIOHEMIJA

Uža naučna oblast: ĆELIJSKA BIOHEMIJA; BIOPOLIMERI I DRUGE BIOLOŠKI ZANIMLJIVE SUPSTANCE

UDK: 577.11

# CHEMICAL CHARACTERIZATION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF POLYSACCHARIDE EXTRACTS FROM THE SELECTED MUSHROOM SPECIES

## ABSTRACT

Polysaccharides from mushrooms, plants and microorganisms have received considerable attention due to their biological activities, such as antitumor, antiviral, antioxidation, anticomplementary, anticoagulant, hypolipidemic, immunostimulant and immunological activities, which made them possible to be used in many fields including food, cosmetics, biomedicine, agriculture, environmental protection and wastewater management.

Oxidative deterioration in natural and processed foods is a large economic concern in the food industry because it affects many quality characteristics such as flavor, color, texture, and the nutritive value of foods. In addition, its products are potentially toxic. Also, reactive oxygen species have been implicated in the pathophysiology of various clinical disorders, including ischemia, reperfusion injury, myocardial infarction, rheumatoid arthritis, neurodegenerative processes, atherosclerosis, acute hypertension, hemorrhagic shock and diabetes mellitus.

Food spoilage and food poisoning are among the most important issues facing the food industry. Foodborne illness is a global problem. Development of novel antibacterial compounds for resistant organisms is becoming critically important.

The present study was focused on the researching of possible antioxidant and antimicrobial properties of polysaccharide extracts from the selected *Basidiomycetes* mushroom species: *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus* and *Trametes versicolor*.

Based on the analysis, the extracts contained a mixture/complex of polysaccharides, proteins and polyphenols, which were still present in the extracts after hot water treatment, ethanol precipitation and dialysis. The prevalent monosaccharide in all



extracts was D-glucose, while D-galactose, D-mannose and L-fucose/D-xylose were present to a lesser or greater quantities. Uronic acid was found in the *G. applanatum* polysaccharides. Samples contained varying amounts of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans. Total glucan contents varied considerably, from 35 % for to 87 %. Glucopyranosyl units were primarily connected by  $\beta$ -glycosidic linkages (57-97%), except in the commercial *G. lucidum* spore extract, where percentage of  $\alpha$ -glucan compared to the total glucan content was 94,2%. FT-IR analysis showed strong aromatic and ester peaks next to the different sugar and polysaccharide signals. The FTIR spectra of all investigated samples showed characteristic absorption bands related to the residual proteins, phenols and pigments. The results of elemental analysis indicated presence of non protein nitrogen in the polysaccharide extracts.

The scanning electron microscopy was observed different surface morphology of polysaccharide extracts.

The results of the study indicated that polysaccharide extracts of selected *Basidiomycetes* mushrooms are antioxidative and possess antibacterial properties. The antioxidant and antimicrobial effects of the extracts were resistant to high temperatures (121 °C), at which they have been exposed during the extraction process. Extracts obtained by hot water extraction and ethanol precipitation were effective as additionally dialyzed and with ethanol purified extracts.

For measuring antioxidant activity *in vitro*, 4 different methods corresponding to different levels of antioxidant action were used: free radical-scavenging ability by using the DPPH assay, inhibition of lipid peroxidation, ferric reducing antioxidant power assay and chelating ability on ferrous ions.

EC<sub>50</sub> values of the DPPH scavenging activity of the polysaccharide extracts from commercial *G. lucidum* spore, *P. linteus*, *G. applanatum* and *L. edodes* fruiting bodies were found to be particularly low and were comparable with scavenging ability of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid, EC<sub>50</sub> < 0,1 mg/mL. *G. applanatum* extract showed the highest inhibition of lipid peroxidation (EC<sub>50</sub> = 2,07 mg/mL). Ascorbic acid displayed an EC<sub>50</sub> value of 1,64 mg/mL in the prevention of the lipid peroxidation. *G. applanatum* extract also had the highest reducing power (EC<sub>50</sub> = 0,18). The EC<sub>50</sub> values of the extracts in the reducing power assay ranged from 0,47 to > 20 mg/mL. The high reducing power of most extracts was in correlation with the non polysaccharide

components present in the extracts. Positive correlation was found between EC<sub>50</sub> values of the reducing power abilities and the amount of total glucans, β-glucans and polysaccharides content in the non dialyzed polysaccharide extracts. Strong negative correlation was observed between total phenol content and EC<sub>50</sub> values of the reducing power, as moderate negative correlation with total protein content.

For all polysaccharide extracts, which were additionally purified by dialysis and ethanol precipitation, a decrease of EC<sub>50</sub> values of the reducing power correlated with higher phenol and α-glucan contents, i. e. increase of the reducing power correlated with higher phenol and α-glucan contents. FT-IR spectrum of *G. applanatum* extract showed the presence of a free uronic acid or esterified C=O group of the uronic acids as the structural component of at least one polysaccharide in this extract.

Among the non dialyzed polysaccharide extracts the lowest EC<sub>50</sub> values of the chelating activity of ferrous ions were found for commercial *G. lucidum* spore extract, 0,59 mg/mL and for *P. linteus* fruiting bodies extract, 0,91 mg/mL. Positive correlation was found between EC<sub>50</sub> values of the chelating ability and the amount of total polysaccharides, glucans content in the extracts. Negative and strong correlation was observed with total phenol contents, as negative and moderate correlation with total protein content. Citric acid was not a good chelating agent for ferrous ions in this assay, EC<sub>50</sub> > 20 mg/mL. Among dialyzed polysaccharide extracts, *G. lucidum* showed the best chelating ability (EC<sub>50</sub> = 3,58 mg/mL).

The study of antimicrobial properties of polysaccharide extracts showed that the Gram-positive bacteria were generally more sensitive to the tested extracts compared with Gram-negative bacterial species (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 12900, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 35150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736). Almost all extracts were acting microbicidal on bacteria *E. faecalis* ATCC 29212 and *E. faecalis* ATCC 49532. MIC values for polysaccharide extracts from *G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus*, *T. versicolor*, *A. brasiliensis* fruiting bodies and commercial and in laboratory prepared *G. lucidum* spore extract were between 1,25-2,5 mg/mL. The effect of extracts on the other Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC

25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 were microbiostatic. Extracts expressed MIC values between 2,5-5 mg/mL on bacteria *Bacillus cereus* ATCC 10876 and *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953. MIC values for *G. lucidum* and *G. applanatum* fruiting bodies extracts were 2,5 mg/mL in relation to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Extracts had no effect on the growth of yeasts *Candida albicans* ATCC 24443, *Candida albicans* ATCC 10259, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Cryptococcus neoformans* ATCC 76484.

*Key words:* mushrooms, food and medicine, polysaccharides, phenols, proteins, antioxidant properties, DPPH scavenging activity, inhibition of lipid peroxidation, reducing power, chelating ability, antimicrobial properties, microbicidal, microbiostatic.

Academic Expertise: BIOCHEMISTRY

Field of Academic Expertise: CELL BIOCHEMISTRY; BIOPOLYMERS AND OTHER INTERESTING BIOLOGICAL SUBSTANCES

UDK: 577.11

*Zahvaljujem se mentorima dr Miroslavu M. Vrvicu, redovnom profesoru, na podrsci, savetima i razumevanju, kao i dr Dragici Jakovljevic, visem naucnom saradniku, na pomoći tokom uoblicavanja ove doktorske disertacije, sugestijama tokom pisanja rada i razumevanju.*

*Zahvaljujem se profesoru dr Veletu Teševiću na podrsci i savetima.*

*Takođe se zahvaljujem dr Nini Todorović na pomoći pri eksperimentalnom delu rada i sugestijama tokom pisanja rada.*

*Hvala dr Milki Jadranin na tečno-masenim analizama.*

*Zahvalnost dugujem profesoru dr Miomiru Nikšiću na iskrenoj podrsci i razumevanju pri izradi ovoga rada.*

*Zahvaljujem se profesorima dr Ljubi Mandić i dr Vladimiru Pavloviću.*

*Zahvalnost dugujem profesoru dr L.J.L.D. van Griensven-u, Laboratory for Cell Cybernetics, Plant Research International, Wageningen, Holland, na stručnoj pomoći i sugestijama tokom izrade ovog rada.*

*Beograd, maj 2012.*

*Autor*

## AKRONIMI I SKRAĆENICE

---

<b>Ab</b>	<i>Agaricus bisporus</i>
<b>Abr</b>	<i>Agaricus brasiliensis</i>
<b>AIDS</b>	Sindrom stečenog imunološkog deficita
<b>ANOVA</b>	Jednofaktorska analiza varijansi
<b>AOS</b>	Sistem antioksidativne zaštite
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>AZT</b>	Azidotidimin
<b>BHA</b>	Butilovani hidroksianisol
<b>BHT</b>	Butilovani hidroksitoluen
<b>BRM</b>	Biološki odgovorni modifikatori
<b>BSA</b>	Goveđi serum albumin
<b>cGMP</b>	Ciklični guanozin monofosfat
<b>DMSO</b>	dimetil sulfoksid
<b>DOPA</b>	3,4-dihidroksifenilalanin
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
<b>DSS</b>	natrijum-2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonat
<b>EC<sub>50</sub></b>	Efektivna koncentracija pri kojoj je 50% aktivnosti
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
<b>EOMA</b>	Elementarna organska mikroanaliza
<b>EPR</b>	Elektronska paramagnetna rezonanca
<b>FT-IR</b>	Fourier Transform-Infrared Spectroscopy
<b>Ga</b>	<i>Ganoderma applanatum</i>
<b>GAE</b>	Ekvivalenti galne kiseline
<b>GI</b>	<i>Ganoderma lucidum</i>
<b>GI-s</b>	Laboratorijski ekstrakt <i>Ganoderma lucidum</i>
<b>GI-s-fujian</b>	Komercijalni ekstrakt <i>Ganoderma lucidum</i>
<b>GOPOD</b>	glukoooksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin
<b>HIV</b>	Virus humane imunodeficijencije
<b>HPLC</b>	Tečna hromatografija visokog stepena razdvajanja
<b>INT</b>	p-jodonitrotetrazolijumviolet
<b>NK</b>	Urođeno ubilačke ćelije
<b>LC-MS</b>	Tečna hromatografija masena spektrometrija
<b>LDL</b>	Lipoproteini malih gustina
<b>Le</b>	<i>Lentinula edodes</i>
<b>LEM</b>	Polisaharidni ekstrakt micelijuma gljive <i>Shiitake</i>
<b>LSD</b>	Najmanja značajna razlika
<b>MIC</b>	Minimalna inhibitorna koncentracija
<b>NCO</b>	Azot, Ugljenik i Kiseonik
<b>NMR</b>	Nuklearna Magnetna Rezonanca
<b>NP</b>	Konverzioni faktor (Nitrogen to Protein Factor)
<b>OS</b>	Oksidativni stres
<b>PC</b>	Papirna hromatografija
<b>PDTC</b>	Pirolidin ditiokarbamat
<b>PI</b>	<i>Phellinus linteus</i>
<b>PSK</b>	Krestin

---

---

<b>PSP</b>	Polisaharid-peptid gljive <i>Trametes versicolor</i>
<b>RCS</b>	Reaktivne ugljenikove vrste
<b>RNS</b>	Reaktivne azotove vrste
<b>ROS</b>	Reaktivne kiseonikove vrste
<b>RS</b>	Reaktivne vrste
<b>RSS</b>	Reaktivne sumporne vrste
<b>SEM</b>	Skenirajuća elektronska mikroskopija
<b>SPG</b>	Sonifilan
<b>SR</b>	Slobodni radikali
<b>SSG</b>	<i>Sclerotonia sclerotiorum</i> glukan
<b>TBHQ</b>	tercijarni-butilovani hidroksihinon
<b>TLC</b>	Tankoslojna hromatografija
<b>TFA</b>	Trifluor sirćetna kiselina
<b>Tv</b>	<i>Trametes versicolor</i>
<b>Tween</b>	Polioksietilensorbat monolaureat (Polisorbat 20)

---

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE</b>	<b>4</b>
2.1. VIŠE GLJIVE IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH POLISAHARIDA	4
2.2. STRUKTURA BIOLOŠKI AKTIVNIH POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA	10
2.2.1. UTICAJ STRUKTURE POLISAHARIDA NA BIOLOŠKU AKTIVNOST GLJIVA	14
2.2.2. AKTIVACIJA POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA HEMIJSKOM MODIFIKACIJOM	15
2.2.3. IZOLOVANJE POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA	15
2.3. REAKTIVNE HEMIJSKE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES	16
2.3.1. REAKTIVNE VRSTE	18
2.4. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA - ANTIOKSIDANSI	20
2.4.1. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA GLJIVA	22
2.5. ANTIMIKROBNA DEJSTVA	23
2.5.1. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA GLJIVA	23
2.6. ODABRANE VRSTE GLJIVA	25
2.6.1. <i>AGARICUS BISPORUS</i>	25
2.6.2. <i>AGARICUS BRASILIENSIS</i>	27
2.6.4. <i>GANODERMA APPLANATUM</i>	28
2.6.5. <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	31
2.6.6. <i>LENTINULA EDODES</i>	33
2.6.7. <i>PELLINUS LINTEUS</i>	36
2.6.8. <i>TRAMETES VERSICOLOR</i>	37
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>39</b>
3.1. PRIPREMA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA	39
3.1.1. EKSTRAKCIJA	40
3.1.2. DIJALIZA	41
3.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA	41
3.2.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KOMPONENTI EKSTRAKATA	41
3.2.1.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH UGLJENIH HIDRATA	42

3.2.1.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA .....	42
3.2.1.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA .....	42
3.2.1.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GLUKANA.....	42
3.2.1.5. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA (EOMA).....	43
3.2.1.6. ODREĐIVANJE PROCENTA HIGROSKOPNE VLAGE .....	43
3.2.2. STRUKTURNO–INSTRUMENTALNE METODE.....	43
3.2.2.1. INFRACRVENA SPEKTROKOPIJA .....	43
3.2.2.2. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA (NMR) .....	44
3.2.2.3. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROKOPIJA (SEM) .....	44
3.2.2.4. TEČNO-MASENA HROMATOGRAFIJA .....	44
3.2.2.5. TEČNA HROMATOGRAFIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA <i>A. bisporus</i> , <i>A. brasiliensis</i> , <i>P. linteus</i> .....	46
3.2.2.6. PLANARNA HROMATOGRAFIJA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA .....	46
3.3. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA .....	47
3.3.1. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA .....	47
3.3.2. SPOSOBNOST INHIBICIJE PEROKSIDACIJE LIPIDA .....	48
3.3.3. REDUKCIONA SPOSOBNOST .....	48
3.3.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA .....	49
3.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA .....	49
3.4.1. SOJEVI MIKROORGANIZAMA .....	50
3.4.2. DIFUZIJA SA FILTER DISKOVA .....	51
3.4.3. MIKRODILUCIONA METODA .....	52
3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	53
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>54</b>
4.1. IDENTIFIKACIJA GLJIVA .....	54
4.1.1. <i>GANODERMA APPLANATUM</i> .....	55
4.1.2. <i>TRAMETES VERSICOLOR</i> .....	56
4.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA.....	57
4.2.1. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA DOBIJENIH VODENOM EKSTRAKCIJOM .....	57
4.2.1.1. POLISAHARIDNE KOMPONENTE.....	57
4.2.1.2. UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA .....	59



4.2.1.3. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA .....	60
4.2.1.4. FT-IR SPEKTROSKOPIJA .....	62
4.2.1.5. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA .....	65
4.2.1.6. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA .....	67
4.2.1.7. TEČNA HROMATOGRAFIJA ISPITIVANIH UZORAKA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA .....	72
4.2.1.8. PLANARNA HROMATOGRAFIJA .....	75
4.2.1.9. NMR SPEKTROSKOPIJA .....	75
4.2.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA PREČIŠĆENIH DIJALIZOM .....	78
4.2.2.1. PRINOS POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA .....	78
4.2.2.2. POLISAHARIDNE KOMPONENTE .....	79
4.2.2.3. UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA .....	81
4.2.2.4. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA .....	81
4.2.2.5. FT-IR SPEKTROSKOPIJA .....	82
4.2.2.6. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA .....	86
4.2.2.7. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA .....	88
4.2.2.8. TEČNA HROMATOGRAFIJA ISPITIVANIH UZORAKA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA .....	93
4.2.2.9. PLANARNA HROMATOGRAFIJA .....	93
4.2.2.10. NMR SPEKTROSKOPIJA .....	95
4.3. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA .....	97
4.3.1. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA DOBIJENIH VODENOM EKSTRAKCIJOM .....	98
4.3.1.1. SPOSOBNOST HVATANJA SLOBODNIH DPPH RADIKALA .....	98
4.3.1.2. INHIBICIJA PEROKSIDACIJE LIPIDA .....	99
4.3.1.3. REDUKCIONA SVOJSTVA .....	101
4.3.1.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA .....	102
4.3.2. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA PREČIŠĆENIH DIJALIZOM .....	104
4.3.2.1. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA .....	104
4.3.2.2. INHIBICIJA PEROKSIDACIJE LIPIDA .....	106
4.3.2.3. REDUKCIONA SVOJSTVA .....	108
4.3.2.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA .....	109

---

4.3.3. VREDNOSTI EC <sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE U ANTIOKSIDATIVNIM METODAMA .....	111
4.3.3.1. VREDNOSTI EC <sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE DOBIJENE VODENOM EKSTRAKCIJOM .....	111
4.3.3.2. VREDNOSTI EC <sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE KOJI SU PREČIŠĆENI DIJALIZOM .....	113
4.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA .....	118
4.4.1. ANTIBAKTERIJSKA I ANTIFUNGALNA AKTIVNOST .....	118
4.4.2. MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIC) .....	124
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>131</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>138</b>

# 1. UVOD

Proces oksidativne degradacije masti i ulja u hrani utiče na smanjenje kvaliteta i bezbednosti hrane usled formiranja sekundarnih, potencijalno toksičnih jedinjenja. Dodavanje antioksidanasa je neophodno, kako bi se sačuvali boja i ukus hrane, kao i da bi se izbegla degradacija vitamina. Oksidativni procesi nisu isključivo u prehrambenoj industriji negativna pojava. Antioksidansi se danas koriste i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, ali i u proizvodnji gume i goriva (benzin i biodizel), kako bi se sprečili procesi oksidativne degradacije. Sintetički antioksidansi, kao što su butilovani hidroksianisol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT), propil galat (PG) i tercijarni-butilhidrohinon (TBHQ) imaju veliku primenu kao dodatak prirodnim antioksidansima u cilju poboljšanja njihove efikasnosti. Međutim i pored dokazane velike efikasnosti u procesima hvatanja slobodnih radikala, postoje indikacije da neki od sintetičkih antioksidanasa ispoljavaju neželjene, toksične efekte. Zbog toga se danas sve veća pažnja posvećuje istraživanjima novih prirodnih izvora antioksidanasa. Ispitivanja su usmerena na smanjenje proizvodnih troškova kao i na poboljšanje rastvorljivosti ovih supstanci u emulzijama koje su sastavni deo prirodne ishrane. Neki od veoma poznatih prirodnih antioksidanasa iz začinskog bilja kao što su origano, majčina dušica, diktamon, majoran, lavanda i ruzmarin imaju ograničenu primenu zbog svog karakteristično jakog i specifičnog ukusa. Aditivi na bazi antioksidanasa su u 2007. godini na američkom tržištu ostvarili promet od 3,7 milijardi dolara, sa tendencijom rasta od oko 3% godišnje.

Infektivne bolesti su i danas jedna od glavnih pretnji za ljudsko zdravlje. Poslednjih godina sve veći problem postaje otpornost humanih patogenih mikroorganizama na antibiotike, lekove koji se već dugo primenjuju za profilaksu i tretiranje infektivnih bolesti. Zbog toga se stalno ispituju nove supstance koje su mikrobiološkog i biljnog porekla, a koje bi imale sposobnost da mobilišu humoralni imuni sistem organizma da se bori protiv virusa, bakterija, gljiva i protozoa koji su rezistentni na aktuelne antibiotike. Interesovanje za korišćenje lekova biljnog porekla je danas veoma aktuelno

zbog rasprostranjenog uverenja da je "zeleni lek bezbedan i pouzdan više nego skupi sintetički lekovi, od kojih mnogi imaju i neželjene sporedne efekte.

Tradicionalna medicina Kine, Japana i Koreje koristi gljive za održavanje i poboljšanje vitalnosti i zdravlja, kao i za lečenje mnogih oboljenja. Neke od njih su korišćene kao hrana i lekovi u ishrani naroda Dalekog istoka, o čemu postoje pisani dokumenti stari oko 5000 godina. Širok spektar snažnih lekovitih svojstava potiče od gljiva, odnosno od pojedinih komponenti koje ulaze u njihov sastav. Gljive sadrže veliki broj biološki aktivnih jedinjenja, kao što su različiti polisaharidi ( $\beta$ -glukani, hitin, heteropolisaharidi), terpeni, fenoli, esencijalne amino kiseline, lektini, nukleotidi, steroli, nezasićene masne kiseline. Pored toga, sadrže i veliki broj minerala i vitamina. Aktivne komponente gljiva su danas poznate po svojim antiinflamatornim i antitumornim osobinama, sprečavanju oboljenja kardiovaskularnog sistema, antiparazitskim, hepatoprotektivnim i antidijabetskim, antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima. Aktivne supstance gljiva deluju na održavanje biološke homeostaze i ponovno uspostavljanje balansa i prirodne odbrane organizma. Danas se u medicini i farmakologiji Dalekog istoka primenjuju mnogobrojni preparati gljiva sa antitumornim i imunomodulatorskim svojstvima, u vidu kapsula, ampula, ekstrakata i čajeva. U Japanu su lentinan, polisaharid gljive *Lentinula edodes* i krestin (PSK) iz gljive *Coriolus versicolor* registrovani lekovi protiv kancera još od sredine 80-tih godina prošlog veka i nalaze se po plasmanu među prvih 10 antitumornih preparata na tom tržištu. Zbog toga, gljive se danas smatraju funkcionalnom hranom i izvorom fiziološki značajnih komponenti.

Cilj ove disertacije bio je definisanje antioksidativnih i antimikrobnih svojstava polisaharidnih ekstrakata odabranih vrsta gljiva iz klase *Basidiomycetes*, kao i praćenje korelacije između antioksidativnih i antimikrobnih svojstava analiziranih ekstrakata i njihovih strukturnih karakteristika. Radi postizanja ovog cilja bilo je potrebno da se reše sledeći zadaci:

1. Optimizacija procesa izolovanja bioaktivnih polisaharidnih ekstrakata postupcima vrele vodene ekstrakcije, alkoholne precipitacije i prečišćavanja dijalizom.

2. Hemijska karakterizacija ekstrakata pomoću strukturno-instrumentalnih metoda (FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , SEM); hromatografskih metoda (HPLC–MS), planarne hromatografije (TLC, PC); metoda za određivanje sadržaja određenih komponenti ekstrakata (enzimske metode za određivanje ukupnih,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana, spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih polisaharida, proteina i fenola, elementalna analiza);
3. Utvrđivanje antioksidativnog potencijala polisaharidnih ekstrakata u *in vitro* uslovima korišćenjem nekoliko različitih metoda: praćenjem antioksidativne aktivnosti u model sistemu linoleinske kiseline, određivanjem sposobnosti hvatanja DPPH radikala, heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i redukcionne sposobnosti.
4. Utvrđivanje antimikrobnog potencijala ispitivanih ekstrakata na sojevima bakterija i kvasaca iz ATCC kolekcije, metodom difuzije sa filter diskova;
5. Definisane antioksidativnog potencijala u funkciji strukturnih karakteristika komponenti ekstrakata;
6. Definisane antimikrobnog potencijala u funkciji strukturnih karakteristika komponenti ekstrakata.

Definisane antioksidativnih i antimikrobnih svojstava polisaharidnih ekstrakata viših gljiva u saglasnosti je sa izuzetno važnom i veoma aktuelnom problematikom pronalazanja novih prirodnih bioloških materijala koji imaju antioksidativni i antimikrobni potencijal. Dobijeni rezultati trebalo bi da daju odgovore na pitanja koja se odnose na zavisnost antioksidativnih i antimikrobnih svojstava polisaharidnih ekstrakata u funkciji njihovih strukturnih karakteristika.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. VIŠE GLJIVE IZVOR BIOLOŠKI AKTIVNIH POLISAHARIDA

Više gljive se u narodnoj medicini Dalekog istoka, jedne od najstarijih u svetu, koriste još iz drevnih vremena. U "Shen Nong Ben Cao Jin" ("The Divine Farmer's Materia Medica") koji je napisao "otac kineske medicine" Shen Nong, iz dinastije Istočni Han u Kini (100-200. godine p.n.e.), pominju se lekovite gljive *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Dendropolyporus umbrellatus*, *Tremella fuciformis* (Wasser i Weis, 1999; Wasser, 2002;). Stari Grci i Rimljani su takođe mnogo znali o medicinskim svojstvima gljiva. Hipokrat u svojim zapisima (oko 400. godine p.n.e.) spominje upotrebu gljiva u moksi-biljnim oblogama, za tretman hroničnih bubrežnih oboljenja. Diskorid, lekar u Neronovoj vojsci, je sredinom 1. veka u svom delu „De Materia Medica” opisao gljivu „Agaricon” odnosno *Fomitopsis officinalis* koja se u to vreme koristila kao lek protiv tuberkuloze (Jacobs, 1985).

Lekovite gljive koje se koriste u borbi protiv kancera poznate su danas u Kini, Rusiji, Japanu i Koreji, kao i u SAD i Kanadi. U ruskoj medicini se koristi ekstrakt izolovan iz gljive Chaga-*Inonotus obliquus*, kao antitumorni lek i diuretik. Ikekawa et al., (1969) su objavili jednu od prvih naučnih studija o antitumornim dejstvima supstanci dobijenih iz plodonosnih tela različitih vrsta gljiva koja se ispoljavaju kroz posrednu aktivnost domaćina na implantirane ćelije tumora Sarcoma 180 kod životinja. Ubrzo zatim napravljena su prva tri leka poreklom iz viših gljiva sa antitumornim dejstvom. Sva tri su bila polisaharidi i to  $\beta$ -glukani: krestin iz micelijuma gljive *Trametes versicolor*, lentinan iz plodonosnog tela gljive *Lentinula edodes*, i šizofilan (schizophyllan) iz tečnosti dobijene submerznim gajenjem plodonosnog tela gljive *Schizophyllum commune*, tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Registrovani lekovi protiv kancera u Japanu na bazi polisaharida viših gljiva (Mizuno, 1999)

<i>Naziv leka</i>	<i>Krestin</i>	<i>Lentinan</i>	<i>Sonifilan</i>
<b>Skraćeni naziv</b>	<i>PSK</i>	-	<i>SPG</i>
<b>Uobičajeno ime</b>	<i>Krestin</i>	<i>Lentinan</i>	<i>Schizophyllan</i>
<b>Kompanija</b>	<i>Sankyo, Kureha</i>	<i>Ajinomoto, Yamanouchi, Morishita</i>	<i>Taito, Kaken</i>
<b>Datum izlaska na tržište</b>	<i>Maj 1977.</i>	<i>Decembar 1985.</i>	<i>April 1986.</i>
<b>Poreklo (vrsta gljive)</b>	<i>Tremetes versicolor (micelijum)</i>	<i>Lentinula edodes (plodonosno telo)</i>	<i>Shizopyllum commune (ekstracelularni proizvod)</i>
<b>Struktura polisaharida</b>	<i><math>\beta</math>-glukan-proteinski kompleks na glavnom lancu <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>3), <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>4) veze, grananje <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>6) veze</i>	<i><math>\beta</math>-glukan na glavnom lancu <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>3) veze, grananje <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>6) veze</i>	<i><math>\beta</math>-glukan na glavnom lancu <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>3) veze, grananje <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>6) veze</i>
<b>MM</b>	<i>100000</i>	<i>500000</i>	<i>450000</i>
<b>Kancer</b>	<i>digestivnih organa, pluća, dojke</i>	<i>želuca</i>	<i>cervikalni</i>

Potreba za pronalaženjem novih antitumornih i drugih lekovitih supstanci iz viših bazidiomiceta i proučavanje lekovitih svojstava ovih gljiva postala su predmet velikog broja naučnih istraživanja.

Polisaharidi viših gljiva se koriste kao adaptogeni i imunostimulatori. Adaptogen je prvi definisao Brekhman (1980), kao supstancu koja bi trebalo da ispunjava specifične kriterijume koji se odnose na kategoriju prirodno biljno-razvijenih "biološki odgovornih modifikatora" (Biological Response Modifiers-BRMs) ili imunopotencijatora. BRM su definisani kao agensi ili postupci koji modifikuju biološku reakciju domaćina

stimulacijom imunog sistema, što može da rezultira različitim terapijskim efektima. Kriterijumi za BRM su sledeći:

- Ne izaziva bol ni dodatni stres za organizam;
- Pomaže organizmu da se prilagodi raznim psihološkim stresovima;
- Mora da ima nespecifično dejstvo na organizam, podržavanjem glavnih sistema, uključujući nervni, hormonalni i imuni sistem, kao i regulisanje njihovih funkcija.

Imunomodulatorno dejstvo polisaharida viših gljiva ima profilaktički efekat i spada u neinvazivne oblike lečenja, primer je prevencija metastaze tumora. Polisaharidi viših gljiva ne napadaju ćelije kancera direktno, ali ostvaruju indirektno antitumorni efekat aktiviranjem različitih odbrambenih imunih odgovora (Mizuno i sar., 1990a; 1990b; 1992; 1994; Mizuno i Zhuang, 1995; Mizuno 2000). Poznato je da polisaharidi gljiva *Tremella fuciformis*, *Schizophyllum commune*, *Dendropolyporus umbrellatus*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Inonotus obliquus*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Lentinula edodes*, *Flammulina velutipes*, i dr. pokazuju aktivnost u stimulaciji makrofaga i pojačavanju imunog odgovora organizma.

Od svih proučavanih imunostimulatornih polisaharida gljiva najefektivniji je lentinan, dobijen iz gljive *Lentinula edodes*. Lentinan deluje kao odbrambeni potencijator (HDP-host defense potentiator) domaćina, koji ima svojstvo da obnovi ili uveća osetljivost ćelija domaćina na limfocitokine (interleukine), hormone i druge biološki aktivne supstance, stimulisanjem sazrevanja, diferencijacije ili proliferacije ćelija koje se nalaze u odbrambenim mehanizmima domaćina (Chihara, 1981). Ovaj polisaharid može da pojača odbranu organizma od raznih vrsta kancera i infektivnih bolesti, uključujući i AIDS. Lentinan stimuliše aktivnost ćelija ubica (NK-natural killers), T-ćelija, B-ćelija i makrofaga (Chihara, 1992).

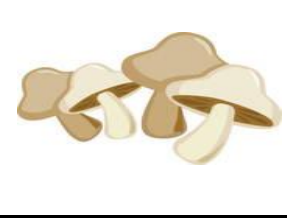
Danas je poznato preko 2000 lekovitih vrsta gljiva, koje pored imunostimulatornog i antitumornog dejstva imaju i dodatne korisne efekte: omogućavaju bolje podnošenje operacija i brži postoperativni tok, redukuju sporedne, neželjene efekte hemoterapije i radioterapije, a takođe sprečavaju oštećenja koja izazivaju citostatici i zračenja na ćelijama imunog sistema.

Gljive, naročito iz klase *Basidiomycetes*, pored imunostimulatornih i antitumornih svojstava poseduju i antivirusna svojstva, sposobnost snižavanja nivoa holesterola,



sprečavaju mikroembolije-začepljenje krvnih sudova, snižavaju krvni pritisak, poboljšavaju cirkulaciju, uravnotežavaju nivo glukoze u krvi, regulišu proces varenja, poboljšavaju rad disajnih organa, deluju antireumatski i antialergijski, imaju pozitivno dejstvo na snagu i izdržljivost organizma kao i na nervni sistem, usporavaju starenje, tabela 2.2. (Hobbs, 1986; Chihara, 1992; Mizuno, 1995; Wasser i Weis, 1999).

**Tabela 2.2.** Više gljive i njihova medicinska svojstva. **A:** antibakterijsko, **B:** antigljivično, **C:** antizapaljensko, **D:** antioksidativno, **E:** antitumorno, **F:** antivirusno, **G:** uticaj na regulaciju krvnog pritiska, **H:** na regulaciju nivoa glukoze u krvi, **I:** na regulaciju funkcija kardio vaskularnog sistema, **J:** snižavanje nivoa holesterola, **K:** imunostimulativni efekat, **L:** uticaj na regulaciju funkcije bubrega, **M:** na regulaciju funkcije jetre, **N:** na regulaciju funkcije pluća, **O:** na regulaciju funkcije nervnog sistema, **P:** na regulaciju seksualne funkcije, **Q:** prevencija od stresa (Stamets, 2005)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
<i>Agaricus brasiliensis</i>					•	•		•		•	•						
<i>Cordyceps sinensis</i>	•			•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>Flammulina velutipes</i>					•						•						
<i>Fomes fomentarius</i>	•					•											
<i>Ganoderma applanatum</i>	•		•		•									•			
<i>Ganoderma lucidum</i>	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		•
<i>Ganoderma oregonense</i>	•				•				•		•			•	•		
<i>Grifola frondosa</i>	•				•	•	•	•			•			•			•
<i>Hericium erinaceus</i>	•		•		•										•		
<i>Inonotus obliquus</i>	•		•		•	•		•			•		•				
<i>Lentinula edodes</i>	•				•	•	•	•		•	•	•	•			•	•
<i>Phellinus linteus</i>	•		•			•											
<i>Piptoporus betulinus</i>	•		•			•					•						
<i>Pleurotus ostreatus</i>	•					•	•		•	•					•		
<i>Polyporus sulphureus</i>	•																
<i>Polyporus umbellatus</i>	•		•		•	•					•		•	•			
<i>Shizophyllum commune</i>					•	•											
<i>Trametes versicolor</i>	•			•	•	•					•	•	•				

Rezultati proučavanja bioloških aktivnosti polisaharida izolovanih iz bazidiomiceta ukazuju na svojstvo ovih polimera da mobilišu humoralni imunitet organizma sa ciljem zaštite od virusnih, bakterioloških ili parazitskih infekcija (uključujući mikrogljive) otpornih na antibiotike. Mnogi pacijenti sa kancerom i AIDS-om umiru od oportunističkih infekcija usled imunodisfunkcije. Kada se koristi u kombinaciji sa azidotidiminom (AZT), lentinan potiskuje površinsku ekspresiju HIV virusa na T-ćelijama, u znatno većem stepenu u odnosu na AZT (Wasser i Weis, 1999). Lentinan i sulfonovani lentinan su pokazali jaku anti-HIV aktivnost, što je rezultiralo inhibicijom virusne replikacije i ćelijske fuzije. Po medicinskim protokolima, AIDS terapija mora da sadrži strategiju pojačavanja imunog sistema, tabela 2.3. Polisaharidni ekstrakt micelijuma (LEM) gljive *Shiitake* takođe je koristan u lečenju AIDS-a. Potvrđeno je da LEM usporava HIV infekcije humanih T-ćelija i potencira efekte AZT-a kod virusnih replikacija *in vitro*. Mehanizam tog dejstva nije još poznat, ali je utvrđeno da ovaj ekstrakt aktivira makrofage i stimuliše proizvodnju interleukina 1 (Wasser i Weis, 1999).

**Tabela 2.3.** Antivirusni, antibakterijski i antiparazitski efekti lentinana i njegovih derivata.  
\*LEM- polisaharidni ekstrakt micelija *L. edodes* (Wasser i Weis, 1999)

Infekcije	Polisaharid	Efekti
<b>Virusi</b>		
<b>Andenovirus Tip 12</b>	Lentinan	Antitumorno
<b>Abelson virus</b>	Lentinan	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b>VSV-encephalitis virus</b>	Lentinan	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b>Herpes simplex I i II</b>	Lentinan	Povećana otpornost
<b>Human immunodeficiency virus (HIV-I)</b>	Lentinan i Lentinan sulfat	U kombinaciji sa AZT Sprečeno inficiranje
<b>HIV</b>	*LEM	U kombinaciji sa AZT sprečeno inficiranje
<b>Bakterije</b>		
<b><i>Bacillus subtilis</i></b>	Lentinan	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b><i>Mycrobacterium tuberculosis</i></b>	Lentinan	Povratna prevencija
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	Lentinan	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b><i>Staphylococcus japonicum</i></b>	Lentinan	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b>Paraziti</b>		
<b><i>Schistosoma mansoni</i></b>	Lentinan	Inhibicija <i>in vivo</i>
<b><i>Schistosoma japonicum</i></b>	Lentinan	Inhibicija <i>in vivo</i>
<b><i>Mesecostoides corti</i></b>	Lentinan	Formacija granuloma
<b>Gljive</b>		
<b><i>Candida albicans</i></b>	Lentinan sulfat	100% izlječenje <i>in vivo</i>
<b><i>Trichophyton spp.</i></b>	Lentinan sulfat	100% izlječenje <i>in vivo</i>

Polisaharidi iz različitih vrsta gljiva u znatnoj meri mogu da spreče napad virusa ili da utiču na jačanje imunog sistema organizma u borbi sa virusima parainfluence i rinovirusima (virusi prehlade), herpes simplex i herpes zoster virusima, citomegalovirusom, Epstein-Barr virusom (izaziva infektivnu mononukleozu), virusima hepatitisa (Jong i Donovick, 1990; Sarkar, 1993).  $\beta$ -glukani viših gljiva se danas koriste u lečenju dermatitisa, kao i bakterijske infekcije stopala kod sportista (Laroche i Michaud, 2007).



**Slika 2.1.** Dijetetski suplementi  $\beta$ -glukana (A); Krema za zaštitu kože na bazi  $\beta$ -glukana (B); [www.SupplementSpot.com](http://www.SupplementSpot.com), Cutting-Edge Natural Health & Anti-Aging Products

Većina aktivnih polisaharida gljiva, u vodi rastvornih kao i nerastvornih, mogu se klasifikovati kao dijetetska vlakna ( $\beta$ -glukani, hitin, različiti heteropolisaharidi). Dijetetska vlakna gljiva koja humani organizam ne može da digestuje, a ni da apsorbuje, štite sluzokožu creva od štetnih supstanci, a istovremeno su dobra podloga (prebiotici) za stimulisanje rasta korisnih bakterija koje su već prisutne u gastro-intestinalnom traktu (probiotici), što zajedničkim delovanjem sprečava nastanak i razvoj dijabetesa, arterioskleroze, hipertenzije i tromboze.  $\beta$ -glukani i hitinske supstance sa tumoricidnom aktivnošću apsorbuju opasne materije, karcinogene supstance, i na taj način sprečavaju njihovu apsorpciju u intestinumu, a istovremeno ubrzavaju njihovo izlučivanje

(laksativno dejstvo). Navedeni efekat se objašnjava karakteristikom ovih makromolekula da formiraju želatinozne mrežaste strukture što ima za posledicu promenu gastrointestinalne viskoznosti (Laroche i Michaud, 2007). Dijetetska vlakna stoga efikasno deluju na prevenciju kancera kolona (Mizuno, 1996). Preparati na bazi dijetetskih vlakana koja su izolovana iz raznih vrsta gljiva danas u svetu donose prihode od oko 5-6 milijardi dolara godišnje, slika 2.1. (Mizuno, 1996; Wasser, 2002).

U svetu se povećava broj novih registrovanih patenata na bazi polisaharida viših gljiva. Tako se od 2003. godine šizofilan, kurdlan, lentinan i skleroglukan koriste kao vezujući agensi nukleinskih kiselina. Nastali kompleksi polisaharida (glukana) i nukleinskih kiselina koriste se kao vektori. Ovakvi kompleksi ispoljavaju otpornost prema nukleazama i služe kao zaštitne strukture nukleinskih kiselina (Laroche i Michaud, 2007).

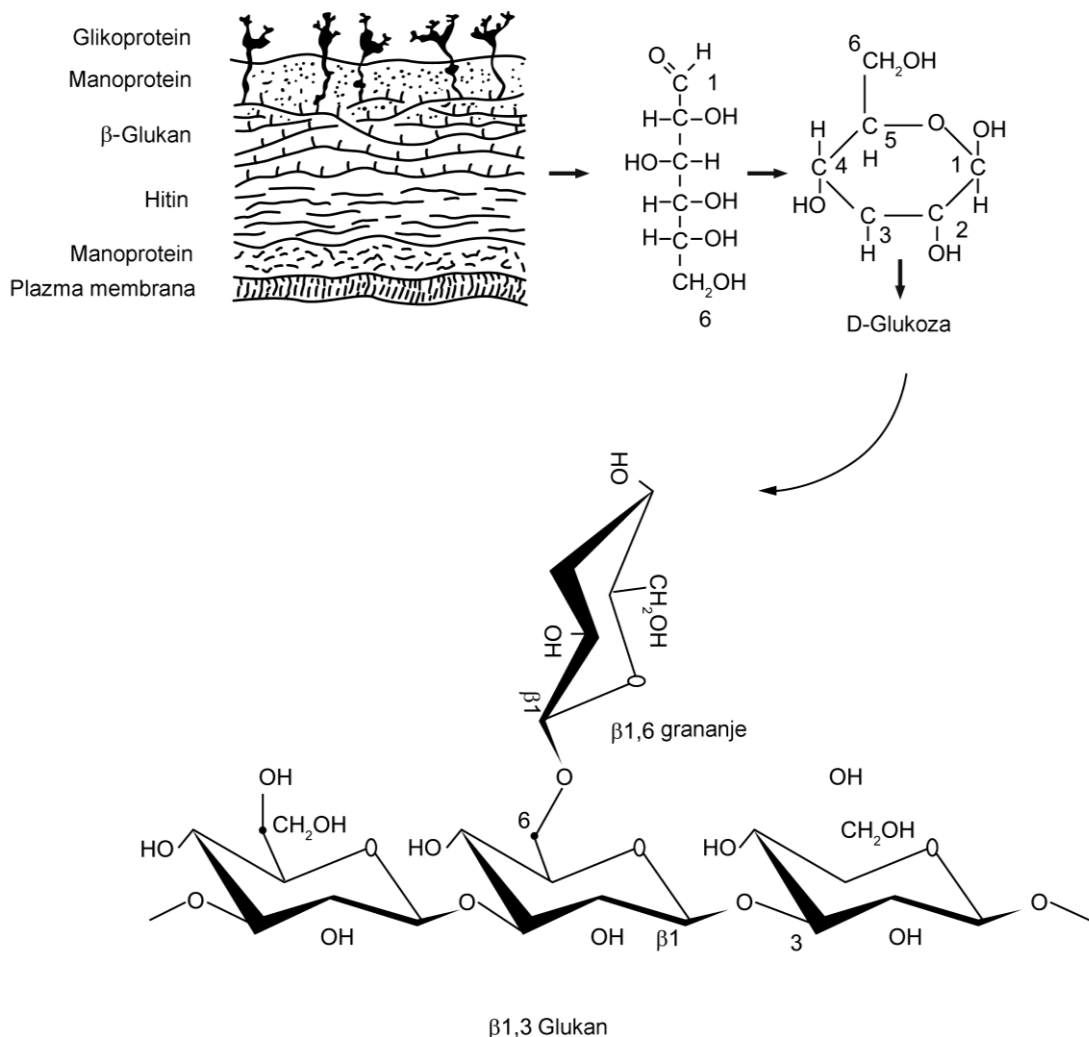
$\beta$ -glukani viših gljiva imaju primenu u kozmetičkoj industriji kao zaštitne kreme koje sprečavaju iritaciju i bolesti kože. Takođe se koriste i u zaštiti kože od ultravioletnog zračenja, slika 2.1.

## 2.2. STRUKTURA BIOLOŠKI AKTIVNIH POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA

Mnoge, ako ne i sve bazidiomicete, sadrže biološki aktivne polisaharide. Danas je poznato oko 650 vrsta i 7 interspecifičnih taksona iz 182 roda viših hetero- i homobazidiomiceta koje sadrže farmakološki aktivne polisaharide, a koji se mogu izolovati iz karpofora, micelijuma ili bujona u kome je gajen micelijum. Generalno može da se zaključiti da je broj strukturno različitih polisaharida koji su do sada izolovani iz plodonosnih tela bazidiomiceta veći u odnosu na strukturnu raznolikost polisaharida iz drugih izvora (Wasser, 2002).

Biološki aktivni polisaharidi bazidiomiceta imaju jedinstvenu strukturu koja je specifična za svaku vrstu. Na primer, proteoglukan krestin dobijen je u Japanu iz vrste *Trametes (Coriolus) versicolor* CM-101, dok je proteoglikan, nazvan polisaharid-peptid (PSP), dobijen iz submerzno gajene iste gljive u Kini iz podroda Cov-1 iste vrste. Oba proteoglukana imaju istu polisaharidnu komponentu, ali su različite peptidne komponente vezane za polisaharidni deo (Hiroshi i Takeda, 1993).

U poredjenju sa drugim biopolimerima kao što su proteini i nukleinske kiseline, polisaharidi imaju najveći kapacitet za prenos bioloških informacija zbog svoje velike potencijalne strukturne varijabilnosti. Nukleotidi u nukleinskim kiselinama i aminokiseline kod proteina međusobno se povezuju samo na jedan način, dok monosaharidne jedinice u polisaharidima mogu da se međusobno povezuju preko više različitih položaja, čime se formira širok varijetet razgranatih ili linearnih struktura (Sharon i Lis, 1993). Veliki potencijal varijabilnosti kod polisaharidnih struktura daje neophodnu fleksibilnost kod preciznih regulatorskih mehanizama različitih interakcija koje postoje između ćelija kod viših organizama.



**Slika 2.2.** Struktura ćelijskog zida gljiva;  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)(1 $\rightarrow$ 6) glukan, dužina i način grananja  $\beta$ -glukana kod različitih gljiva se značajno razlikuju (Chan et al., 2009.)

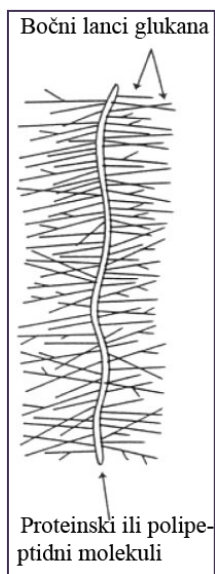
Po svojoj hemijskoj strukturi biološki aktivni polisaharidi viših gljiva su  $\beta$ -D-glukani koji zajedno sa molekulima hitina, celuloze i glikoproteina izgrađuju ćelijski zid viših gljiva, slika 2.2. Ovi molekuli se takođe mogu naći kod bakterija, kvasaca, algi i u različitim cerealijama, kao što su ovas i ječam. Izgrađeni su od monomernih jedinica glukoze koje su međusobno povezane  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ili  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glikozidnim vezama. U ćelijskom zidu viših gljiva najzastupljeniji su glukani na čijem se osnovnom nizu, izgrađenom od molekula glukoze koji su međusobno vezani  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)- ili  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glikozidnom vezom ili sa oba tipa veze, nalaze raspoređeni bočni lanci povezani  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) glikozidnim vezama, slika 2.2.

Najviše proučavan glukan iz viših gljiva je lentinan iz gljive *Lentinula edodes*. Osnovu ovog molekula čini glavni niz izgrađen od molekula glukoze povezanih  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glikozidnim vezama. Jedan deo glukoznih jedinica iz osnovnog niza je supstituisan preko položaja O-6 sa bočnim lancima koji su međusobno vezani  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glikozidnim vezama. Molekulska masa lentinana je približno 500 kDa, stepen grananja 0,40 (2/5)<sup>1</sup>, u vodenim rastvorima zauzima konformaciju trostrukog heliksa (Sasaki i Takasuka, 1976.). Među biomodulatornim polisaharidima čije su struktura i uloga danas detaljno proučene nalaze se i grifolan iz gljive *Grifola frondosa*, šizofilan iz gljive *Schizophyllum commune*, *Sclerotonia sclerotiorum* glukan (SSG), PSK i PSP iz gljive *Coriolus versicolor*.

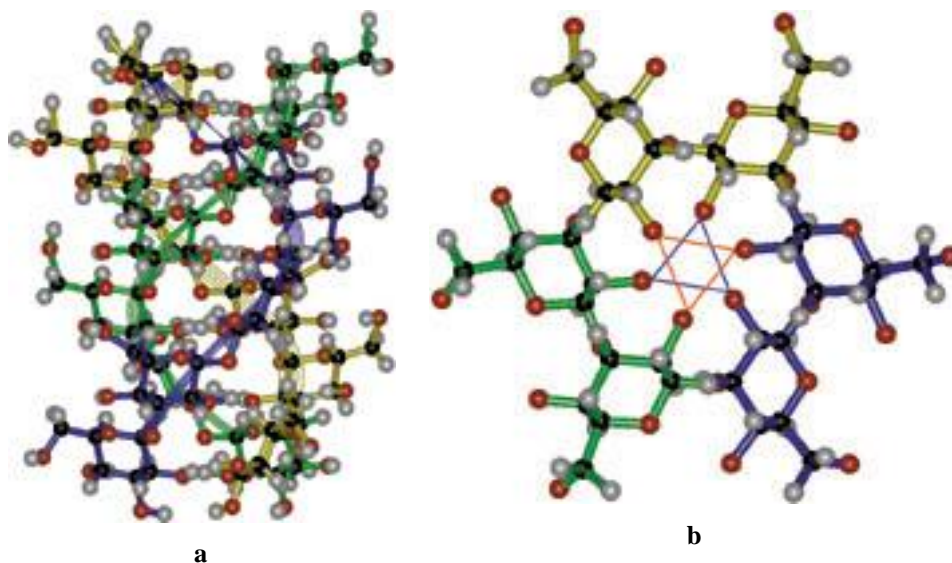
Za molekule  $\beta$ -D-glukana mogu biti vezani i neki drugi molekuli šećera kao što su manoza, ksiloza, galaktoza ili uronske kiseline, a takođe i peptidi i proteinski molekuli, slika 2.3. Tako je iz gljive *Ganoderma lucidum* izolovano nekoliko aktivnih heteropolisaharida i njihovih proteinskih kompleksa kao što su: ksiloglukani, ksilomanoglukani,  $\beta$ -glukani koji sadrže uronske kiseline u svojoj strukturi, takozvani LB-NB glukan i drugi aktivni heteropolisaharidi i njihovi proteinski kompleksi. Ispitivanjem njihove strukture primenom spektroskopskih metoda NMR-a kao i difrakcije X zraka, utvrđeno je da ovi makromolekuli imaju konformaciju trostrukog heliksa, slika 2.4.

---

<sup>1</sup> U slučaju lentinana stepen grananja predstavlja broj  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glikozidnih veza bočnog lanca podeljen brojem  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glikozidnih veza glavnog lanca.



**Slika 2.3.** Proteo-glukanski kompleks (Boldizar, 1998)



**Slika 2.4.** 3D struktura glukana, schizophyllan-a: pogled sa strane, b: pogled odozgo (Mizuno, 1999.)

Biomodulatorna aktivnost miko-D-glukana u funkciji je njihovih hemijskih karakteristika, kao što su molekulska masa, stepen grananja, rastvorljivost u vodi i terciarna struktura (Blum i Sarco, 1977; Bohn i Be Miller, 1995).

### 2.2.1. UTICAJ STRUKTURE POLISAHARIDA NA BIOLOŠKU AKTIVNOST GLJIVA

Iako je teško napraviti korelaciju između strukture i antitumornog dejstva polisaharida gljiva, određeni odnos se može ustanoviti. Istraživanja ukazuju da su strukturne karakteristike, kao što su  $\beta$ -(1→3)-glikozidne veze u glavnom lancu glukana i dodatno, bočni lanci povezani  $\beta$ -(1→6)-glikozidnim vezama, neophodne za antitumorno dejstvo.  $\beta$ -glukani koji pretežno sadrže (1→6)-veze u molekulu imaju slabije dejstvo. Glukani većih molekulskih masa imaju izraženije dejstvo u odnosu na glukane sa manjim molekulskim masama (Muzino 1996, 1999). Medjutim, mogu se primetiti očigledne strukturne varijacije kod antitumornih polisaharida. Antitumornu aktivnost mogu da imaju i polisaharidi drugačijih strukturnih karakteristika, kao što su hetero- $\beta$ -glukani, heteroglikani,  $\beta$ -glukan-protein,  $\alpha$ -mano- $\beta$ -glukan,  $\alpha$ -glukan-protein i heteroglikan-proteinski kompleksi (Mizuno et al., 1995; Mizuno et al., 1996; Gao et al., 1996; Zhang et al., 2004).

Poznato je da je konformacija trostrukog heliksa glukana viših gljiva važna u ispoljavanju imunostimulatornog dejstva. Utvrđeno je da se nakon denaturacije lentinana sa dimetil-sulfoksidom, ureom ili natrijum-hidroksidom narušava tercijarna struktura, dok primarna ostaje nepromenjena, pri čemu se inhibitorno dejstvo ovog polisaharida na rast ćelija tumora smanjuje sa progresivnom denaturacijom (Maeda et al., 1988). Rezultati dobijeni ispitivanjem šizofilana potvrdili su korelaciju između antitumornog dejstva i trostruke helikoidne strukture polisaharida (Yanaki et al., 1983, 1986). Glukani viših gljiva pokazuju različite biološke i imuno-farmakološke aktivnosti, od kojih mnoge, kao što su sinteza azot monoksida kod makrofaga i aktivacija limulus faktora G, zavise od konformacije trostrukog heliksa, dok su druge nezavisne od ove konformacije, na primer, sinteza interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) i stimulatornog faktora kolona, što ukazuje da je primarna struktura  $\beta$ -(1→3)-glukana glavnog lanca od veće važnosti nego tercijarna struktura molekula. Za razliku od  $\beta$ -(1→3)-glukana, čija biološka aktivnost zavisi od većih molekulskih masa, koje se nalaze u opsegu od 500 do 2000 kDa (Mizuno, 1996), aktivnost  $\alpha$ -(1→3)-glukuronoksilomanana koji su karakteristični za tzv. žute gljive, ne zavisi od molekulske mase. Polisaharidni ekstrakt gljive *T. fuciformis*, dobijen nakon kontrolisane kisele hidrolize, sadrži glukuronoksilomanane manje molekulske mase, od 53 do 1 kDa, koji stimulišu



monocite na sintezu interleukina-6, podjednako efikasno kao i nehidrolizovani heteropolisaharid. Ovaj podatak ukazuje da dejstvo na monocite može da bude posledica primarne strukture  $\alpha$ -(1→3)-manana glavnog lanca; razlike u molekulskoj masi očigledno nemaju uticaj na aktivnost heteroglikana (Gao et al., 1996).

### **2.2.2. AKTIVACIJA POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA HEMIJSKOM MODIFIKACIJOM**

Postoje različite metode hemijske modifikacije polisaharida gljiva kojima se mogu dobiti najbolje definisani proizvodi za primenu u različitim oblastima. Modifikovani biološki aktivni polisaharidi imaju značajnu primenu na kliničkom nivou, zbog poboljšanih karakteristika kao što su, na primer, povećanje rastvorljivosti u vodenim rastvorima i mogućnost prožimanja zidova digestivnog trakta posle oralnog konzumiranja. Dva osnovna postupka kojima se dobijaju modifikovani polisaharidi gljiva za primenu na kliničkom nivou su modifikacija polisaharida Smith-ovom degradacijom i aktiviranje metodom formolize. Ovi postupci su najuspešnije razvijeni za gljive *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa* i *Leucopaxillus giganteus* (= *Triholoma gigantea*). Karboksimetilovanje je još jedna hemijska metoda koja omogućava dobijanje proizvoda  $\beta$ -glukana rastvornih u vodi, za razliku od njihovih nativnih polimera. (Wasser, 2002).

### **2.2.3. IZOLOVANJE POLISAHARIDA VIŠIH GLJIVA**

Nakon dve decenije intenzivnog istraživanja lekovitih gljiva, razvijeni su pouzdani postupci za efikasno ekstrahovanje, fracionisanje i prečišćavanje polisaharida iz karpofora ili micelijuma. Uopšteno, ova šema obuhvata eliminaciju supstanci malih molekulskih masa pomoću 80% etanola, nakon čega slede ekstrakcije vodom (100 °C, 3h), 2% amonijum-oksalatom (100 °C, 6h) i 5% natrijum-hidroksidom (80 °C, 6h) (Mizuno, 1996; 1999a). Prva ekstrakcija rezultira dobijanjem u vodi rastvorne polisaharidne frakcije, dok su druge dve frakcije polisaharida nerastvorne u vodi. Ekstrahovani polisaharidi se dalje mogu prečišćavati kombinacijom više metoda, kao što su frakciona precipitacija etanolom različite koncentracije, precipitacija pomoću

sirćetne kiseline, jonoizmenjivačka i afinitivna hromatografija, gel filtracija (Wasser, 2002).

### **2.3. REAKTIVNE HEMIJSKE VRSTE I OKSIDATIVNI STRES**

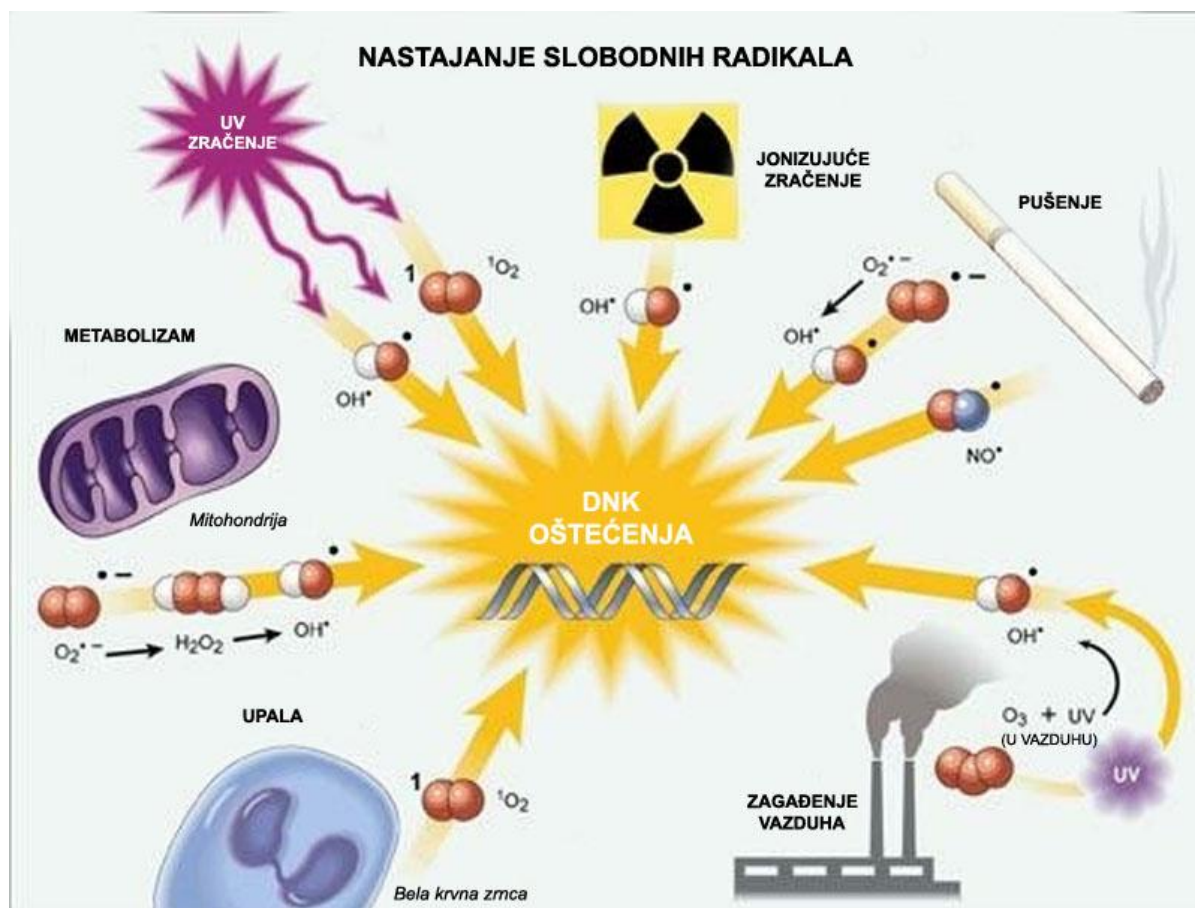
Prisustvo slobodnih radikala (SR) u biološkom materijalu otkriveno je kasnih 50-ih godina prošlog veka. Nešto kasnije, hipoteza Denhama Harmana bila je da kiseonikovi slobodni radikali nastaju kao sporedni produkti u enzimski kontrolisanim reakcijama i opisao ih je kao odgovorne za velika ćelijska oštećenja, mutagenezu, kancer, degenerativne procese (Đukić, 2008).

Pre nekoliko decenija započeto je sa proučavanjem uloge SR, kao finalnih medijatora oštećenja ćelijske funkcije i morfologije, brojnih patofizioloških zbivanja, starenja, trovanja. Slobodni radikali su medijatori mnogih patoloških pojava (*diabetes mellitus*, HIV infekcija, autoimunih, neurodegenerativnih, koronarnih, malignih, plućnih, inflamatornih i mnogih drugih bolesti) i deo su kompleksnog patofiziološkog mehanizma oštećenja ćelija (Ames et al., 1993; Halliwell i Gutteridge, 1984; Papas, 1999; Tiwari, 2004). Jednom pokrenut lanac reakcija SR ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta. Ova propagacija se ogleda u nastanku sekundarnih SR koji nastavljaju da šire kaskadu lančanih reakcija. U reakciji sa biomolekulima SR remete ćelijsku morfologiju, funkciju, jonsku homeostazu i enzimsku aktivnost.

Međutim, SR se u organizmu stalno stvaraju i pri niskim koncentracijama imaju fiziološku funkciju, naime, uključeni su u metabolizam prostaglandina, regulaciju ćelijske signalizacije (stimulišu stvaranje cikličnog guanozin monofosfata-cGMP), aktivaciju ćelijskih receptora, utiču na eritropoezu, imaju bitnu ulogu u kontroli ventilacije (Papas, 1999). U ćelijama imunog sistema (monociti, makrofagi, eozinofili) reaktivne kiseonikove vrste (ROS, eng. *reactive oxygen species*) služe kao agensi za uništavanje virusa i bakterija. Apoptoza ćelija je najčešće indukovana oksidativnim stresom (OS), i ima značaj u homeostazi rasta i razvoja tkiva (Đukić, 2008; Papas, 1999).

Egzogeni izvori slobodnih radikala su konzervansi i hemikalije u hrani, herbicidi i pesticidi, lekovi, razne vrste zagađenja, radijacija, sunčevo zračenje, teški metali

(posebno živa, aluminijum i olovo), alkohol i duvanski dim, trans- i hidrogenizovane masti, slika 2.5.



**Slika 2.5.** Mehanizam nastanka slobodnih radikala  
(<http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/courses/52/posts/4428>)

Aerobne ćelije se štite od toksičnog efekta SR kompleksnim sistemom antioksidativne zaštite (AOS, eng. *antioxidative system*). Antioksidativnu zaštitu sačinjavaju dva segmenta odbrane od štetnih efekata SR: enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, itd.) i neenzimski (peptidi sa SH grupama kao što je glutation i metalotioneini, vitamin E i C, koenzim Q, urea, proteini koji heliraju metale sa promenljivom valencom i brojna druga jedinjenja). Navedene AOS komponente, bilo da su enzimске ili neenzimске, u svom domenu, kako funkcionalno tako prostorno i sa vremenskom odrednicom, deluju zaštitno ili reparativno. S jedne strane, stepen odnosno faza ćelijskog oštećenja (rana ili podmakla) zavisi od tipa i

koncentracije reaktivnih vrsta (RS, eng. *reactive species*), mesta i dužine delovanja, a s druge strane, od energetskog i redoks statusa same ćelije kao i kapaciteta AOS. (Đukić, 2008; Papas, 1999).

### 2.3.1. REAKTIVNE VRSTE

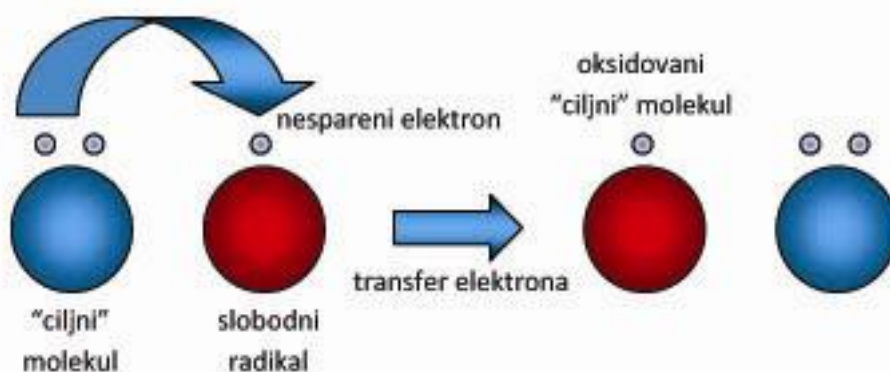
Termin reaktivne vrste (RS) se u literaturi sve više koristi umesto termina SR. S obzirom da su ovim pojmom obuhvaćene sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti, odnosno oksidacioni agensi koji posreduju u oksidativnom/nitrozativnom oštećenju biomolekula i time utiču na nastanak oksidativnog/nitrozativnog stresa, primerenije je da se koristi naziv reaktivne vrste.

Po hemijskoj strukturi RS mogu biti molekuli (npr. vodonik peroksid,  $H_2O_2$ ), joni (npr. peroksinitritni anjon,  $ONOO^-$ ), kao i sami SR. Svakako, SR predstavljaju najznačajniju klasu RS, tabela 2.4.

**Tabela 2.4.** Podela slobodnih radikala (reaktivnih vrsta). U zavisnosti od aktivnog centra u RS oni se dele na RS sa: kiseonikom (ROS, eng. *reactive oxygen species*); azotom (RNS, eng. *reactive nitrogen species*); ugljenikom (RCS, eng. *reactive carbon species*) i sumporom (RSS, eng. *reactive sulfur species*)

	<i>Radikal</i>	<i>Reaktivni neradikaliski derivati</i>
<b>ROS</b>	$O_2^{\cdot -}$ superoksil anjon radikal	$H_2O_2$ vodonik peroksid
	$HO^{\cdot}$ hidroksil radikal	HOCl hipohlorna kiselina
	$ROO^{\cdot}$ peroksil radikal	$O_3$ ozon
	$RO^{\cdot}$ alkoksil radikal	$^1O_2$ singlet kiseonik
	$HOO^{\cdot}$ hidroperoksil radikal	
<b>RNS</b>	$NO^{\cdot}$ nitroksil radikal	$NO_2^-$ azotdioksid anjon
	$NO_2^{\cdot}$ azot dioksid radikal	$N_2O_3$ azot trioksid
		$NO_2^+$ nitronijum (nitril) jon
		$ONOO^-$ peroksinitritni anjon
		ROONO alkil peroksinitrit
		$NO^-$ (singlet) nitroksil anjon
		$NO^+$ nitrozil katjon
		$NO_2Cl$ nitril hlorid
<b>RCS</b>	$R^{\cdot}$ alkil radikal	
	$RO^{\cdot}$ alkoksil radikal	
	$ROO^{\cdot}$ peroksil radikal	
<b>RSS</b>	$RS^{\cdot}$ tiil radikal	
	$GS^{\cdot}$ glutatiil radikal	
	$GSSG^{\cdot -}$ diglutatiil anjon radikal	

Inicijalno stvoreni primarni SR (u endogenim uslovima ili pod dejstvom ksenobiotika) započinju lančane reakcije radikalskog tipa. U reakciji sa supstratom (biomolekul ili neko drugo jedinjenje) odnosno donorom elektrona, SR se redukuju (dobijaju elektron) i gube karakter SR, a supstrat se oksiduje (gubi elektron) i postaje SR druge generacije tzv. sekundarni SR (slika 2.6.) i otpočinje lanac radikalskih reakcija (Goldfarb, 1999).



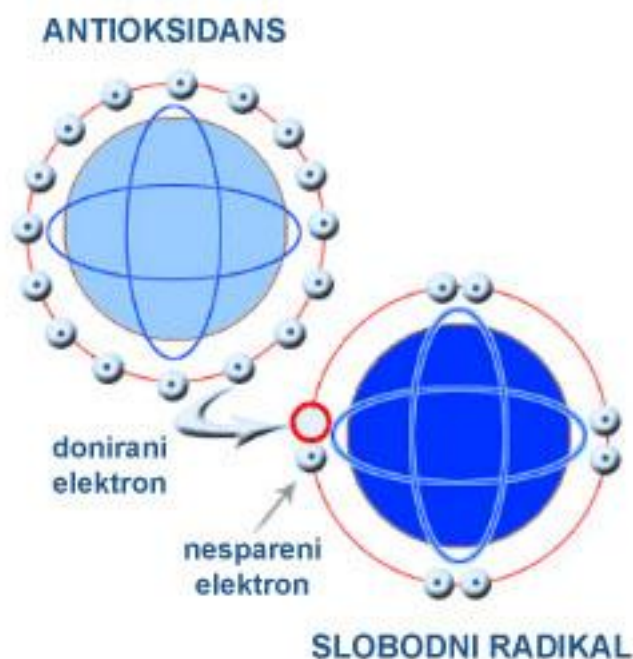
**Slika 2.6.** Mehanizam reakcije slobodnih radikala

Nezavisno od njihove stabilnosti, SR stupaju u reakcije supstitucije, adicije, eliminacije, izomerizacije, rekombinacije i disproporcijacije (slobodnoradikalne reakcije). Slobodni radikali lako i brzo reaguju sa svim klasama biomolekula iz okruženja, lipidima, proteinima, DNK, što za posledicu ima oštećenje sveukupne ćelijske funkcije (De la Fuente, 2002; Papas, 1999).

Pored toga, oni su u velikim količinama prisutni i u prehrambenim proizvodima i imaju značajnu ulogu u mnogim reakcijama koje se u njima odvijaju. U mnogim prehrambenim proizvodima dolazi do oksidacije kada nezasićene masne kiseline reaguju sa kiseonikom formirajući slobodne radikale i sporedne proizvode kao što su aldehidi, ketoni, kiseline i alkoholi, što dovodi do opadanja kvaliteta, promene boje, ukusa, mirisa i teksture, kao i gubitka hranljive vrednosti, što je povezano sa užglošću (Halliwell i Gutteridge, 1999; Becker, 1993).

## 2.4. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA - ANTIOKSIDANSI

Antioksidans je svaki molekul koji se sam oksiduje i na taj način štiti od oksidativnih oštećenja ćelije i tkiva u organizmu ili osetljive komponente u prehrambenom proizvodu. Aktivnost antioksidanasa sastoji se u tome što neutrališe slobodni radikal tako što mu predaje svoj elektron, čime slobodni radikal postaje stabilan, slika 2.7. Na ovaj način antioksidans prekida lančanu reakciju oksidacije, tako da ona više ne predstavlja opasnost za ćelije i tkiva. Kada antioksidans preda elektron on, po definiciji, postaje slobodni radikal. Međutim, antioksidans u ovom stanju ne predstavlja opasnost jer ima sposobnost da se prilagodi promeni broja elektrona, a da pri tome ne postane reaktivan. Antioksidansi deluju na tri različita načina: oni mogu da snize energiju slobodnih radikala, spreče njihovo nastajanje ili prekinu lančanu reakciju oksidacije (Đukić, 2008).



**Slika 2.7.** Antioksidans neutrališe slobodni radikal  
(<http://supa.pharmacy.bg.ac.rs/courses/52/posts/4428>)

S obzirom da mehanizmi zaštite od destruktivnog delovanja slobodnih radikala (poglavlje 2.3.) neminovno slabe sa starenjem, neophodno je konstantno snabdevanje organizma prirodnim antioksidansima kako bi se što više redukovala oksidativna oštećenja. Prirodni antioksidansi, kao što su vitamini (A, E, C), minerali (Se, Zn), proteini (transferin, ceruloplazmin, albumin), glutation i polifenoli imaju svojstvo da hvataju slobodne radikale i tako inhibiraju oksidativne mehanizme koji dovode do degenerativnih bolesti (Niki et al., 1994). Zbog toga je neophodno da se antioksidansi, kao protektivni agensi, u organizam unose i hranom.

Istraživanja, kao i kliničke studije, ukazuju da ishrana bogata hranom biljnog porekla, kao što je voće, povrće, žitarice, klice, čajevi, crveno vino i sokovi, obezbeđuje zaštitu od različitih bolesti, među kojima su kancer i kardio-cerebrovaskularne bolesti. Najviše antioksidativnih komponenti u tipičnoj ishrani biljnog porekla pripada različitim klasama fenolnih jedinjenja sa različitim fizičkim i hemijskim karakteristikama. Fenolne kiseline, polifenoli i flavonoidi u voću i povrću imaju svojstvo da hvataju slobodne radikale, čime inhibiraju oksidativne mehanizme koji dovode do degenerativnih bolesti, zbog čega se smatraju kao osnovne komponente koje povoljno utiču na zdravlje (Prakash, 2001; Moure et al., 2001). Ova jedinjenja spadaju u grupu neesencijalnih dijetetskih komponenti koje se dovode u vezu sa inhibicijom ateroskleroze i kancera. Bioaktivnost fenola može da bude u vezi sa njihovom sposobnošću da heliraju metale, inhibiraju lipoksigenaze i hvataju slobodne radikale (Kedage i sar., 2007; Tabart et al., 2009). Neki autori u svojim istraživanjima ističu da je antioksidativna aktivnost hrane biljnog porekla u korelaciji sa sadržajem kompleksa koje čine fenolna jedinjenja sa ligninima i arabinoksilanima. Ovakvi kompleksi kod ječma i slada su pokazali dva puta veću antioksidativnu aktivnost nego ekstrakt slobodnih fenolnih jedinjenja iz istog materijala (Maillard i Berset, 1995; Maillard et al., 1996). Drugi autori smatraju da antioksidativna aktivnost kore i ekstrakta semena citrusnog voća nije u direktnoj vezi sa slobodnim ili vezanim fenolnim jedinjenjima (Bocco et al., 1998).

Nekoliko kategorija antioksidanasa, u koje spadaju fenolna jedinjenja, vitamini, proteini, peptidi i amino kiseline, imaju široku industrijsku primenu u proizvodnji dijetetskih suplemenata. Ova jedinjenja takođe imaju primenu kao konzervansi u hrani i kozmetici (Imlay, 2003). U 2007. godini u Sjedinjenim Američkim Državama, aditivi i

suplementi na bazi antioksidanasa su ostvarili profit od 3,7 biliona dolara, sa prosečnom tendencijom rasta od 3% godišnje (Finley et al., 2011). Identifikacija novih antioksidanasa ostaje veoma aktuelna istraživačka oblast.

#### 2.4.1. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA GLJIVA

U savremenim uslovima proizvodnje velikih količina hrane koja treba da se održi što duže vreme, za stabilizaciju čitavog niza prehrambenih proizvoda koriste se različiti sintetički antioksidansi. Najčešće se koriste butilovani hidroksianizol (BHA), butilovani hidroksitoluen (BHT) i tercijarni-butilovani hidroksihinon (TBHQ), koji se dodaju prehrambenim proizvodima kako bi se sprečile oksidativne promene masti i ulja (Lörliger, 1991). Kako neka istraživanja pokazuju da BHA i BHT mogu da budu antikancerogena, kao i kancerogena jedinjenja pod određenim okolnostima (Ames et al., 1993), postaje sve interesantnija potencijalna primena prirodnih antioksidanasa iz bilja i začina za sprečavanje oksidacije prehrambenih proizvoda i kao nutraceutika. Izbor odgovarajućih antioksidanasa kao aditiva i suplemenata hrani je važan zbog stroge kontrole od strane zakonodavstva o bezbednosti hrane.

Novija istraživanja pokazuju da pored različitih biljaka i gljive predstavljaju vrlo značajne izvore antioksidativnih komponenti. Neke jestive gljive, kao što su *Agaricus bisporus*, *Grifola frondosa*, *Hericiium erinaceus*, *Flammulina velutipes*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* i *Pleurotus ostreatus* imaju značajnu antioksidativnu aktivnost kao i sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Fu et al., 2002). Ovakva svojstva dokazana su i kod medicinski važnih gljiva kao što su *Agaricus brasiliensis*, *Sparassis crispa*, *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* i *Inonotus obliquus*. Smatra se da je antioksidativna sposobnost gljiva povezana sa sadržajem fenolnih komponenti u njihovim ekstraktima (Cheung et al., 2003; Fu et al., 2002; Elmastas et al., 2007; Puttaraju et al., 2006; Song i Van Griensven, 2008). Opšte je prihvaćeno da ekstrakti gljiva sadrže više komponenti, od kojih svaka ima svoj biološki efekat. Tako vodeni ekstrakti gljiva sadrže različite polisaharide, fenolna jedinjenja i proteine, kao što su lektini. Gljive takođe akumuliraju niz različitih sekundarnih metabolita, u koje pored fenola, spadaju i poliketidi, terpeni i steroidi (Turkoglu et al., 2007). Mnoga istraživanja



ukazuju na to da način ekstrakcije, odnosno vrsta primenjenog ekstrakcionog sredstva direktno utiče na antioksidativna svojstva gljiva.

Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da antioksidansi prisutni u gljivama predstavljaju veoma interesantne protektivne agense koji mogu da doprinesu redukciji oksidativnih oštećenja, bez sporednih neželjenih reakcija.

## 2.5. ANTIMIKROBNA DEJSTVA

U novije vreme sve veći problem postaje otpornost mikroorganizama na antibiotike koji se već dugo primenjuju za profilaksu i tretiranje infektivnih bolesti. Zbog toga se stalno ispituju nove antimikrobne supstance koje mogu da se izoluju ne samo iz mikroorganizama već i iz različitih biljaka, a koje bi imale sposobnost da mobilišu humoralni imuni sistem organizma da se bori protiv virusa, bakterija, gljiva i protozoa koje su rezistentne na aktuelne antibiotike. Ovo povećano interesovanje za lekove biljnog porekla je danas veoma aktuelno zbog rasprostranjenog uverenja da je "Zeleni lek" bezbedan i pouzdan više nego skupi sintetički lekovi, od kojih mnogi imaju i neželjene propratne efekte.

Ovakva situacija pruža podsticaj za ispitivanja novih antimikrobnih supstanci iz različitih prirodnih izvora, kao što su lekovito bilje i gljive (Karaman et al., 2003). Danas postoji obnovljen interes za tradicionalnu medicinu, kao i povećan broj istraživanja usmerenih na pronalaženje novih antimikrobnih lekova iz gljiva.

### 2.5.1. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA GLJIVA

Otkriće "ledenog čoveka" u italijanskim Alpima, za koga je utvrđeno da je živeo pre 5300 godina, donelo je nove, intrigantne podatke o upotrebi gljiva u drevnim vremenima. Među njegovim stvarima pronađen je i niz gljive *Piptoporus betulinus*, koja pripada poliporama, a koja je parazit breze. Ova gljiva je korišćena kao kresivo za paljenje vatre, kao lek za tretiranje rana i za pravljenje čaja koji jača organizam i stimuliše imuni sistem (Hobbs, 1995; Stamets, 2005). Pored toga, utvrđeno je da ima i širok spektar antimikrobne aktivnosti (Suay et al., 2000).

Istraživanja pokazuju da su gljive izuzetno važni izvori prirodnih antibiotika. Najznačajniji antibiotici dobijaju se iz gljiva, kao što su penicilin, streptomycin, hloramfenikol i vankomicin (Griffin, 1994). Međutim, infekcije izazvane multirezistentnim sojevima, kao što su *Candida spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* i dr., ukazuju na potrebu za pronalaženjem novih antibiotika sa drugačijim načinom delovanja (Kotra i Mobashery, 1998).

Sa razvojem novih tehnologija fermentacije i prečišćavanja, gljive su postale interesantne kao potencijalni izvori novih klasa antibiotika. Prva ispitivanja mogućnosti korišćenja bazidiomiceta kao izvora antibiotika sprovedli su Anchel, Hervey i Wilkins, 1941. godine, testiranjem ekstrakata iz plodonosnih tela i micelijuma preko 2000 vrsta gljiva (Sandven, 2000). Godine 1950. izolovan je i identifikovan pleuromutilin (Kavanagh et al., 1950), diterpen koji je posebno pogodan za tretiranje infekcija izazvanih mikoplazmama kod životinja (Brizuela et al., 1998), a korišćen je za razvoj prvog komercijalnog antibiotika poreklom iz bazidiomiceta. Biološki aktivan metabolit iz gljive *M. scorodonius*, skorodonin, u većim koncentracijama inhibira rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Anke et al., 1981). Iz gljive *M. alliaceus* su izolovana dva antimikrobna i citotoksična metabolita, nazvana aliakol A i B (Anke et al., 1981). Marasminska kiselina izolovana iz gljive *M. conigenus* ima antibakterijska, antifungalna, citotoksična i fitotoksična svojstva (Abraham, 2001). Gljiva *Trametes spp.* sadrži antibiotik koriolin koji inhibira Gram-pozitivne bakterije, kao i *Trichomonas vaginalis* (Ying et al., 1987). Jedan od prvih antibiotika pronađenih kod gljive *P. sanguineus* bio je cinabarin. Antimikrobna aktivnost ovog antibiotika je testirana na 11 vrsta bakterija izolovanih iz prehrambenih proizvoda. Utvrđeno je da su najosetljiviji na cinabarin bili *Bacillus cereus* i *Leuconostoc plantarum*, dok je najmanje osetljiva bila bakterija *Klebsiella pneumoniae* (Smania et al., 1998).

Gljiva *Armillariella mellea* pokazala je antibakterijsko delovanje *in vitro* na patogene bakterije *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Bacillus subtilis*, dok armilarinska kiselina izolovana iz ove vrste inhibira Gram-pozitivne bakterije i kvasce (Obuchi et al., 1990).

Evropska vrsta gljive *Ganoderma pfeifferi* proizvodi seskviterpenoid hidrohinon, nazvan ganomicin, koji ima svojstvo da inhibira rast meticilin rezistentne bakterije *Staphylococcus aureus*, kao i nekih drugih bakterija (Mothana et al., 2000).

Gljive sintetizuju antibakterijske i antifungalne komponente koje im pomažu da prežive u svojoj prirodnoj sredini. Te komponente, sa jačim ili slabijim antimikrobnim efektima, određenim postupcima mogu da se izoluju iz različitih vrsta gljiva i da se koriste u farmaciji i medicini (Lindequist et al., 1990).

I novija ispitivanja na različite načine izolovanih ekstrakata iz gljiva pokazuju njihovu značajnu antimikrobnu aktivnost (Gao et al., 2005; Kim i Fung, 2004; Mercan et al., 2006; Turkoglu et al., 2006; Hirasawa et al., 1999; Lee et al., 1999). Hloroformski i etilacetatni ekstrakti suvih gljiva deluju antibakterijski na vrste *Streptococcus mutans* i *Prevotella intermedia* (Hirasawa et al., 1999).

Eksudat iz micelijuma *Cordyceps nipponica* ima izraženo dejstvo na *Plasmodium falciparum*, protozou koja izaziva malariju (Isaka et al., 2001).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da gljive predstavljaju izuzetno bogat izvor velikog broja novih antimikrobnih supstanci koje imaju svojstvo da inhibiraju mikroorganizme otporne na uobičajene antibiotike.

## 2.6. ODABRANE VRSTE GLJIVA

Na osnovu obimnih literaturnih rezultata koji su pokazali da polisaharidni ekstrakti izolovani iz ćelijskog zida gljiva iz klase *Basidiomycetes* imaju veoma interesantna biološka svojstva, u ovom radu ispitivana su antioksidativna i antimikrobna svojstva, kao i korelacije između antioksidativnih i antimikrobnih aktivnosti i strukturnih karakteristika polisaharidnih ekstrakata iz odabranih vrsta bazidiomiceta: *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Phellinus linteus* i *Trametes versicolor*.

### 2.6.1. AGARICUS BISPORUS

*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach je jedna od najviše uzgajanih jestivih gljiva u svetu, slika 2.8. Poznata je pod imenom bela gljiva, stona gljiva ili šampinjon

(*champignon de Paris*). Prvi put počinje da se komercijalno gaji u 17. veku u Francuskoj, u okolini Pariza. Sjedinjene Američke Države su najveći svetski uzgajivači ove gljive. Godišnji prihod od proizvodnje gljive *A. bisporus* u ovoj zemlji iznosi oko 800 miliona dolara. Šampinjon raste u svim delovima sveta na nađubrenom zemljištu, travi, blizu četinara. Uspeva u toku cele godine, izuzev zimi, ako su uslovi vlažnosti odgovarajući.

*Agaricus bisporus* je gljiva poznata kao bogat izvor selena, bakra, gvožđa, natrijuma, fosfora, vitamina B<sub>2</sub>, pantotenske kiseline i niacina. Dobar je izvor magnezijuma, cinka, vitamina B<sub>1</sub> i B<sub>6</sub>, proteina i dijetetskih vlakana. Posедуje antioksidativna i antikancerogena svojstva. Danas se sve više ispituje primena ove gljive u prevenciji astme, artritisa, Alchajmerove bolesti kao i kardiovaskularnih oboljenja. Utiče na regulaciju metaboličkih procesa. Deluje antistresno, utiče na proces snižavanja nivoa holesterola u krvi (Beelman et al., 2003.).



Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: *Basidiomycota*

Klasa: *Agaricomycetes*

Podklasa:

*Homobasidiomycetidae*

Red: *Agaricales*

Familija: *Agaricaceae*

Rod: *Agaricus*

Vrsta: *Agaricus bisporus*

**Slika 2.8.** *Agaricus bisporus*  
(<http://www.svims.ca/council/illust>)

Polisaharidni ekstrakti *A. bisporus* dobijeni termičkim tretmanom vrelom vodom inhibiraju rast ćelija implantiranog tumora Sarkoma 180 kod miševa i Erlich-ov karcinom ćelija u 90-100% slučajeva. Bazni ekstrakt ove gljive takođe ispoljava snažno antitumorno dejstvo kod miševa sa implantiranim tumorom. Pojedine komponente ekstrakata dobijenih termičkim tretmanom vrelom vodom gljive *A. bisporus* inhibiraju aktivnost aromataza (Beelman et al., 2003.). Aromataza/estrogen sintetaza ima odlučujuću ulogu u procesu regulacije proliferacije tumora dojke kod žena.

Vodeni ekstrakt *A. bisporus* je okarakterisan genoprotektivnim svojstvom, odnosno ima ulogu u prevenciji oštećenja DNK ćelija koja su nastala pod uticajem reaktivnih kiseonikovih jedinjenja. Utvrđeno je da ovo svojstvo potiče od enzima tirozinaze koji je prisutan u ekstraktu.

*A. bisporus* sadrži velike količine L-ergotioneina, antioksidansa. Količina L-ergotioneina je u plodonosnom telu ove gljive i do 12 puta veća nego u zrnu pšenice, a 4 puta je veća u odnosu na njegov sadržaj u pilećoj jetri (Beelman et al., 2003).

### 2.6.2. AGARICUS BRASILIENSIS

*Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (syn. *Agaricus blazei* Murill) je prvi put otkrivena 1960. godine u planinskoj oblasti brazilskog grada Piedade u državi Sao Paulo, slika 2.9. Od 1965. godine ova vrsta se zbog svojih interesantnih medicinskih svojstava intenzivno uzgaja u Japanu. "Cogmelo de Deus", "Cogmelo do Sol" kako je još nazvana u Brazilu i "Himematsutake" u Japanu je saprofitna gljiva koja raste na travi i organskom đubrivu u proleće i jesen, u uslovima velike vlažnosti, povišenih temperatura i dobre provetrenosti.



Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: *Basidiomycota*

Klasa: *Agaricomycetes*

Red: *Agaricales*

Familija: *Agaricaceae*

Rod: *Agaricus*

Vrsta: *Agaricus brasiliensis*

Slika 2.9. *Agaricus brasiliensis*

Klinička istraživanja potvrdila su da biološki aktivne komponente ove gljive imaju antitumorno, antivirusno i imunomodulatorsko dejstvo.  $\beta$ -glukani i glukon-proteinski

kompleksi gljive *A. brasiliensis* imaju svojstvo kontrole rasta i smanjenja proliferacije tumorskih ćelija. Steroidi, nukleinske kiseline, lipidi i lektini ove gljive sprečavaju multiplikaciju tumorskih ćelija (Dong et al., 2002.). *A. brasiliensis* ima uticaj na procese koji regulišu smanjenje nivoa glukoze u krvi i snižavanje nivoa holesterola. Primenjuje se u lečenju dijabetesa, hipertenzije i hepatitisa.

Velika pažnja se posvećuje istraživanjima biološki aktivnih polisaharida i polisaharidno-proteinskih kompleksa *A. brasiliensis*. Ove supstance imaju svojstvo stimulacije sinteze interferona i interleukina od strane ćelija imunog sistema i time indirektno utiču na sprečavanje proliferacije tumorskih ćelija. Kao veoma efikasni izolovani kompleksi pokazali su se u lečenju tumora debelog creva, jajnika, dojke, pluća, jetre, kao i tumora kože. Potvrđeno je njihovo antivirusno delovanje, naročito u prevenciji nazeba i gripa. Utvrđeno je da biološki aktivne komponente *A. brasiliensis* imaju pozitivno dejstvo na izdržljivost organizma kao i na nervni sistem (Sorimachi et al., 2001.; Wasser et al., 2005.).

Preparati ove gljive se prodaju u vidu kapsula, ekstrakta i ampula (slika 2.10.).



**Slika 2. 10.** Preparati polisaharidnog ekstrakta gljive *A. brasiliensis*  
<http://photobucket.com/images/Agaricus+Blazei/>

#### 2.6.4. GANODERMA APPLANATUM

*Ganoderma applanatum* (Persoon) Patouillard je nejestiva gljiva, tvrde, drvenaste strukture, sa izuzetno važnim biološkim svojstvima, slika 2.11. Poznata je i pod imenom "artist`s conk" ili "umetnikova školjka", zbog mogućnosti da se grebanjem po belim



porama sa donje strane šešira pojavi braon boja hifa, što su umetnici iskoristili za pravljenje crteža. Poreklo imena ove gljive potiče od grčkih reči "gano" što znači sjajan, "derma" što znači koža i "aplanatum" što znači ravan, spljošten. *G. applanatum* raste kao parazit na zdravim, bolesnim, ili oštećenim stablima bukve, topole, hrasta, vrbe, jove, jabuke, bresta, kestena, oraha ili na mrtvim stablima, panjevima, korenju ili granama, kao saprofit. Plodonosna tela mogu da budu pojedinačna, ali su češće u manjim grupama. Ovo je kosmopolitska gljiva, raste širom sveta, u skoro svim klimatskim zonama, pa i u tropskim, na svim kontinentima osim Antarktika (Kirk et al., 2008). Najčešće raste na listopadnom drveću, mada se ponekad može naći i na četinarima.



Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: *Basidiomycota*

Klasa: *Basidiomycetes*

Red: *Polyporales*

Familija: *Ganodermataceae*

Rod: *Ganoderma*

Vrsta: *Ganoderma applanatum*

**Slika 2.11.** *Ganoderma applanatum*

[http://www.scmsfungi.org/fungi/ganoderma\\_applanatum.htm](http://www.scmsfungi.org/fungi/ganoderma_applanatum.htm)

Gljiva *G. applanatum* svojim razvojem izaziva pojavu bele truleži drveta, egzoenzimima razlaže lignin i celulozu do neorganskih komponenti kao što su ugljenik i azot, koje joj tako postaju dostupne. Ova osobina može da se iskoristi za potrebe drvne

industrije i pravljenje biopulpe drveta, odnosno konverziju parčića drveta u papirnu pulpu ([http://www.forestbioproducts.umaine.edu/project\\_enzymes\\_biopulping.php](http://www.forestbioproducts.umaine.edu/project_enzymes_biopulping.php)). Na ovaj način može da se uštedi energija pri proizvodnji papira i izbegnu materije štetne po životnu sredinu. Pored toga, važna uloga ove gljive je i bioremedijacija (Matos et al., 2007; Rigas et al., 2007; Joo et al., 2008).

Gljiva *G. applanatum* korišćena je vekovima u obliku čaja u tradicionalnoj medicini naroda Dalekog istoka. Vodeni ekstrakti ove gljive se danas koriste u lečenju mnogih bolesti, od prehlade do kancera i AIDS-a. Brojne studije ukazuju na antitumorna i imunomodulatorska svojstva ove gljive (Jeong et al., 2008).

Interesantan je i efekat ove bazidiomicete na regulaciju nivoa glukoze u krvi kao i potencijal za prevenciju različitih komplikacija kod dijabetesa, inhibitornim dejstvom na aldozo reduktazu. Aldoza reduktaza je enzim koji se smatra jednim od glavnih uzročnika mnogih komplikacija na organima, koje se javljaju kod dijabetesa. Zbog toga je i pronalaženje novih mogućnosti da se inhibira dejstvo ovog enzima osnovni cilj u borbi protiv različitih zdravstvenih poremećaja koji nastaju usled ove bolesti (Lee et al., 2006). Na osnovu svojih istraživanja Jung je zaključio da gljiva *G. applanatum* poseduje komponente sa antidijabetskim i inhibitornim efektima na pojedine komplikacije izazvane dijabetesom (Jung et al., 2005). Ekstrakti ove gljive značajno snižavaju nivo glukoze (do 22,0%), holesterola i triacilglicerola u krvi (do 20,3%) (Yang et al., 2007). Utvrđeno je takođe da alkoholni ekstrakt gljive *G. applanatum* snižava nivo glukoze u krvi (Jung et al., 2005).

Dokazano je da polisaharidi ekstrahovani iz ove gljive imaju svojstvo da ojačaju želudačnu mukoznu barijeru (Yang et al., 2005). Druge studije pokazale su da ekstrakti izolovani iz gljive *G. applanatum*, ili pojedine njihove komponente, deluju antibakterijski (Moradali et al., 2006), antiparazitski (Suay et al., 2000), da jačaju imuni sistem (Stamets, 2002), imaju diuretsko svojstvo (Suay et al., 2000) i potencijalni su antioksidanti (Acharya et al., 2005).

Do sada su iz gljiva roda *Ganoderma*, kao i iz gljive *G. applanatum* izdvojene različite bioaktivne komponente, kao što su steroidi, masne kiseline, aplanoksidinska kiselina, furanoganoderinska kiselina. Ova gljiva sadrži  $\beta$ -glukane, kisele heteroglukane i hitin ksiloglukane, kao i visoko oksidovane triterpenoide lanostanskog tipa (ganoderinsku, ganoderensku, ganolucidensku i lucidensku kiselinu) kao aktivne



supstance koje imaju strukturu sličnu steroidnim hormonima (Wasser i Weis, 1999). U Kini i Japanu ova gljiva se koristi za lečenje bronhijalne astme, regulaciju imunog sistema, zaštitu jetre, snižavanje pritiska, deluje antialergijski, protiv bolova, snižava temperaturu (Hobbs, 1995). Već dugi niz godina u zemljama Dalekog istoka, a u novije vreme i u zemljama zapadnog sveta, za tretiranje različitih zdravstvenih poremećaja dostupni su razni komercijalni preparati na bazi gljive *Ganoderma applanatum*.

### 2.6.5. GANODERMA LUCIDUM

*Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. u Japanu nazvana Reishi ili Mannetake, u Kini i Koreji Ling Chu, Ling Chih i Ling Zhi (gljiva besmrtnosti) se već 2000 godina primenjuje u tradicionalnoj medicini Orijenta, slika 2.12. Gorkog je ukusa i drvenaste građe. Raste u svim delovima sveta, ali je veoma retka. U Japanu se može pronaći na starom drvetu šljive, a u Evropi, Aziji, severnoj i južnoj Americi najčešće raste na panjevima, korenju, obolelim stablima četinara ili listopadnog drveća, najčešće hrasta ili kestena. Prema statističkim podacima od 10000 stabala na samo dva ili tri raste gljiva Reishi.



**Kraljevstvo:** Gljive

**Razdeo:** Basidiomycota

**Klasa:** Basidiomycetes

**Red:** Polyporales

**Familija:** Ganodermataceae

**Rod:** Ganoderma

**Vrsta:** *Ganoderma lucidum*

**Slika 2.12.** *Ganoderma lucidum*  
[www.fotoresearch.com/u16289931](http://www.fotoresearch.com/u16289931)

Postoje pisani podaci da je gljiva *G. lucidum* korišćena u tradicionalnoj medicini Kine i Japana još pre 4000 godina, posebno za tretiranje hepatopatije, hroničnog hepatitisa, nefritisa, hipertenzije, artritisa, neurastenije, insomnije, bronhitisa, astme i

čira na želucu (Kabir et al., 1988). U Ben Cao Gang Mu (A.D. 1578), najpoznatijoj enciklopediji kineske biljne medicine, objašnjeno je da se kontinualnom upotrebom gljive *G. lucidum* smanjuje telesna težina i produžava život (Huang, 1993). Prvobitno se smatralo da su pozitivni farmakološki efekti posledica intenziteta obojenosti ove gljive, ali su istraživanja pokazala da koncentracija polisaharida kao bioaktivnih materija veoma zavisi od faze razvoja plodonosnog tela, vremena skladištenja posle branja kao i od uslova pod kojima se čuva (Jong i Birmingham, 1992), što je potvrđeno i kod drugih medicinski važnih gljiva (Minato et al., 1999; Minato et al., 2001).

I u novije vreme gljiva *G. lucidum* privlači pažnju zbog svojih bioloških aktivnosti, tako da se njena svojstva intenzivno ispituju i savremenim metodama zapadne medicine (Wasser i Weis, 1999). Savremenim istraživanjima je utvrđeno da ova gljiva sadrži antialergenske komponente, ima imunomodulatorska svojstva, pomaže pri tretiranju HIV infekcija, deluje antitumorno, ispoljava pozitivne efekte na kardiovaskularni sistem, doprinosi zaštiti jetre, detoksifikaciji i boljem radu nervnog sistema (Wasser, 2005).

Antitumorna svojstva ove gljive, kao i uticaj na jačanje imunog sistema, bez ikakvih sporednih, neželjenih dejstava, predstavljaju objektivnu mogućnost za prevenciju oksidativnih oštećenja i bolesti koje mogu da nastanu kao njihova posledica (Kim i Kim, 1999).

Potencijalna medicinska vrednost gljive *G. lucidum* uticala je na intenzivno izučavanje farmakoloških komponenti koje su izolovane iz ove bazidiomicete. Pokazalo se da je *G. lucidum* potpuno zdrastveno bezbedna jer i pri oralnoj primeni njenih ekstrakata nema nikakvih neželjenih efekata (Eo et al., 1999; Eo et al., 1999a). Istraživanja sprovedena poslednjih tridesetak godina pokazuju da i same spore ove gljive imaju visok sadržaj bioaktivnih komponenti, čak možda i viši nego što je u karpoforu (Min et al., 1998). Ustanovljeno je da se aktivnost spora, odnosno dejstvo njihovih bioloških efekata, povećava ukoliko je veća razgradnja njihovog ćelijskog zida (Zhu et al., 2000).

Antitumorna, imunomodulatorska i imunoterapeutska aktivnost uslovljena je u najvećem stepenu prisustvom polisaharida, posebno  $\beta$ -D-glukana, pored drugih bioaktivnih komponenti izolovanih iz karpofora i micelijuma gljive *G. lucidum* (Paterson, 2006; Wasser i Weis, 1999; Wasser, 2005). Pored polisaharida, farmakološki

aktivne komponente ove gljive su triterpeni (ganoderinske kiseline) čija je struktura slična strukturi steroidnih hormona i alkaloidi (Paterson, 2006), proteini, steroidi, nukleotidi, laktoni, masne kiseline, manitol, kumarin.

Preparati ove gljive u obliku kapsula, ampula, ekstrakata i čajeva donose godišnji svetski prihod od 1,6 milijardi dolara.

### 2.6.6. *LENTINULA EDODES*

Shiitake, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, pripada grupi najukusnijih gljiva. Prepoznatljiva je po svojoj lekovitosti, izvanrednom ukusu i bogatoj aromi. Naziv ove egzotične pečurke potiče od japanskih reči: Shi koji znači hrast i take što znači pečurka. U Kini je poznata kao shiang-gu ili phoang-mo. Shiitake je samonikla u Japanu, Kini, Koreji i drugim azijskim zemljama umerenog klimatskog pojasa. Za Shiitake se zna više od hiljadu godina, a prvi zapisi potiču od japanskog naučnika Vanga iz 1313. godine.



**Kraljevstvo:** Gljive

**Razdeo:** *Basidiomycota*

**Klasa:** *Agaricomycetes*

**Red:** *Agaricales*

**Familija:** *Marasmiaceae*

**Rod:** *Lentinula*

**Vrsta:** *Lentinula edodes*

**Slika 2.13.** *Lentinula edodes*

[http://www.stevenfoster.com/photography/imageviews/l/lentinus/edodes/le2\\_102710/content/Lentinus\\_edodes\\_28136\\_large.html](http://www.stevenfoster.com/photography/imageviews/l/lentinus/edodes/le2_102710/content/Lentinus_edodes_28136_large.html)

Sveža, kao i sušena, Shiitake se mnogo koristi u kuhinji istočne Azije. U kineskoj kuhinji ova bazidiomiceta se često dodaje vegetarijanskim jelima. U Japanu se služi kao

dodatak miso supi i koristi se kao osnova za neke vrste vegetarijanskih jela, ali i kao sastojak kuvanih jela i jela pripremljenih na pari. Prema tradicionalnoj japanskoj i kineskoj medicini shiitake značajno povećava snagu i vitalnost organizma i time omogućava bolju zaštitu od velikog broja zdravstvenih poremećaja (Stamet, 1993).

Shiitake sadrži imunostimulanse, supstance efikasne u borbi protiv tumora i virusa, koji snižavaju holesterol, sprečavaju začepljenje krvnih sudova, regulišu pritisak, poboljšavaju cirkulaciju, uravnotežavaju nivo glukoze u krvi, regulišu varenje, poboljšavaju rad disajnih organa, deluju antireumatski i antialergijski, regulišu rad centralnog nervnog sistema, utiču pozitivno na fizičku snagu i izdržljivost, usporavaju starenje. Japanski i američki istraživači su pokazali da ova vrsta gljive poseduje određen broj biološki aktivnih jedinjenja koja inhibitorno deluju na procese ćelijske degeneracije. U svakom slučaju, na osnovu mnogih istraživanja preporučuje se da se shiitake koristi u ishrani (slika 2.13 i 2.14), preventivno i kao lek (Wasser, 2005).



**Slika 2.14.** Proizvodnja shiitake (*Lentinula edodes*) gljive koja se često koristi u makrobiotičkom jelovniku (Wasser, 2005)

Shiitake ima odlične nutritivne vrednosti. Ova bazidiomiceta je dobar izvor mineral (Ca, P, Fe, K i Mg) kao i vitamina B grupe (B1, B2, B3, B5, B6, B11, B12) i vitamina

D, dok ostale sadrži u manjem procentu. Takođe sadrži sve esencijalne amino kiseline i dijetetska vlakna koja imaju važnu ulogu u funkcionisanju gastro-intestinalnog trakta. Azijski narodi koriste plodonosno telo ove gljive vekovima u narodnoj ili tradicionalnoj medicini. U savremenoj medicini upotrebljavaju se prečišćeni i koncentrovani derivati ove bazidiomicete. Među njima su lentinan i LEM najviše proučavana jedinjenja koja su pokazala antitumorna, antivirusna, antibakterijska i hepatoprotektivna svojstva. Visok sadržaj ergosterola u svežim shiitakama čini ove sušene gljive veoma važnim izvorom D vitamina, s obzirom da se ergosterol pretvara u provitamin D2 u prisutstvu sunčeve svetlosti. Potrebno je samo 2 g ove gljive, osušene pod suncem, da bi se zadovoljila dnevna doza vitamina D koja je preporučena u SAD (<http://en.wikipedia.org/wiki/Shiitake>).

Lentinan se u Kini i Japanu koristi kao dodatak hemoterapiji u lečenju kancera sistema za varenje (kolorektalni i želudačni). Lentinan stimuliše imuni sistem i produkciju interferona. Sedamdesetih godina prošlog veka iz ove gljive je izolovan polisaharid AC2P, koji selektivno inhibira orthomyxoviruse (u koje spadaju i virusi influence). AC2P ometa kolonizaciju i razvoj nepoželjnih mikroorganizama. RNK iz spora shiitake podstiče proizvodnju interferona. Glavni aktivni sastojak ove bazidiomicete sa hipolipidemičkim delovanjem je eritadenin (Wasser, 2005; Zhang, 2011).

Pokazalo se da eritadenin snižava nivo svih lipida u krvi-holesterola, triacilglicerola i fosfolipida. U toku navedenih procesa ne utiče na sintezu holesterola koji je neophodan za izgradnju ćelija, nego deluje na taj način što ubrzava razgradnju holesterola u jetri i njegovo izlučivanje.

Kontinualnim korišćenjem *L. edodes* omogućen je pozitivan uticaj na hronične bolesti srca i krvnih sudova i ubrzan oporavak od njihovih akutnih komplikacija, zatim ublažavaju se tegobe kod visokog pritiska (posebno teške i maligne hipertenzije), arterioskleroze, tromboze dubokih vena, plućne embolije, suve gangrene, koronarne skleroze, infarkta miokarda, ishemije, apoplektičkog udara-moždane kapi, aterosklerozom uzrokovanih bolesti bubrega i oka kao i hiperlipidemije, gihta i drugo (Wasser, 2005).



### 2.6.7. PHELLINUS LINTEUS

*Phellinus linteus* (Berkeley & M.A. Curtis) Teng, u Japanu nazvana Meshima, Sang Hwang u Koreji, u prirodi raste kao parazit na starim panjevima vrbe, duda i bresta, slika 2.15. Veoma je retka i za rast su joj neophodni specifični uslovi vlažnosti, temperature i svetlosti. Da bi *P. linteus* mogla da se koristi u medicinske svrhe neophodno je da njena plodonosna tela budu stara najmanje 30-40 godina.

U tradicionalnoj orijentalnoj medicini ova bazidiomiceta već više od hiljadu godina ima primenu u lečenju insomnije, ulkusa, neurastenije, artritisa, hepatitisa, astme, bronhitisa, hipertenzije i trovanja.



Kraljevstvo: Gljive  
Razdeo: *Basidiomycota*  
Klasa: *Basidiomycetes*  
Red: *Hymenochaetales*  
Familija:  
*Hymenochaetaceae*  
Rod: *Phellinus*  
Vrsta: *Phellinus linteus*

**Slika 2.15.** *Phellinus linteus*

[http://www.phellinus-research.com/images/index/clip\\_image001.jpg](http://www.phellinus-research.com/images/index/clip_image001.jpg)

Ekstrakti ove gljive preventivno deluju na pojavu stresa, nervne napetosti, distrofije mišića, zamora i dijareje. Koriste se za stimulaciju rada jetre, utiču na snižavanje nivoa holesterola u krvi, jačanje imunog sistema, deluju preventivno na nastanak kardiovaskularnih oboljenja. Ekstrakti gljive *P. linteus* dobijeni vrelom vodenom ekstrakcijom plodonosnih tela ispoljili su interesantna imunomodulatorska i antitumorna svojstva. Potvrđen je pozitivan efekat na sprečavanje rasta kancera želuca, dvanaestopalačnog creva, debelog creva, kao i tumora jetre. Vodeni ekstrakti dobijeni iz plodonosnih tela i micelijuma gljive *P. linteus* imaju imunostimulativno dejstvo na B

limfocite i sintezu imunoglobulina (Mizuno, 1999.; Wasser et al., 2005.; Nakamura et al., 2005.).

Sve više se ispituje primena ove gljive u sprečavanju alergija uzrokovanih polenom i hranom, kao i u prevenciji autoimunih bolesti kao što su psorijaza i reumatoidni artritis.

### 2.6.8. *TRAMETES VERSICOLOR*

*Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pil. (Ćuranov rep, Šarena tvrdoška) jedna je od široko rasprostranjenih gljiva. Raste praktično svuda gde ima mrtvih panjeva ili trupaca, a povremeno raste i na oštećenim stablima. Uzročnik je bele truleži listopadnog drveća, a ponekad i četinarara. Smatra se najvažnijim razlagačem panjeva, gde se javlja u sukcesiji sa drugim gljivama. Iako je tipičan razarač mrtvog drveta, može da raste i kao parazit na upaljenoj kori bukve, što joj daje još veći značaj. Raste skoro cele godine, u žbunovima u obliku dela kruga koji obavijaju deblo ili panj, slika 2.16.



Kraljevstvo: Gljive

Razdeo: *Basidiomycota*

Klasa: *Agaricomycetes*

Red: *Polyporales*

Familija: *Polyporaceae*

Rod: *Trametes*

Vrsta: *Trametes versicolor*

**Slika 2.16.** *Trametes versicolor*

[http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes\\_versicolor\(mgw-02\).jpg](http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes_versicolor(mgw-02).jpg)

Ova gljiva nije jestiva jer je njena struktura suviše čvrsta. Međutim, ovo je izuzetno važna lekovita gljiva. Iz *T. versicolor* izolovani su lekoviti polisaharidi PSK "Kureha", 1987. godine u Japanu i PSP polisaharid-peptid koji sadrži 10% peptida i 90%

polisaharida. Kao i kod istraživanja lekovitosti drugih gljiva, osnovna ispitivanja su usmerena na dokazivanje antitumornog dejstva. Dobijeni rezultati pokazali su da polisaharidi izolovani iz ove gljive imaju izraženo antitumorno dejstvo i to posebno ako se primenjuje u kombinaciji sa hemio ili radio terapijom. Ispitivanja na pacijentima, rađena na onkološkim institutima u Japanu i Kini, pokazala su da primena PSP, u kombinaciji sa radio terapijom, produžava preživljavanje kod pacijentkinja sa tumorom grlića materice od 11-25%, u zavisnosti od stadijuma bolesti.

Pozitivno biološko dejstvo PSP-a dokazano je i kod dijabetesa, tromboze, reumatizma, povišenih triacilglicerola u krvi, protiv inflamatornih procesa u organizmu. Deluje kao vazodilatator, antiaritmik i učestvuje u sintezi i razgradnji prostaglandina ([http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes\\_versicolor](http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor)).

Vrlo je interesantna antibiotska aktivnost *T. versicolor* koja uvećava antibakterijski potencijal i produžava antibakterijski efekat antibiotika. Ova gljiva može takodje da povećava antibiotsku osetljivost nekih bakterija rezistentnih na antibiotike.

*Trametes versicolor* povećava opšti imunitet organizma, deluje antivirusno i poboljšava apetit, smanjuje zamor, slabost i depresivno stanje. U tradicionalnoj medicini Dalekog istoka koristi se kao zdrava hrana u obliku praška, čaja ili u kapsulama. S obzirom na tvrdnu konzistenciju gljive najčešće se upotrebljava kao čaj. Dok je mlada i sveža *T. versicolor* može da se koristi i za spremanje supa uz dodatak raznog povrća i morskih plodova, što je omiljena hrana u Kini i Japanu. *T. versicolor* je slatkastog ukusa, blago povećava energiju (podize raspoloženje).

Ranija istraživanja su bila bazirana pre svega na korišćenju preparata napravljenih od ekstrakta micelija ili plodonosnih tela ove bazidiomicete, dok se nova istraživanja sve više fokusiraju na korišćenje cele gljive.

Potrošnja *T. versicolor* u Japanu je veoma velika. Gljiva može da se nađe u prodavnicama zdrave hrane, osušena i upakovana (<http://www.pcelica.co.rs/gljive/vrste/basidiomycetes>).



### 3. MATERIJAL I METODE

U radu su korišćeni autohtoni ekstrakti gljiva iz prirodnih staništa, ekstrakti plodonosnih tela komercijalno uzgajanih gljiva i gotovi komercijalni ekstrakti, tabela 3.1.

Sveža plodonosna tela gljive *Ganoderma applanatum* sakupljena su u jesen 2008. godine na lokalitetu rezervata "Obedska Bara" (jugoistočni Srem) 40 km zapadno od Beograda. Plodonosna tela gljive *Trametes versicolor* sakupljena su 2008. godine na lokalitetu Košutnjak, u Beogradu. Karpofori su identifikovani pomoću odgovarajućeg ključa za identifikaciju gljiva (Phillips, 1994), očišćeni, osušeni na vazduhu na 40 °C do konstantne mase i samleveni do finog praha koji je čuvan do analiziranja. Reprezentativni primerci i čiste kulture gljiva sačuvani su u kolekciji Katedre za Tehnološku mikrobiologiju (Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet).

Plodonosna tela komercijalno uzgajanih gljiva *Agaricus brasiliensis* i *Agaricus bisporus* Horst U1, dobijena su od Mushroom Experimental Station (Horst, Holandija). *Ganoderma lucidum* plodonosna tela i spore i *Lentinula edodes* plodonosna tela dobijena su od Jiangsu Alphy Bio-Tech, Co. Ltd. (Kina). Plodonosna tela divlje vrste gljive *Phellinus linteus* dobijena su od Amazing Grace Health Industries (Bankok, Tajland).

Polisaharidni ekstrakt spora uzgajane gljive *Ganoderma lucidum*, Grade A, dobijen je od Fujian Xianzhilou Biological Sciences and Technology Co. Ltd. (Kina).

#### 3.1. PRIPREMA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

Za dobijanje inicijalnog ekstrakta iz praha plodonosnog tela svake ispitivane gljive kao i spora pojedinih gljiva korišćen je postupak ekstrakcije vrelom vodom i alkoholne precipitacije.

### 3.1.1. EKSTRAKCIJA

Fino samleveni prah (40 mesh) svake gljive tretiran je 24 h sa 96% etanolom na sobnoj temperaturi, uz mešanje, zatim je materijal filtriran i osušen pod vakuumom (na 42 °C). 10% suspenzija praha plodonosnog tela u MiliQ vodi<sup>1</sup> (MQ) autoklavirana je dva puta na 121 °C u toku 20 minuta. Ekstrakt je ohlađen i centrifugiran na 9000 g (centrifuga Becman J2-21M, maksimalne brzine 14 000 rpm) u toku 20 minuta. Supernatant je skoncentrovan na 10% od početne zapremine, zagrevanjem na 100 °C. Dodate su dve zapremine 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i ekstrakt je ostavljen preko noći na 4 °C. Supernatant je dekantovan, a pelet je jednom ispran sa C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH da bi se uklonili šećeri niskog stepena polimerizacije (mono-, di- i oligosaharidi) i u etanolu rastvorna fenolna jedinjenja, pri čemu su se bioaktivni polisaharidi taložili pri finalnoj koncentraciji alkohola 70%. Nakon centrifugiranja na 9000 g u toku 20 minuta, pelet je sušen u vakumu na 42 °C u toku 12 časova. Na ovaj način su dobijeni vreli vodeni ekstrakti iz plodonosnih tela *Agaricus bisporus* (Ab), *Agaricus brasiliensis* (Abr) i *Phellinus linteus* (Pl), tabela 3.1. Komercijalni polisaharidni ekstrakt iz spora gljive *Ganoderma lucidum* (Gl-s-fujian), dobijen je kao komercijalni proizvod, postupkom vrele vodene ekstrakcije i alkoholne precipitacije. Ekstrakt nije dodatno ispiran sa etanolom (precipitacija sa 70 % etanolom).

**Tabela 3.1.** Polisaharidni ekstrakti

Vrsta gljive	Ekstrakt	
	Vreli vodeni ekstrakt	Prečišćeni (dijalizom) vreli vodeni ekstrakt
<i>Agaricus bisporus</i>	Ab	–
<i>Agaricus brasiliensis</i>	Abr	–
<i>Phellinus linteus</i>	Pl	–
<i>Ganoderma lucidum</i> (Fujian spore)	Gl-s-fujian	–
<i>Lentinula edodes</i>	–	Le
<i>Trametes versicolor</i>	–	Tv
<i>Ganoderma applanatum</i>	–	Ga
<i>Ganoderma lucidum</i>	–	Gl
<i>Ganoderma lucidum</i> (spore)	–	Gl-s

<sup>1</sup> Destilovana voda dobijena pomoću MiLLipore, Bedford, MA, USA (MillQ) sistema za prečišćavanje.

Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom iz plodonosnih tela *Lentinula edodes* (Le), *Trametes versicolor* (Tv), *Ganoderma applanatum* (Ga) i *Ganoderma lucidum* (Gl), kao i ekstrakt iz spora gljive *Ganoderma lucidum* (Gl-s) dodatno su prečišćeni dijalizom.

### 3.1.2. DIJALIZA

Dijaliza je rađena u MQ vodi, kako bi se uklonili rezidualni molekuli molekulskih masa < 8-10 kDa. Pre upotrebe sa creva za dijalizu (ZelluTrans/Roth® 6.0 regenerated cellulose tubular membrane, MWCO: 8000-10000) su uklonjeni joni metala ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ), kompleksiranjem sa rastvorom EDTA na sledeći način:

U 600 mL MQ vode stavljeno je crevo za dijalizu i dodato je nekoliko kapi 0,5 M EDTA (pH 8,0). Rastvor je zagrevan i ostavljen da ključa 5 minuta. Posle toga crevo je isprano demineralizovanom vodom spolja i iznutra i napunjeno prethodno pripremljenim 10% vodenim rastvorom inicijalnog ekstrakta. Dijaliza je rađena u 2 L MQ vode, u erlenmajeru koji je pokriven parafilmom, uz mešanje u toku 24 h na magnetnoj mešalici, na sobnoj temperaturi. Dijalizovani ekstrakt je zatim centrifugiran na 9000 g, 10 minuta, nakon čega su polisaharidi velikih molekulskih masa precipitirani etanolom i osušeni u vakumu. Na ovaj način su dobijeni vrela vodena polisaharidna ekstrakta koji su označeni kao Le, Tv, Gl i Gl-s, tabela 3.1.

## 3.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

### 3.2.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KOMPONENTI EKSTRAKATA

Za određivanja sadržaja različitih komponenti u ispitivanim ekstraktima korišćene su spektrofotometrijske metode za određivanje sadržaja ukupnih monosaharida, ukupnih proteina i fenola, kao i enzimске metode za određivanje sadržaja ukupnih glukana i ukupnih  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana i elementalna analiza.

### 3.2.1.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH UGLJENIH HIDRATA

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata određen je fenol-sumpornom metodom, uz D-glukozu (62,5-500 µg/mL) kao standard (Dubois et al., 1956). Rezultati su izraženi u g ekvivalentima glukoze na 100 g suve mase ekstrakta.

### 3.2.1.2. ODREĐIVANJE UKUPNIH PROTEINA

Sadržaj ukupnih proteina određen je prema Bradford et al., (1976). Kao standard korišćen je goveđi serum albumin (BSA), 0,1-1,0 mg/mL. Ukupan sadržaj proteina izražen je u gram ekvivalentima BSA na 100 g suve mase ekstrakta.

### 3.2.1.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA

Sadržaj ukupnih fenola određen je uz pomoć Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) kao standarda (Ismail et al, 2004). Svakom ekstraktu (0,1 mL) dodato je 0,75 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razblaženog 10 puta) i smeša je dobro promešana. Posle 5 min inkubiranja na sobnoj temperaturi smeši je dodato 0,75 mL 6% natrijum-karbonata, uz blago mešanje. Reakcija se odvijala 2 h u mraku, na sobnoj temperaturi i apsorbancija je očitana na 725 nm. Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu različitih koncentracija galne kiseline (15-250 µg/mL), koja je korišćena kao standard. Sadržaj ukupnih fenola izražen je kao ekvivalenti galne kiseline (gallic acid equivalents-GAE) na suhu masu ekstrakta.

### 3.2.1.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GLUKANA

Sadržaj ukupnih,  $\beta$ - i  $\alpha$ -glukana u polisaharidnim ekstraktima određen je uz pomoć specifičnog enzimskog kita "Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay", K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Irska). Osnovne komponente ovog kita su egzo-1,3- $\beta$ -glukanaze,  $\beta$ -glukozidaze, amiloglukozidaza, invertaza, reagens za određivanje glukoze (GOPOD-glukozo oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) i standardni rastvor glukoze. Da bi se dobio sadržaj ukupnih glukana uzorci polisaharida su hidrolizovani sa 60% sumpornom kiselinom (v/v) u toku 1 sata u ledenom kupatilu, i posle

odgovarajućeg razblaženja vodom, 2 sata na 100 °C. Nakon neutralizacije sa 2 M KOH izvršena je kompletna hidroliza eventualno neizhidrolizovanih glukanskih fragmenata do glukoze uz pomoć smeše egzo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukanaza i  $\beta$ -glukozidaza. Ukupni sadržaj glukana je određen dodavanjem GOPOD reagensa. Apsorbanca rastvora je određena spektrofotometrijski na 510 nm. Sadržaj  $\alpha$ -glukana određen je enzimskom hidrolizom sa smešom amiloglukozidaza i invertaza. Sadržaj  $\beta$ -glukana dobijen je kao razlika sadržaja ukupnih glukana i sadržaja  $\alpha$ -glukana. Dobijene vrednosti sadržaja glukana u odnosu na suhu masu ekstrakta izražene su u procentima.

### **3.2.1.5. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA (EOMA)**

Uzorci su pre elementalne organske mikroanalize sušeni na 105 °C do konstantne mase. Tako dobijeni uzorci su sprašeni i urađena je EOMA u automatskom analizatoru "VARIO-EL III CHNS-O Analyzer" proizvođača Elementar (Hanau, Nemačka).

### **3.2.1.6. ODREĐIVANJE PROCENTA HIGROSKOPNE VLAGE**

Procenat vlage određivan je u vlagomeru (model MOC-120H) firme Shimadzu Co., Japan sa programom sušenja uzorka na 105 °C, 1,5 h. Rezultati su dati kao srednja vrednost tri nezavisna merenja (ISO 11465:1993).

## **3.2.2. STRUKTURNO-INSTRUMENTALNE METODE**

### **3.2.2.1. INFRACRVENA SPEKTROSKOPIJA**

Uzorci polisaharidnih ekstrakata analizirani su infracrvenom (IC) spektroskopijom. Spektri su snimljeni na instrumentu Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific, USA). Spektrofotometar je opremljen DTGS TEC detektorom. Interpretacija spektara vršena je pomoću softvera OMNIC 7.3 Software, ThermoNicolet. Spektri su snimljeni u opsegu 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  korišćenjem tehnike KBr diskova ili ATR (infra red attenuated total reflectance).

### 3.2.2.2. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA (NMR)

NMR spektri su snimljeni na Bruker AVANCE III 500 spektrometru (500,26MHz za  $^1\text{H}$  i 125,80 za  $^{13}\text{C}$ ), u NMR kiveti prečnika 0,5 mm, na 298 °K, u  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9% D, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sa natrijum-2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonatom (DSS) kao internim referentnim standardom (0 ppm) za oba tipa,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektre. Za 2D spektre, H-H COSY i H-C HSQC, primenjene su standardne Bruker pulsne sekvence (cosygppqf i hsqcetgpsi2).

Uzorci (~15 mg) su osušeni na 50 °C, a zatim su tri puta, naizmenično, isprani teškom vodom ( $\text{D}_2\text{O}$ ) i sušeni.

Za asignaciju NMR signala šećera korišćeni su podaci iz Jansson et al., (2006) i Spectral Database for Organic Compounds, SDBS (<http://riodb01.ibase.aist.go.jp>).

### 3.2.2.3. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

Fino usitnjeni prah nativnih ekstrakata sniman je na skenirajućem elektronskom mikroskopu JEOL JSM-6390 (JEOL, Japan). Uzorci su prethodno osušeni na 50 °C, a zatim su, naizmenično dva puta, isprani vodom i sušeni. Posle toga, 2-3 mg ekstrakta je nanešeno na lepljive trake koje su zatim fiksirane na nosače. Ekstrakti su obloženi zlatnim prahom pomoću BAL-TEC SCD 005 Sputter Coater (Japan), pri brzini od 100 sec/30mA. Uzorci su snimani na uvećanju od 1000, 3500, 10000 i 20000 puta.

### 3.2.2.4. TEČNO-MASENA HROMATOGRAFIJA

Ekstrakti (15 mg) su hidrolizovani u 2 M trifluorsirćetnoj kiselini (TFA, 15 mL) na 121 °C, 1 čas, u zatopljenim staklenim ampulama. Dobijeni hidrolizati su upareni (IKA<sup>®</sup> Werke RV06-ML, Germany) do suva na 45 °C pri sniženom pritisku. Preostala TFA je uklonjena ispiranjem sa izo-propanolom, 2 puta, a dobijeni hidrolizati su rastvoreni u 0,5 mL MQ vode.

Monosaharidni profil ekstrakata je ispitivan pomoću tečne hromatografija-masene spektrometrije (LC-MS) sa elektrosprej jonizacijom (Electrospray Ionisation, ESI) na HPLC uređaju (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies) sa degaserom, autosamplerom i kolonom Zorbax Carbohydrate (150 x 4,6 mm i. d.; 5  $\mu\text{m}$ ) u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Kao

mobilna faza korišćena je smesa rastvarača A (5 mM rastvor amonijum-formijata u MilliQ vodi) i B (acetonitril) sa izokratnim eluiranjem: 0 - 20 min 25% A, pri protoku od 1,40 mL/min. Injekciona zapremina je bila 10 µl za standarde, odnosno 100 µl za hidrolizovane ekstrakte, a temperatura kolone 35 °C. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation (Agilent Technologies).

**Tabela 3.2.** Osobine standarda šećera ispitivanih LC-MS analizom

Supstanca	Molekulska formula	Precizna molekulska masa	Izmerena masa jona	$t_R$ (min)
<b>Arabinoza</b>	$C_5H_{10}O_5$	150,05282	[M-H] <sup>-</sup> 149,03933 [M] <sup>+</sup> 150,04244 [M+Cl] <sup>-</sup> 185,01767 [M+HCOO] <sup>-</sup> 195,04736	<b>3,42</b>
<b>Fruktoza</b>	$C_6H_{12}O_6$	180,06339	[M-H] <sup>-</sup> 179,06018 [M] <sup>+</sup> 180,06349 [M+Cl] <sup>-</sup> 215,03839 [M+HCOO] <sup>-</sup> 225,06829	<b>3,62</b>
<b>Galaktoza</b>	$C_6H_{12}O_6$	180,06339	[M-H] <sup>-</sup> 179,06050 [M] <sup>+</sup> 180,06331 [M+Cl] <sup>-</sup> 215,03880 [M+HCOO] <sup>-</sup> 225,06799	<b>4,32</b>
<b>Galakturonska kiselina</b>	$C_6H_{10}O_7$	194,04265	[M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> 253,05723	<b>2,72</b>
<b>Glukoza</b>	$C_6H_{12}O_6$	180,06339	[M-H] <sup>-</sup> 179,05573 [M] <sup>+</sup> 180,05902 [M+Cl] <sup>-</sup> 215,03354 [M+HCOO] <sup>-</sup> 225,06346	<b>3,17</b>
<b>Glukozamin hlorhidrat</b>	$C_6H_{13}NO_5$	179,07937	[M+Cl] <sup>-</sup> 214,05290 [M+HCOO] <sup>-</sup> 224,08275	<b>2,71</b>
<b>Laktoza</b>	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,11621	[M-H] <sup>-</sup> 341,10849 [M] <sup>+</sup> 342,11169 [M+Cl] <sup>-</sup> 377,08613 [M+HCOO] <sup>-</sup> 387,11542	<b>7,14</b>
<b>Maltoza</b>	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342,11621	[M-H] <sup>-</sup> 341,11859 [M] <sup>+</sup> 342,12165 [M+Cl] <sup>-</sup> 377,09605 [M+HCOO] <sup>-</sup> 387,12469	<b>6,57</b>
<b>Manoza</b>	$C_6H_{12}O_6$	180,06339	[M-H] <sup>-</sup> 179,05957 [M] <sup>+</sup> 180,06305 [M+Cl] <sup>-</sup> 215,03752 [M+HCOO] <sup>-</sup> 225,06847	<b>3,80</b>
<b>N-acetil glukozamin</b>	$C_8H_{15}NO_6$	221,08994	[M-H] <sup>-</sup> 220,08689 [M] <sup>+</sup> 221,08943 [M+Cl] <sup>-</sup> 256,06509 [M+HCOO] <sup>-</sup> 266,09632	<b>3,35</b>
<b>Rafinoza</b>	$C_{18}H_{32}O_{16}$	504,16903	[M-H] <sup>-</sup> 179,05573 [M] <sup>+</sup> 180,05902 [M+Cl] <sup>-</sup> 215,03354 [M+HCOO] <sup>-</sup> 225,06346	<b>10,41</b>
<b>Ramnoza</b>	$C_6H_{12}O_5$	164,06847	[M-H] <sup>-</sup> 163,06363 [M+Cl] <sup>-</sup> 199,04155 [M+HCOO] <sup>-</sup> 209,07177 [M+CH <sub>3</sub> COO] <sup>-</sup> 223,07989	<b>2,62</b>
<b>Ksiloza</b>	$C_5H_{10}O_5$	150,05282	[M-H] <sup>-</sup> 149,04796 [M] <sup>+</sup> 150,05231 [M+Cl] <sup>-</sup> 185,02767 [M+HCOO] <sup>-</sup> 195,05615	<b>3,00</b>

Negativno naelektrisani molekularni joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom, a polarnost je podešena na negativnu. ES parametri su imali sledeće vrednosti: potencijal kapilare 4000 V; temperatura gasa 350°C; protok gasa za sušenje 12 L/min; pritisak nebulajzera 45 psig (310.26 Pa); napon fragmentora 140 V, a mase su merene u opsegu 100-2000 m/z. Rezultati LC-MS analize standarda šećera prikazani su u tabeli 3.2.

### 3.2.2.5. TEČNA HROMATOGRAFIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus*

Sadržaj monosaharida u hidrolizovanim polisaharidnim ekstraktima *A. bisporus* (Ab), *A. brasiliensis* (Abr) i *P. linteus* (Pl) je dodatno određen tečnom hromatografijom visokog stepena razdvajanja (HPLC).

Ekstrakti (15 mg) su hidrolizovani u 2 M trifluorsirćetnoj kiselini (TFA, 15 mL) na 121 °C, 1 čas, u zatopljenim staklenim ampulama. Dobijeni hidrolizati su upareni do suva na 40 °C u atmosferi N<sub>2</sub>. Preostala TFA je uklonjena ispiranjem dva puta sa po 0,5 mL metanola (40 °C u atmosferi N<sub>2</sub>), a upareni hidrolizovani monosaharidi su rastvoreni u 0,5 mL MQ vode. 25 µL uzorka je analizirano na HPLC sistemu (Dionex Corp. Sunnyvale, Cal. USA) opremljenim pulsni amperometrijskim detektorom (PAED, gold), na Carbo Pac PA-1 koloni (4x250 mm). Eluiranje je rađeno izokratnim rastvorom 20 mM NaOH, pri brzini protoka 1,0 mL/min. Glukoza i galaktoza su korišćeni kao standardi.

### 3.2.2.6. PLANARNA HROMATOGRAFIJA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

Papirna hromatografija (PC) hidrolizata polisaharidnih uzoraka rađena je silaznom tehnikom na papiru Whatman No.1 u sistemu razvijaača (v/v) etil-acetat-piridin-voda (2,5:1:2,5). Šećeri su detektovani na papirnom hromatogramu sa srebro nitrat-natrijum hidroksidom (Trevelyan et al., 1950) i trifeniltetrazolium-hloridom (Wallenfels, 1950).

Tankoslojna hromatografija (TLC) je rađena na silika gel H pločama (13x20x0.5 cm) sa sledećim sistemom razvijaača: aceton-voda (90:10), 2-propanol-aceton-0,1 M mlečna kiselina (4:4:2) za neutralne šećere i 2-propanol-aceton-0,1 M mlečna kiselina (3:4:3) za



uronske kiseline. Za bojenje šećernih komponenti upotrebljen je reagens difenilamin-anilin-fosfat (Bailey & Bourne, 1960).

Kao standardi su korišćeni D-glukuronska kiselina, D-galakturonska kiselina, D-glukozamin, D-maltoza, D-galaktoza, D-glukoza, D-manoza, L-fukoza, D-ksiloza, D-arabinoza i D-ramnoza.

### 3.3. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA

Za merenje antioksidativnih svojstava ispitivanih ekstrakata u *in vitro* uslovima, korišćene su različite metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Poređene su sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, inhibicija lipidne peroksidacije i sposobnost redukcije jona gvožđa ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Takođe, praćena je sposobnost heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Smanjenje koncentracije  $\text{Fe}^{2+}$  štiti biološke sisteme od oksidativnog oštećenja.

#### 3.3.1. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA

Test je rađen po modifikovanoj metodi koju je dao Bilos (1958). U prvoj seriji, svakom rastvoru polisaharidnog ekstrakta (0,1-10 mg/mL, 2 mL) u MQ dodat je po 1,0 mL sveže pripremljenog 0,2 mM rastvora DPPH u dimetil sulfoksida (DMSO). U drugoj seriji svakom uzorku je dodat po 1,0 mL rastvora DMSO. Ovako dobijen rastvor je 1 minut energično mešan na vorteksu i zatim ostavljen u mraku na 20 °C, 40 min. Apsorbanca dobijenog rastvora je merena na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1650 PC, Japan) na 517 nm. Rastvori različitih koncentracija skroba, amilopektina i galne kiseline (0,1-10 mg/mL) su takođe testirani ovom metodom. Kao kontrolni rastvor korišćen je rastvor u kome su se nalazile sve komponente bez ekstrakta.

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala računata je po sledećoj formuli:

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

$A_i$  - apsorbanca 2 mL ekstrakta sa dodatkom 1 mL rastvora DPPH

$A_j$  - apsorbanca 2 mL ekstrakta sa dodatkom 1 mL rastvora DMSO

$A_c$  - apsorbanca kontrolnog rastvora - 2 mL DMSO i 1 mL DPPH

Askorbinska kiselina, BHT i  $\alpha$ -tokoferol rastvoreni u DMSO su korišćeni kao pozitivne kontrole (Ekanayake et al., 2005).

### 3.3.2. SPOSOBNOST INHIBICIJE PEROKSIDACIJE LIPIDA

Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida je određena konjugen dienskom metodom u model sistemu linoleinske kiseline (Lingnert et al., 1979), uz male modifikacije. Rastvorima polisaharidnih ekstrakata (0,1-10 mg/mL, 100  $\mu$ L) u MQ dodato je 2,0 mL 10 mM emulzije linoleinske kiseline u 0,2 M natrijum fosfatnom puferu. Da bi se obezbedila stabilnost emulzije dodato je 6,5 mM Tween-a 20 i rastvori su, uz neprestano mešanje, inkubirani 15 h, u mraku, na 37 °C, kako bi se ubrzala oksidacija. Zatim je 0,2 mL rastvora dodato u 6,0 mL apsolutnog metanola. Apsorbanca supernatanta merena je na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1650 PC, Japan) na 234 nm. Kao kontrolni rastvor korišćen je rastvor u kome su se nalazile sve komponente bez ekstrakta. Rastvori skroba, amilopektina i galne kiseline, u istom opsegu ispitivanih koncentracija, su takodje testirani na sposobnost inhibicije peroksidacije lipida. Sposobnost inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline računata je po sledećoj formuli:

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

*A<sub>0</sub>* - apsorbanca kontrolnog rastvora

*A<sub>1</sub>* - apsorbanca rastvora sa uzorkom

Askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol su korišćeni kao pozitivne kontole. Vrednost 100% ukazuje na najjaču inhibitornu aktivnost.

### 3.3.3. REDUKCIONA SPOSOBNOST

Redukciona sposobnost je određena po metodi koju je dao Oyaizu (1986). Rastvorima polisaharidnih ekstrakata (0,1-20 mg/mL, 2,5 mL) u MQ dodato je 2,5 mL 0,2 M natrijum fosfatnog pufera (pH 6,6) i 2,5 mL of 1% kalijum-fericijanida. Dobijeni rastvor je mešan na vorteksu i inkubiran na 50 °C, 20 min. Zatim je dodato 2,5 mL 10% trihlorsirćetne kiseline i rastvor je centrifugiran na 2000 g, 10 min. Nakon odvajanja, gornjem sloju (5,0 mL) je dodato 5,0 mL MQ vode i 1,0 mL 0,1% feri-hlorida. Apsorbanca dobijenog rastvora je merena na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1650 PC, Japan) na 700 nm. Kao kontrolni rastvor korišćen je rastvor u kom su se

nalazile sve komponente bez ekstrakta. Skrob, amilopektin i galna kiselina (0,1-20 mg/mL) su testirani na sposobnost redukcije. Kao pozitivna kontrola je korišćena askorbinska kiselina. Viša vrednost apsorbance ukazivala je na veću redukcionu sposobnost.

### 3.3.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA

Sposobnost heliranja je određena u skladu sa metodom koju su dali Dinis et al., (1994). Rastvoru polisaharidnog ekstrakta (0,1 - 20 mg/mL, 1,0 mL) u MQ dodato je 3,7 mL MQ vode i 0,1 mL 2 mM fero-hlorida. Reakcija je inicirana dodatkom 0,2 mL 5 mM ferozina. Apsorbanca rastvora je merena na UV/VIS spektrofotometru (Shimadzu UV-1650 PC, Japan) na 562 nm, posle 10 minuta na sobnoj temperaturi. U kontrolnom rastvoru nije bilo fero-hlorida i ferozina, molekula koji učestvuju u formiranju kompleksa. Niža apsorbanca ukazivala je na višu sposobnost heliranja. Sposobnost heliranja jona gvožđa je računata po sledećoj formuli:

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

$A_c$  - apsorbanca kontrolnog rastvora

$A_{uz}$  - apsorbanca rastvora sa uzorkom

Limunska kiselina i EDTA su korišćene kao pozitivne kontrole. Sposobnost heliranja jona gvožđa je takođe testirana na rastvorima skroba, amilopektina i galne kiseline (0,1 - 20 mg/mL).

## 3.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA

Za ispitivanje antimikrobnih svojstava ekstrakata gljiva korišćena su 22 mikroorganizma, tabela 3.3. Svi test organizmi čuvani su na +4 °C na odgovarajućem kosom agaru i presejavani su na dve nedelje. Sva merenja su urađena u triplikatima, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

## 3.4.1. SOJEVI MIKROORGANIZAMA

Tabela 3.3. Podloge korišćene za gajenje mikroorganizama\*

Mikroorganizam	Bujon	Agar
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	hranljivi bujon, Torlak	M 1468 Hi Crome Aureus Agar Base + FD 046
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	hranljivi bujon, Torlak	M 1468 Hi Crome Aureus Agar Base + FD 046
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	hranljivi bujon, Torlak	M 1044 Esculin Iron agar
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	hranljivi bujon, Torlak	M 1044 Esculin Iron agar
<i>Bacillus cereus</i> 10876	hranljivi bujon, Torlak	M 833 Bacillus cereus Agar Base + FD 003 + FD 045
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	M 569 Listeria Enrichment Broth	Hi Crome Listeria Agar Base, modified + FD 181
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	M 569 Listeria Enrichment Broth	Hi Crome Listeria Agar Base, modified + FD 181
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	hranljivi bujon, Torlak	M 1469 Hi Fluoro Pseudomonas Agar Base
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	hranljivi bujon, Torlak	M 1469 Hi Fluoro Pseudomonas Agar Base
<i>Escherichia coli</i> 25922	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	M 052 A Selenite F Broth	M 1466 Hi Crome Improved Salmonella Agar
<i>Proteus hauseri</i> 13315	hranljivi bujon, Torlak	Mueller Hinton Agar, Torlak
<i>Shigella sonnei</i> 29930	M 1326 Shigella Broth Base + FD 108	SS agar, Torlak
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	M 894 CAL Broth (Cellobiose Arginine Lysine Broth)	M 893 CAL Agar (Cellobiose Arginine Lysine Agar)
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	TSB-YE	Hi Crome EC O157:H7 Agar Base + FD 052
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	TSB-YE	Hi Crome EC O157:H7 Agar Base + FD 052
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	hranljivi bujon, Torlak	M 1573 HiCrome Klebsiella Selective Agar base
<i>Candida albicans</i> 24443	sladni bujon, Torlak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar
<i>Candida albicans</i> 10259	sladni bujon, Torlak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar
<i>Candida albicans</i> 10231	sladni bujon, Torlak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	sladni bujon, Torlak	M 1067 Sabouraud Chloramphenicol Agar

\* Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke kolekcije tipskih kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)

Za ispitivanje antimikrobnih svojstava ekstrakata gljiva korišćeno je osam Gram-pozitivnih bakterija - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecalis* ATCC 49532, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, deset Gram-negativnih bakterija - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 12900, *Escherichia coli* (0157:H7) ATCC 35150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27736 i četiri kvasca - *Candida albicans* ATCC 24443, *Candida albicans* ATCC 10259, *Candida albicans* ATCC 10231 i *Cryptococcus neoformans* ATCC 76484. Mikroorganizmi su gajeni na odgovarajućim podlogama, tabela 3.3.

### 3.4.2. DIFUZIJA SA FILTER DISKOVA

Ekstrakti gljiva dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom (121 °C) kao i ekstrakti prečišćeni dijalizom su rastvoreni u DMSO tako da je dobijena koncentracija 10 mg/mL i sterilisani su kroz membranski filter sa porama 0,22 µm (Tepe et al., 2005). Ekstrakti ove koncentracije su korišćeni za ispitivanje antimikrobnih efekata metodom difuzije sa filter diskova.

Svi ispitivani mikroorganizmi su aktivirani u odgovarajućem bujonu, dva puta po 24 h, kako bi se postigla koncentracija od oko  $1 \times 10^7$  CFU/mL. Od svake kulture mikroorganizama po 100 µL suspenzije je zasejano na odgovarajući agar. Na površinu svakog agara postavljeno je po tri filter diska prečnika 6 mm, koji su zatim natopljeni sa po 10 µL suspenzije odgovarajućeg polisaharidnog ekstrakta gljive u DMSO. Kao negativna kontrola su korišćeni diskovi koji su natopljeni samo sa 10 µL DMSO, bez ekstrakata gljiva. Petri šolje sa bakterijama su inkubirane na 37 °C, u toku 24 h, a Petri šolje sa kvascima na 30 °C, 72 h, posle čega su izmereni prečnici zona inhibicije (zajedno sa filter diskovima). Iz svake zone inhibicije uzet je komadić agara i prenet u odgovarajući bujon koji je inkubiran na 37 °C, 24 h za bakterije, odnosno na 30 °C, 72 h

za kvasce. Ukoliko je bujon bio zamućen dejstvo ekstrakta je bilo mikrobiostatsko, a ako je bujon ostao bistar ekstrakt je mikrobicidan. Kao pozitivna kontrola su korišćeni: Tetraciklin (30 µg/disk), Hloramfenikol (30 µg/disk), Neomicin (30 µg/disk), Penicilin (6 µg/disk), Kanamicin (30 µg/disk), Eritromicin (15 µg/disk), Gentamicin (30 µg/disk), Bifonazol (30 µg/disk), Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak", Beograd, Srbija. Svi testovi su urađeni u tri ponavljanja, za svaki ekstrakt i svaki mikroorganizam.

### 3.4.3. MIKRODILUCIONA METODA

Da bi se preciznije odredila antibakterijska aktivnost ispitivanih ekstrakata primenjena je mikrodiluciona metoda (Soković i Van Griensven, 2006). Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC-Minimal Inhibitory Concentration) su određene serijskim razblaživanjem u 96-ćelijskim mikrotitar pločama. Određivanje gustine bakterijskih ćelija kao i ćelija kvasca prethodno je urađeno na McFarland nefelometru (Dalynn Biological Inc.) u odnosu na standard od 0,5 McFarland jedinica, tako da je gustina uzoraka iznosila oko  $1,5 \text{ CFU/mL} \times 10^5$ .

Serijska razblaženja ekstrakta (od 1,25 do 10 mg/mL) su rastvorena u 100 µL odgovarajućeg bujona ispitivanog bakterijskog soja (u koncentraciji 15 µL/mL). Vrednosti 10, 5, 2,5, 1,25 mg/mL dobijene su od početne koncentracije ekstrakta koja je iznosila 10 mg/mL. Mikrotitar ploče su inkubirane 24 h na 37 °C za određivanje antibakterijskog delovanja, a zatim je u svaku ćeliju dodato po 10 µL boje INT (p-jodonitrotetrazolijumviolet, 2-(4-jodofenil)-3-(nitrofenil)-5-feniltetrazolijum-hlorid) kao indikator rasta bakterija. Posle dodavanja boje ploče su mešane 1 min na 700 rpm (Eppendorf thermomixer comfort) i inkubirane 30 min na 37 °C. Najniže koncentracije na kojima nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama su definisane kao MIC. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja.

### **3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Sva merenja su urađena u triplikatima, a dobijene vrednosti su izražene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Eksperimentalni podaci su podvrgnuti jednofaktorskoj analizi varijansi (ANOVA) i Fisher-ovoj najmanje značajnoj razlici (Fisher's LSD) da bi se utvrdila značajnost razlika na nivou  $p \leq 0,05$  između srednjih vrednosti. Određivanje  $EC_{50}$  vrednosti linearnom regresionom analizom urađeno je online pomoću sajta <http://easycalculation.com/statistics/regression.php>. Za statističku analizu korišćen je MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional). Korelacioni koeficijent,  $r$ , između antioksidativne aktivnosti i koncentracije polisaharida, kao i između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola i proteina je određen uz pomoć programa MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional).

## **4. REZULTATI I DISKUSIJA**

Biološki aktivni polisaharidi bazidiomiceta imaju osnovne strukturne karakteristike koje su veoma slične za pojedine vrste. Šta više, različite vrste jednog roda mogu da sintetizuju polisaharide sa sličnom strukturom i načinom grananja osnovnog niza, a takođe i konfiguracijom glikozidnih veza. Postupak ekstrakcije, kao i način prečišćavanja dobijenih frakcija aktivnih polisaharida u mnogo čemu zavisi od vrste bazidiomicete, kao i od željenog biološkog efekta. Izbor ekstrakcionog rastvarača zavisi od mesta dejstva u ćeliji biološki aktivnih supstanci viših gljiva. Tako se, na primer, za supstance koje ispoljavaju svoju aktivnost u unutrašnjosti ćelije upotrebljavaju nepolarni organski rastvarači. Za supstance koje svoju aktivnost ispoljavaju na površini ćelije (glukane specifično prepoznaju i vezuju receptori tipa komplementa, tip 3 na fagocitima i NK ćelijama i Toll grupacija receptora, TLR-2 i TLR-4, zajedno sa Dektin-1 receptorom na leukocitima) upotrebljavaju se vodeni rastvori (Wasser, 2010).

Ekstrakti bazidiomiceta dobijeni termičkim tretmanom vrelom vodom imaju značajnu ulogu u prevenciji i usporavanju malignih procesa, a takođe i u imunoregulaciji. Kako su podaci o antioksidativnim i antimikrobnim svojstvima polisaharidnih ekstrakata bazidiomiceta malobrojni i nedovoljno proučeni, u ovoj tezi je urađeno ispitivanje navedenih svojstava.

### **4.1. IDENTIFIKACIJA GLJIVA**

Identifikacija gljiva sakupljenih u prirodi izvršena je na osnovu makroskopskih (izgled, oblik, boja šešira i drške) i mikroskopskih (oblik i veličina spora) osobina, uz pomoć ključa za identifikaciju gljiva (Phillips, 1994).



#### 4.1.1. GANODERMA APPLANATUM

Karpofori gljiva *Ganoderma applanatum* sakupljeni su u jesen 2008. godine na lokalitetu "Obedska Bara" u blizini Beograda. Ove gljive su rasle pojedinačno, u velikom broju, na oborenom stablu hrasta, po celoj njegovoj površini. Karpofori, koji su se sastojali samo od šešira, imali su lepezast oblik, bili su čvrste, drvenaste strukture do 20 cm širine i do 6 cm debljine, a na gornjoj strani su bile uočljive karakteristične zone (svake godine se formira nova zona). Boja gornje strane karpofora bila je braon, sa belim obodom, a sa donje strane su pore bile bele. Spore su bile braon boje, a mikroskopskim pregledom je uočeno da im je oblik ovoidno-elipsoidan, na jednom kraju su zarubljene, veličine 6-8 x 4-5  $\mu$ . Zidovi su bili deblji, dvostruki, sa ornamentima.

Na osnovu makroskopskih i mikroskopskih karakteristika, (Phillips, 1994), utvrđeno je da ova gljiva pripada vrsti *Ganoderma applanatum*, slika 4.1.



**Slika 4.1.** Karpfor gljive *Ganoderma applanatum*

#### 4.1.2. *TRAMETES VERSICOLOR*

Karpofori gljiva *Trametes versicolor* prikupljeni su u jesen 2008. godine na lokalitetu Košutnjak u Beogradu. Ove gljive su rasle po celoj površini oborenog stabla formirajući žbunove oblika nepotpunih krugova koji se preklapaju. Karpofori koji su se sastojali samo od šešira skoro kružnog oblika bili su tanki, na preseku bele boje, kožasti, savitljivi, fine baršunaste površine, sa koncentričnim zonama koje se smenjuju (drap, braon, žućkasto, boja rđe, crno-plavo, sa belo-krem marginama). Sa donje strane karpofora su bile gusto raspoređene cevčice (2-5 po mm<sup>2</sup>) bele boje, koje na dodir nisu menjale boju, slika 4.2. Spore su bile bele boje, a mikroskopskim pregledom je utvrđeno da su glatke, cilindričnog ili elipsastog oblika, dimenzija 5-6 x 1.5-2 μ.



**Slika 4.2.** Karpofori gljive *Trametes versicolor*

## 4.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

Ekstrakti su podeljeni u dve grupe I-polisaharidni ekstrakti dobijeni ekstrakcijom sa vrelom vodom i alkoholnom precipitacijom i II-ekstrakti koji su nakon alkoholne precipitacije dodatno prečišćeni dijalizom (MWCO: 8000-10000).

### 4.2.1. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA DOBIJENIH VODENOM EKSTRAKCIJOM

Alkoholnom precipitacijom (prvo sa 96%, pa sa 70% etanolom) uklonjeni su šećeri malih molekulskih masa i u etanolu rastvorna fenolna jedinjenja. Tri ekstrakta su dobijena iz praha plodonosnih tela *Agaricus bisporus* (Ab), *Agaricus brasiliensis* (Abr) i *Phellinus linteus* (Pl). Ekstrakt spora *Ganoderma lucidum* (Gl-s-fujian) dobijen ekstrakcijom vrelom vodom nabavljen je kao komercijalni proizvod.

#### 4.2.1.1. POLISAHARIDNE KOMPONENTE

Ukupan sadržaj polisaharida u ispitivanim ekstraktima, kao i ukupan sadržaj glukana, a zatim i sadržaj  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana prikazani su u tabeli 4.1. Sadržaj ukupnih polisaharida značajno se razlikovao u pojedinim ekstraktima; od 27,6 g/100g suve mase za ekstrakt iz spora gljive *G. lucidum* do 74,4 g/100g za ekstrakt dobijen iz plodonosnih tela gljive *A. bisporus*. Koncentracija polisaharida, kao bioaktivnih materija, veoma zavisi od faze razvoja plodonosnog tela, vremenskog perioda koji je protekao od branja do ispitivanja kao i od uslova čuvanja (Jong i Birmingham, 1992; Minato et al., 1999; Minato et al., 2001). Nizak prinos polisaharida u ekstraktima *G. lucidum* se i mogao očekivati s obzirom na čvrstu konzistenciju spora (Chen et al., 1998).

Iz prikazanih rezultata može se videti da se sadržaj ukupnih glukana signifikantno razlikovao u zavisnosti od vrste gljive, odnosno ispitivanog ekstrakta. Sadržaj  $\alpha$ -glukana varirao je u opsegu od 2,7 do 19,6 g/100g suve mase. Procenat  $\alpha$ -glukana u odnosu na ukupan sadržaj glukana imao je najveću vrednost u ekstraktu spora gljive *G. lucidum*-iznosio je 94,2%. Ova vrednost je očekivana, s obzirom da je poznato da se u sporama nalazi visok sadržaj rezervnog polisaharida, glikogena, koji je neophodan za dalji rast i

razvoj. U ekstraktima iz plodonosnih tela glukani su bili prevashodno povezni  $\beta$ -glikozidnim vezama, (56,9-91,2%).

**Tabela 4.1.** Ukupan sadržaj polisaharida i glukana u polisaharidnim ekstraktima *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt spora) i *P. linteus*

Vrsta gljive	Ukupan sadržaj polisaharida (g/100g)	Sadržaj glukana (g/100g) <sup>a</sup>		
		Ukupan	$\alpha$	$\beta$
<i>A. bisporus</i>	74,4 ± 2,1 A <sup>b</sup>	63,8 ± 0,9 A	5,6 ± 0,2 C	58,2 ± 0,9 A
<i>A. brasiliensis</i>	45,9 ± 0,7 C	40,1 ± 1,0 B	17,3 ± 0,3 B	22,8 ± 0,4 B
<i>G. lucidum</i> spore (kom.)	27,6 ± 1,2 D	20,8 ± 0,5 D	19,6 ± 0,4 A	1,2 ± 0,7 C
<i>P. linteus</i>	62,6 ± 0,3 B	24,5 ± 1,3 C	2,7 ± 0,6 D	21,8 ± 1,7 B

<sup>a</sup> Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

<sup>b</sup> Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher`s LSD

Visok sadržaj  $\alpha$ -glukana,  $10,88 \pm 1,52\%$ , pronađen je u suvim plodonosnim telima gljive *A. blazei* Murill (syn. *A. brasiliensis*), (Lee i Kim, 2005). Korišćenjem enzimskog kita za određivanje sadržaja glukana (*Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay Procedure*), utvrđeno je da je kod različitih jestivih gljiva sadržaj  $\alpha$ -glukana najčešće bio ispod 1% računato sa suhu masu (Lee i Kim, 2005). Ispitivanjem sadržaja glikogena u micelijumu gljive *Phycomyces blakesleanus* utvrđeno je da njegova vrednost veoma zavisi od spoljašnjih i nutritivnih uslova u kojima se uzgaja gljiva. U sporama ove gljive su pronađene veoma male količine glikogena (Rua et al., 1993).  $\alpha$ -glukani se kao intracelularne rezervne materije lako ekstrahuju, za razliku od  $\beta$ -glukana koji su strukturne komponente ćelijskog zida gljiva. Visok sadržaj  $\alpha$ -glukana (~90%) potvrđen je u polisaharidnom ekstraktu dobijenom iz drški plodonosnih tela gljive *A. bisporus* (Smiderle et al., 2010). Polisaharidni ekstrakt *A. bisporus* koji je korišćen u ovom radu dobijen je ekstrakcijom plodonosnih tela.

Ukupan sadržaj  $\beta$ -glukana u ekstraktima gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i *G. lucidum* iznosio je 58,2, 22,8, 21,8 i 1,2 g/100g suve mase ekstrakta, respektivno. Korišćenjem iste metode utvrđeno je da se sadržaj  $\beta$ -glukana u različitim jestivim

gljivama nalazio u opsegu od  $4,7 \pm 0,6$  do  $46,2 \pm 0,3\%$ , računato sa suhu supstancu (Lee i Kim, 2005).

Istim postupkom, ali drugačijim načinom ekstrakcije (*tungsten carbide nano-particle extraction*) utvrđeno je da je sadržaj  $\beta$ -glukana kod gljiva *Sparassis crispa* i *Phellinus linteus* bio  $70,2 \pm 5,4\%$  i  $65,2 \pm 5,9\%$  (Park et al, 2009). Yap i Ng-u (2001) su ekstrakcijom polisaharida lentinana iz bazidiomicete *Lentinula edodes* vreloom vodom, taloženjem sa 96% etanolom i liofilizacijom taloga, a zatim ponavljanjem celog postupka na koncentrovanom talogu, dobili ekstrakt čija je čistoća iznosila 87,5% u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida.

Velike razlike u ukupnom sadržaja  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana, kako u celim gljivama tako i u njihovim polisaharidnim ekstraktima, mogu se pronaći u različitim istraživanjima (Manzi i Pizzoferrato, 2000; Park et al. 2009).

#### 4.2.1.2. UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA

Značajan procenat ćelijskog zida gljiva iz klase *Basidiomycetes* čine glukani i njihovi proteinski kompleksi (Boldizsar, 1998).

Ukupan sadržaj proteina u polisaharidnim ekstraktima gljiva *A. bisporus*, *G. lucidum*, *P. linteus* i *A. brasiliensis* prikazan je u tabeli 4.2. Ekstrakcija vreloom vodom i alkoholna precipitacija nisu bile dovoljne za potpunu deproteinizaciju polisaharidnih ekstrakata. Razlika u ukupnom sadržaju proteina ispitivanih ekstrakata bila je statistički značajna,  $p \leq 0,05$ . Procenat proteina u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida izračunat je na osnovu sledeće formule:

---

Izračunate vrednosti za ekstrakte gljiva *A. bisporus*, *G. lucidum*, *P. linteus* i *A. brasiliensis* nalazile su se u granicama od 0,4 do 15,9% i iznosile su  $1,3 \pm 0,1\%$ ,  $9,5 \pm 0,3\%$ ,  $9,0 \pm 0,4\%$  i  $15,9 \pm 0,6\%$ , respektivno.

**Tabela 4.2.** Ukupan sadržaj proteina i fenola u polisaharidnim ekstraktima dobijenim vrelom vodenom ekstrakcijom basidiomiceta *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt spora) i *P. linteus*

Vrsta gljive	Ukupan sadržaj proteina (g/100g)	Ukupan sadržaj fenola (g/100g) <sup>a</sup>
<i>A. bisporus</i>	0,9 ± 0,1 D <sup>b</sup>	<b>0,4 ± 0,04 D</b>
<i>A. brasiliensis</i>	7,3 ± 0,4 A	<b>1,2 ± 0,2 C</b>
<i>G. lucidum spore (kom.)</i>	2,6 ± 0,1 C	<b>5,6 ± 0,2 B</b>
<i>P. linteus</i>	5,7 ± 0,3 B	<b>8,4 ± 0,5 A</b>

<sup>a</sup> Sve vrednosti su izražene na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije ( $n=3$ )

<sup>b</sup> Unutar iste kolone, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0.05$ , ANOVA, Fisher's LSD

#### 4.2.1.3. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA

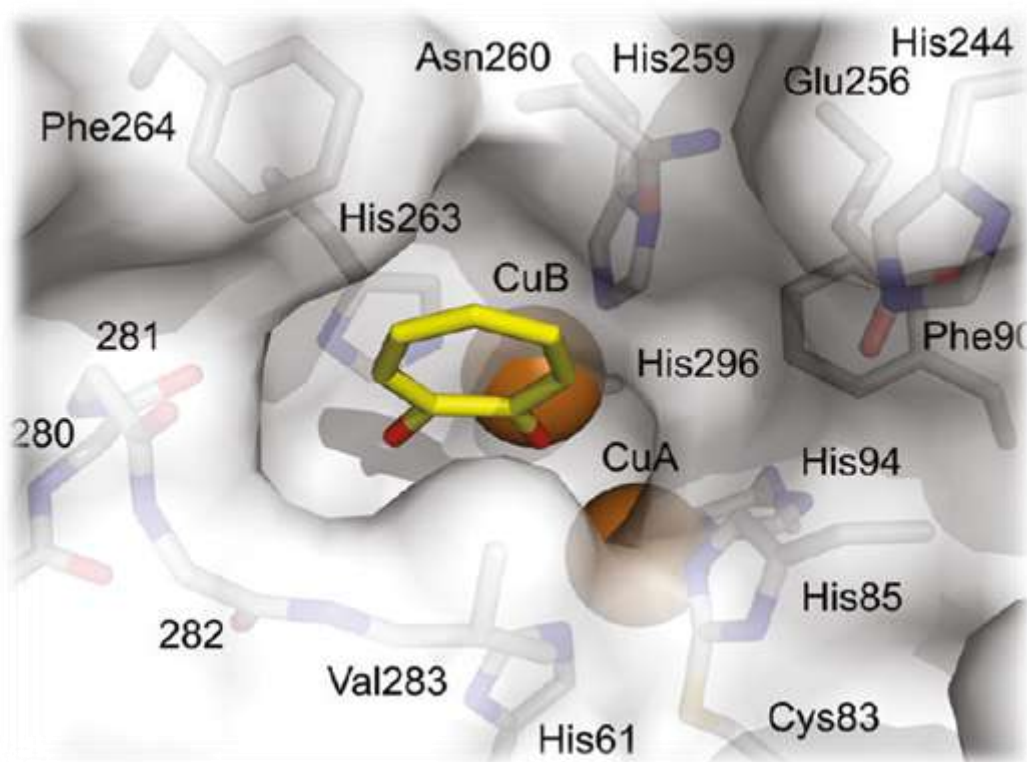
Analizom sadržaja ukupnih fenola utvrđeno je prisustvo ovih jedinjenja u ekstraktima dobijenim termičkim tretmanom vrelom vodom, tabela 4.2. Intenzitet obojenosti ekstrakta je u pozitivnoj korelaciji sa povećanjem sadržaja ukupnih fenola (veći sadržaj fenola–tamnija boja ekstrakta).

Fenolna jedinjenja su prisutna u voću i povrću, čaju, kafi, kakau, gljivama, kod morskih životinja, školjki (škampi) i rakova (jastog). Pored toga što daju boju, ukus i miris, ova jedinjenja imaju i suštinsku ulogu u procesima tamnjenja biljnog tkiva, kada dolazi do njegovog oštećenja. U toku procesa čuvanja i obrade biljnog materijala (sečenja ili nekog drugog mehaničkog oštećenja) kada dolazi do oštećenja biljnog tkiva i razaranja ćelija javlja se tamnjenje tkiva, tzv. proces enzimskog tamnjenja (*enzymatic browning*). Ovaj proces je katalizovan fenol oksidazama, enzimima koji su široko rasprostranjeni na filogenetskoj lestvici i katalizuju hidroksilovanje monofenola i/ili *o*-difenola, koji se dalje oksiduju u derivate *o*-hinona i polimerizacijom formiraju obojene pigmente braon boje (Prota, 1992; Van Gelder i Flurkey, 1997). Proces enzimskog tamnjenja je od suštinskog značaja za boju i ukus čaja, kafe i čokolade (<http://www.food-info.net/uk/colour/enzymaticbrowning.htm>).

Na osnovu strukturne analogije sa oksidovanim derivatima monofenola koji se javljaju kao intermedijerni proizvodi kod oštećenja biljnog tkiva moguće je da se u toku



dobijanja polisaharidnih ekstrakata gljiva, kada takođe dolazi do oštećenja tkiva u kojima su prisutna fenolna jedinjenja (Russell i Paterson, 2006), pod dejstvom fenol oksidaza (slika 4.3.) javlja oksidacija fenola (tirozin, katehol, DOPA, dopamin, adrenalin, noradrenalin) što rezultira tamnijom bojom ekstrakata (Fenoll et al., 2000; Fenoll et al., 2000a). Boja dobijenih ekstrakata ukazuje da su oksidovana fenolna jedinjenja i dalje bila prisutna u polisaharidnim ekstraktima, bez obzira na primenjen postupak ekstrakcije koji nije karakterističan za izolovanje ovih jedinjenja. Uočeno je da se sa starenjem ćelija menja građa i hemijski sastav ćelijskog zida gljiva. Starije ćelije karakteriše slojeviti zid koji je zadebljao na svojim unutrašnjim stranama, u njegov sastav ulaze pigmenti i druge materije koje se ne nalaze u ćelijskom zidu mladih ćelija (<http://www.bionet-skola.com/w/Gljive>).



**Slika 4.3.** Aktivni centar tirozinaze (EC 1.14.18.1) gljive *Agaricus bisporus* (Ismaya et al., 2011)

Procenat ukupnih fenola u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida izračunat je pomoću sledeće formule:

---

Dobijene vrednosti u ekstraktima gljiva *A. bisporus*, *G. lucidum*, *P. linteus* i *A. brasiliensis* iznosile su  $0,5 \pm 0,0\%$ ,  $20,4 \pm 0,9\%$ ,  $13,5 \pm 0,7\%$  i  $2,6 \pm 0,1\%$ .

#### 4.2.1.4. FT-IR SPEKTROSKOPIJA

FT-IR spektri ekstrakata izolovanih iz plodonosnog tela gljiva *A. bisporus* (Ab), *A. brasiliensis* (Abr), *P. linteus* (Pl) i spora *G. lucidum* (Gl-s-fujian) pokazuju izgled tipičan za polisaharide sa sličnim strukturnim karakteristikama. Ekstrakti sadrže smešu/komplekse polisaharida, proteina i polifenola, slika 4.4.

FT-IR spektar ekstrahovanih polisaharida plodonosnog tela gljive *A. brasiliensis* pokazuje karakterističnu široku traku u oblasti  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  koja je rezultat valentnih vibracija OH grupa koje učestvuju u formiranju jakih inter- i intramolekulskih veza kao i valentnih vibracija OH grupa molekula konstitucione vode. Trake u oblasti  $1000-1200\text{ cm}^{-1}$  mogu se pripisati valentnim vibracijama C–O i C–C veza kao i deformacionim vibracijama CCH, COH i HCO veza; traka na oko  $1028\text{ cm}^{-1}$  odnosi se na C–O valencionu vibraciju istežanja, apsorpcioni pik na  $1153\text{ cm}^{-1}$  indicira C–O–C valentne vibracije, dok je traka na  $1079\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za prisustvo  $\beta$ -glukana odnosno O-supstituisanih glukopiranoznih ostataka (Mathlouthi i Koenig, 1986; Stone i Clarke, 1992). Mala količina proteina takodje je prisutna, što se jasno vidi na osnovu karakterističnih traka za proteine na  $1635\text{ cm}^{-1}$ ,  $1540\text{ cm}^{-1}$  kao i trake na  $1412\text{ cm}^{-1}$ . Traka na  $1635\text{ cm}^{-1}$  preklapa se sa apsorpcijom aromata, najverovatnije polifenola, što indicira prisustvo pigmenta, na šta ukazuje i traka u oblasti  $1410\text{ cm}^{-1}-1310\text{ cm}^{-1}$  koja korespondira sa valentnim vibracijama OH grupa fenolnih jedinjenja. Tipična N–H vibracija koja se odnosi na proteine nalazi se na oko  $3400\text{ cm}^{-1}$  i preklapa se sa OH valentnim vibracijama u oblasti  $3000\text{ cm}^{-1} - 3500\text{ cm}^{-1}$  (Carey, 1992).

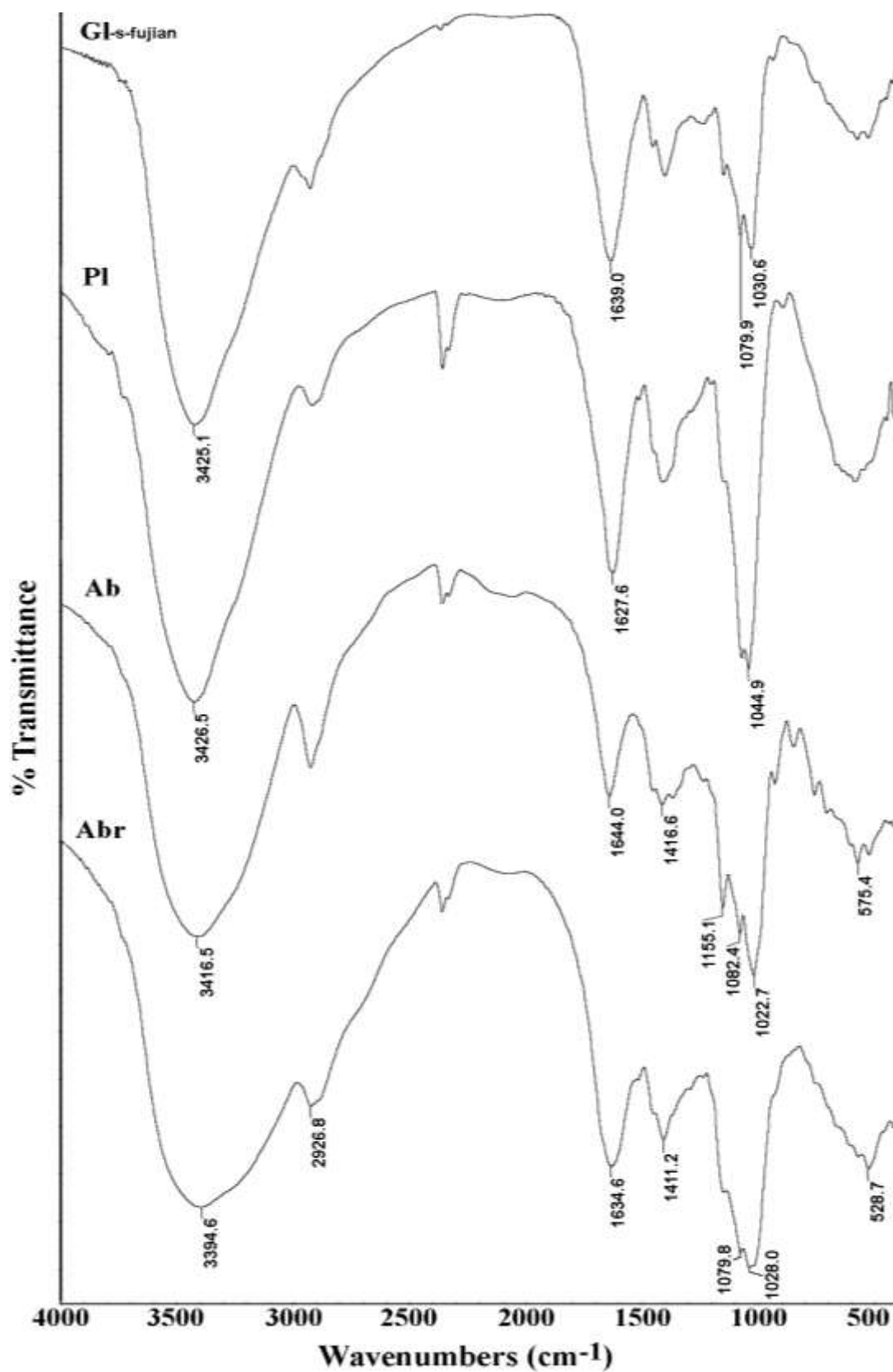
Spektar polisaharidnog ekstrakta izolovanog iz spora gljive *G. lucidum* pokazuje karakterističan pik na oko  $850\text{ cm}^{-1}$  koji je indikativan za  $\alpha$ -glikozil ostake, slika 4.4.



Apsorpciona traka na  $1080\text{ cm}^{-1}$  indicira  $\beta$ -glikozidne veze kojima su medjusobno povezane glukopiranozne monomerne jedinice. Karakteristična traka koja se odnosi na OH valentne vibracije istezanja na  $3000\text{ cm}^{-1}$  -  $3500\text{ cm}^{-1}$  kao i traka uslovljena C-O-C valentnim vibracijama na  $1153\text{ cm}^{-1}$  su takodje prisutne, kao i apsorpcioni pikovi na  $1639\text{ cm}^{-1}$  i na  $1242\text{ cm}^{-1}$  koji se odnose na prisustvo manje količine proteina. Intenzivna traka na  $1639\text{ cm}^{-1}$  preklapljen je sa odgovarajućom C=C trakom aromatičnih jedinjenja koja potiče od prisutnih pigmenata.

FT-IR spektar polisaharida izolovanih iz gljive *P. linteus* pokazuje trake koje su karakteristične za glikozidne strukture, kao što su široka traka sa maksimumom na oko  $3300\text{ cm}^{-1}$ , traka na  $1155\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara C-O-C vibracijama, slaba traka na  $890\text{ cm}^{-1}$  koja se odnosi na  $\beta$ -vezane glikozil ostatke osnovnog niza, odnosno na aksijalno orijentisanu C<sub>1</sub>-H vezu. Traka na  $1074\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo  $\beta$ -glikozidnih veza u heksapiranoznom nizu, slika 4.4. Dodatno, intenzivna traka sa maksimumom na  $1628\text{ cm}^{-1}$  može da ukazuje na preklapanje sa trakom koja je karakteristična za apsorpciju aromata, što bi ukazivalo na prisustvo pigmenata. Široka traka u regionu  $1410\text{ cm}^{-1}$  -  $1310\text{ cm}^{-1}$  se odnosi na OH grupe fenolnih jedinjenja i potvrđuje prisustvo pigmenata u ispitivanom polisaharidnom ekstraktu.

Spektar polisaharidnog ekstrakta gljive *A. bisporus* pokazuje karakteristične trake koje se odnose na polisaharidne strukture, kao što su frekvencije OH grupa na  $3000\text{ cm}^{-1}$  -  $3500\text{ cm}^{-1}$ , valentne vibracije C-O veza na  $1023\text{ cm}^{-1}$ , kao i traka na  $1155\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za vibracije istezanja C-O-C veze. Ovaj spektar pokazuje i slabu traku na  $850\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za ekvatorijalno orijentisanu C<sub>1</sub>-H vezu, odnosno za  $\alpha$ -D-glikozidne veze. Apsorpciona traka na  $1082\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo  $\beta$ -glukopiranoznih jedinica u osnovnom nizu polisaharida. Manje količine proteina i pigmenata su takodje prisutne, na šta ukazuju preklapljene trake ovih jedinjenja sa maksimumom apsorpcije na oko  $1640\text{ cm}^{-1}$ , dok traka u oblasti na oko  $1400\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo alifatičnih grupa u fenolnim jedinjenjima.



**Slika 4.4.** FT-IR spektri polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *A. bisporus* (Ab); *A. brasiliensis* (Abr); *P. linteus* (Pl); i spora gljive *G. lucidum* (GI-s-fujian)

#### 4.2.1.5. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA

Ukupan sadržaj azota (N), ugljenika (C) i kiseonika (O) u polisaharidnim ekstraktima gljiva *A. bisporus*, *P. linteus*, *A. brasiliensis*, i *G. lucidum* prikazan je u tabeli 4.3.

**Tabela 4.3.** Rezultati elementalne organske mikroanalize polisaharidnih ekstrakata gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum*, *P. linteus*

Ekstrakt	N <sup>1</sup> (g/100g)	C (g/100g)	H (g/100g)
<i>A. bisporus</i>	0,62	38,58	6,77
<i>P. linteus</i>	0,94	39,53	6,10
<i>A. brasiliensis</i>	3,05	36,13	6,26
<i>G. lucidum spore (kom.)</i>	3,99	42,38	6,52

<sup>1</sup>Svi rezultati određivanja su srednje vrednosti dva nezavisna određivanja

Sadržaj ukupnog N je varirao od 0,62 do 3,99 g/100g suve mase ekstrakta u zavisnosti od vrste gljive. Kurtzman (1997) je u svojim istraživanjima potvrdio velike razlike u sadržaju N za različite vrste gljiva, kao i za različite uzorke gljiva u okviru jedne vrste. Utvrđeno je da je sadržaj N kod *A. bisporus* varirao od 0,43 do 0,79 g/100g, dok su ove promene za *P. ostreatus* i *L. edodes* bile nešto manje i nalazile su se u granicama od 0,25-0,34 g i 0,49-0,52 g/100 g.

Određivanje sadržaja proteina iz sadržaja ukupnog N je komplikovan postupak kada su u pitanju gljive. Naime, kod gljiva je prisutna relativno velika količina neproteinskog N, koji se prvenstveno odnosi na hitin koji je jedna od komponenti ćelijskog zida, kao i na slobodne amino kiseline i nukleinske kiseline. Samo oko 60–77% N kod gljiva se nalazi vezano u proteinima (Matilla et al., 2002; Fujihara et al., 1995), te je stoga konverzioni faktor (Nitrogen to Protein Factor–NP Factor) od 6,25 koji se uobičajeno koristi za preračunavanje sadržaja ukupnih proteina iz sadržaja ukupnog N suviše visok za gljive i nije u upotrebi. Mattila et al., (2002) su potvrdili NP vrednost od 4,55 za *A. bisporus* do 4,97 za *P. ostreatus*. Fujihara et al., (1995) su za *P. ostreatus* dobili značajno niži NP faktor, 4,15, dok je Kurtzman (1997) predložio NP faktor od 5,0 za *A. bisporus*, *P. ostreatus* i *L. edodes*.

NP faktori koji se najčešće upotrebljavaju kada su u pitanju gljive su 4,38 (70% N x 6,25) i 4,17 (Matilla et al., 2002).

Rezultati koji se odnose na ukupan sadržaj proteina u polisaharidnim ekstraktima gljiva *A. bisporus*, *P. linteus*, *A. brasiliensis*, i *G. lucidum* spora, kada su korišćene vrednosti od 4,38 i 4,70 za NP prikazani su u tabeli 4.4.

**Tabela 4.4.** Sadržaj proteina u ispitivanim ekstraktima na osnovu rezultata elementalne analize

<i>Ekstrakt</i>	<sup>a</sup> Sadržaj proteina (g/100g)	<sup>b</sup> Sadržaj proteina (g/100g)
<i>A. bisporus</i>	2,71	2,91
<i>P. linteus</i>	4,12	4,41
<i>A. brasiliensis</i>	13,36	14,34
<i>G. lucidum spore (kom.)</i>	17,48	18,75

a: vrednost NP=4,38; b: NP=4,17

Poređenjem dobijenih vrednosti sa ukupnim sadržajem proteina dobijenim Bradfordovom metodom, može se zaključiti da su dobijene vrednosti znatno više, osim u slučaju polisaharidnog ekstrakta gljive *P. linteus*, tabela 4.2. Rezultati su ukazali da je iz ukupnog sadržaja N teško odrediti pravu vrednost sadržaja proteina u ispitivanim polisaharidnim ekstraktima. Rezultati takođe ukazuju na prisustvo N neproteinske prirode u ekstraktima, prvenstveno fenolnih jedinjenja, koja u svojoj strukturi sadrže atome N, kao što su melanin i njegovi prekusori, koji zajedno sa polisaharidima i proteinima izgradjuju ćelijski zid gljiva (Harky et al., 1997).

Na FT-IR spektru, slika 4.4., polisaharidnog ekstrakta spora gljive *G. lucidum* jasno se uočava veoma intenzivna traka na  $1639\text{ cm}^{-1}$  koja se odnosi na prisustvo proteina i odgovarajućih aromatičnih jedinjenja (pigmenata). Sadržaj proteina u polisaharidnom ekstraktu spora *G. lucidum* je bio 2–3 puta niži od sadržaja proteina u ekstraktima plodonosnih tela gljiva *P. linteus* i *A. brasiliensis*, tabela 4.2. Sadržaj elementarnog N u ekstraktu spora gljive *G. lucidum* bio je najviši, što jasno ukazuje na prisustvo neproteinskog azota.

Na FT-IR spektru ekstrakta gljive *A. bisporus* intenzitet trake na  $1640\text{ cm}^{-1}$  koja se odnosi na proteine i pigmente znatno je smanjen u odnosu na istu traku u ostalim

ekstraktima. U ovom ekstraktu je pronađen najmanji sadržaj proteina i elementarnog N, tabele 4.2. i 4.3.

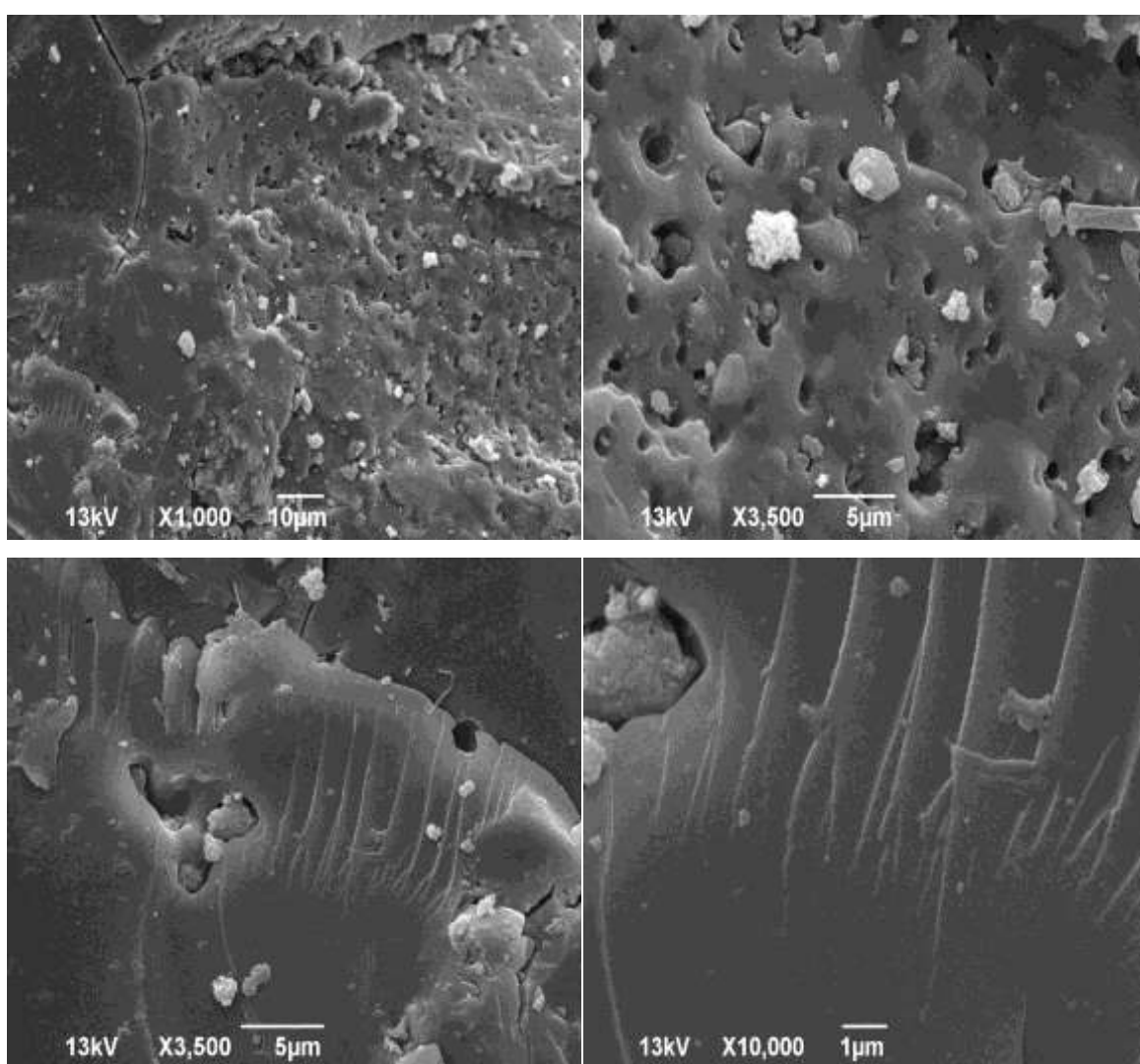
#### 4.2.1.6. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Mikrostrukture polisaharidnih ekstrakata, snimljene SEM-om pokazale su strukturnu raznolikost. Na slici 4.6. može se jasno uočiti hrapava površina ekstrakta gljive *A. brasiliensis*, što je posledica denaturacije prisutnih proteina u toku samog procesa ekstrakcije (Widjanarko et al., 2011). Mogu se uočiti pojedinačne štapičaste strukture širine od 180-260 nm, kao i štapičaste helikoidne strukture koje formiraju mrežu. Formiranje mrežastih struktura polisaharidnih molekula je posledica vodoničnih interakcija između pojedinačnih polisaharidnih molekula. Biološki aktivni polisaharidi iz ćelijskog zida viših gljiva imaju konformaciju trostrukog heliksa (Sletmoen i Stokke, 2008). Formiranje mrežastih struktura, gelova, karakteristično je za agarozu, karagenan i gelan (Ikeda i Shishido, 2005). U zavisnosti od temperature nastaju takozvani nisko i visoko grupisani gelovi, koji se razlikuju po čvrstini. Kod visoko grupisanih gelova dolazi do formiranja trodimenzionalnih mreža usled hidrofobnih interakcija između polisaharidnih helikoidnih struktura koje se prepliću što im daje veću čvrstinu (primer kurdiana na 95 °C). Kod nisko grupisanih gelova dolazi do grupisanja polisaharidnih heliksa međusobnim vodoničnim interakcijama (Marieta i Duenas, 2010; Funami et al., 1999). U nekim slučajevima utvrđeno je da polisaharidi velikih molekulskih masa mogu da formiraju agregate koji mogu da maskiraju ponašanje pojedinačnih makromolekula.

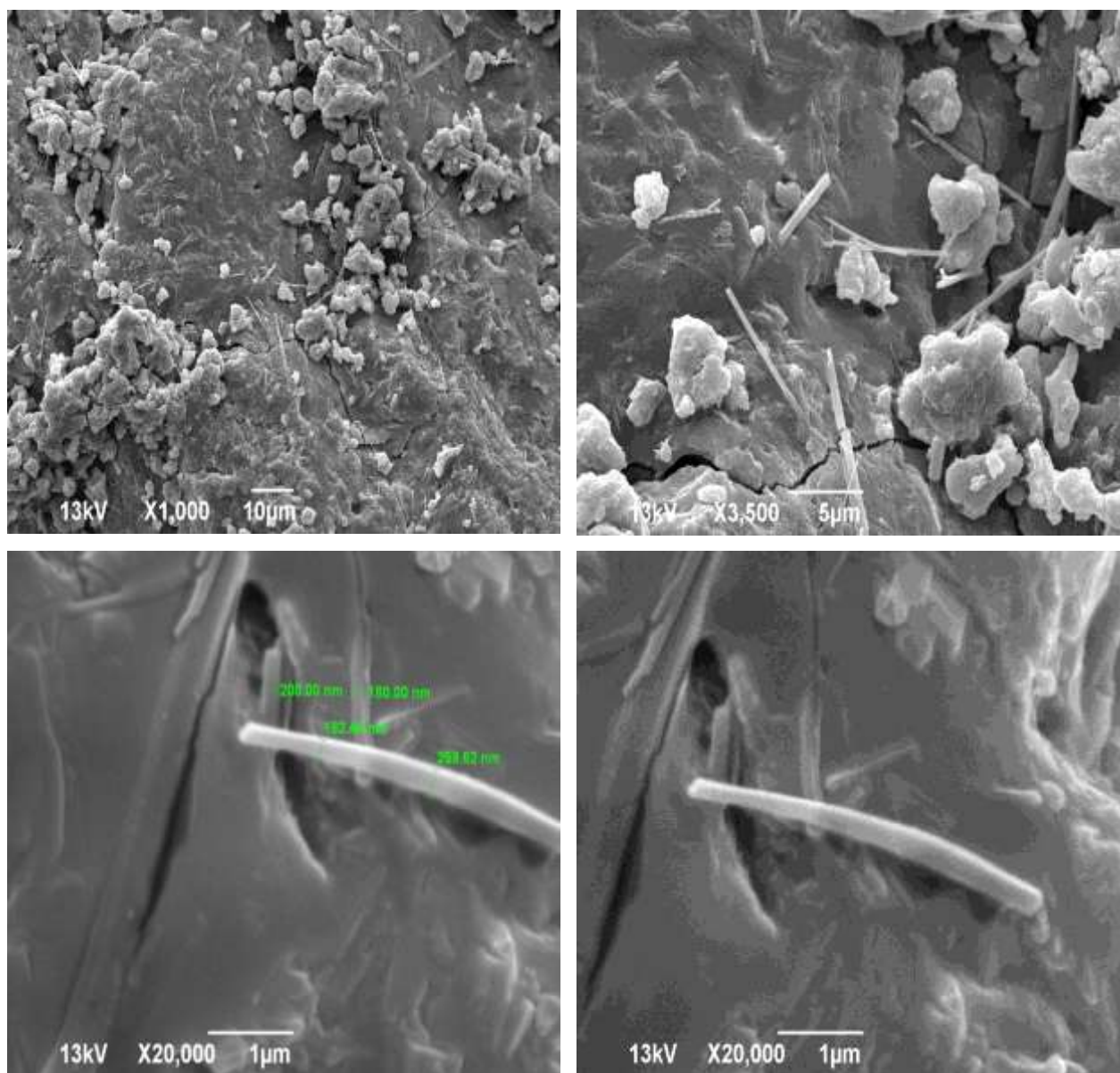
Na slikama 4.5. i 4.8. uočava se porozna mrežasta struktura polisaharidnih ekstrakata gljiva *A. bisporus* i *P. linteus*. Kod ekstrakta gljive *P. linteus* površinska struktura je uniformnija, veličina pora je manja. Poroznost je uslovljena vodoničnim interakcijama između C-O fragmenata polisaharida i N-H fragmenata proteinskih molekula (Widjanarko et al., 2011). Nakon dodatka glukomanana iz *Amorphophallus konjac* C. Koch., proteinskom izolatu, površinska struktura postaje više glatka, veličina pora manja i uniformnija (Widjanarko et al., 2011).

Porozna, mrežasta struktura ovih ekstrakata može potencijalno da utiče na njihovu primenu kao zgušnjavajućih, odnosno gelirajućih agenasa.

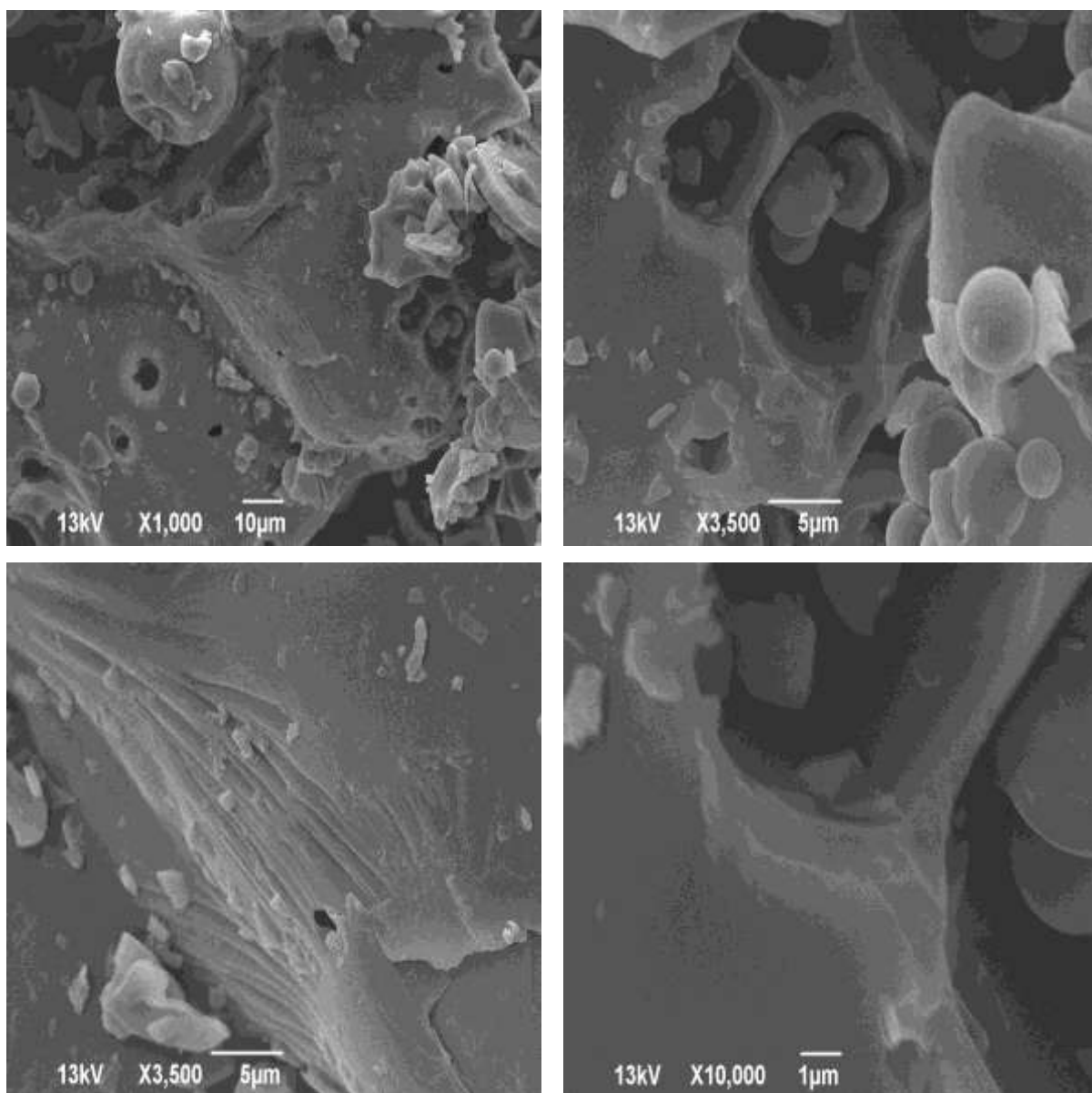
Na mikrografiji polisaharidnog ekstrakta izolovanog iz spora gljive *G. lucidum* (slika 4.7.) uočljive su strukture koje po svojoj morfologiji i veličini odgovaraju molekulima melanina, slika 4.9. Melanin je komponenta ćelijskog zida gljiva koja ima višestruku ulogu; pojačava jačinu ćelijskog zida, štiti od ultravioletnog zračenja, toplote i hladnoće, teških metala i smanjuje osetljivost gljiva prema ameboidnim predatorima. Zbog prisustva nesparenih elektrona u svojoj polimernoj strukturi ovaj molekul ima ulogu u procesima hvatanja slobodnih radikala (Eisenman et al., 2007).



**Slika 4.5.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta iz gljive *A. bisporus*, uvećanju 1000, 3500 i 10000 puta

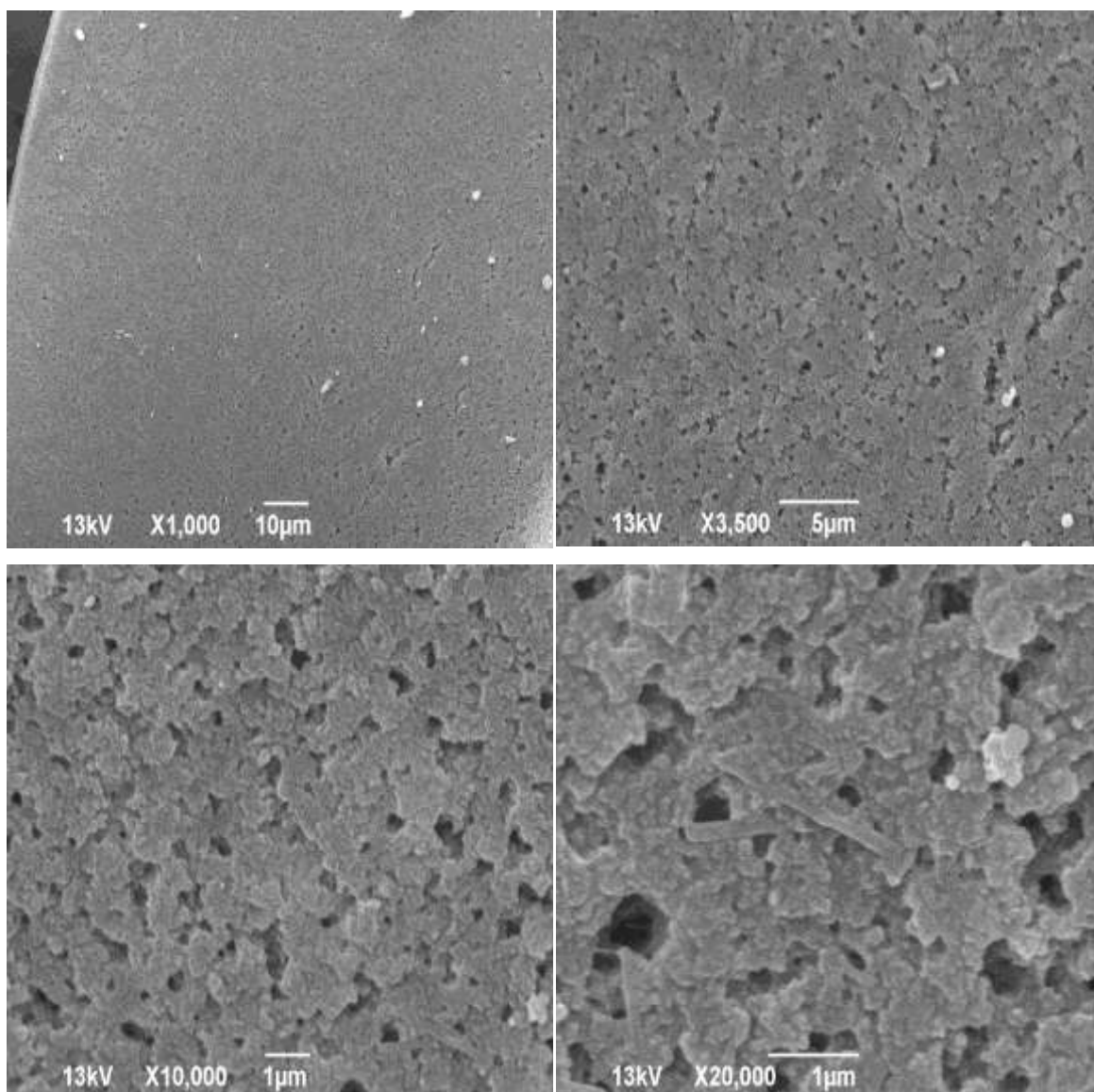


**Slika 4.6.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta gljive *A. brasiliensis*, uvećanju 1000, 3500 i 20000 puta

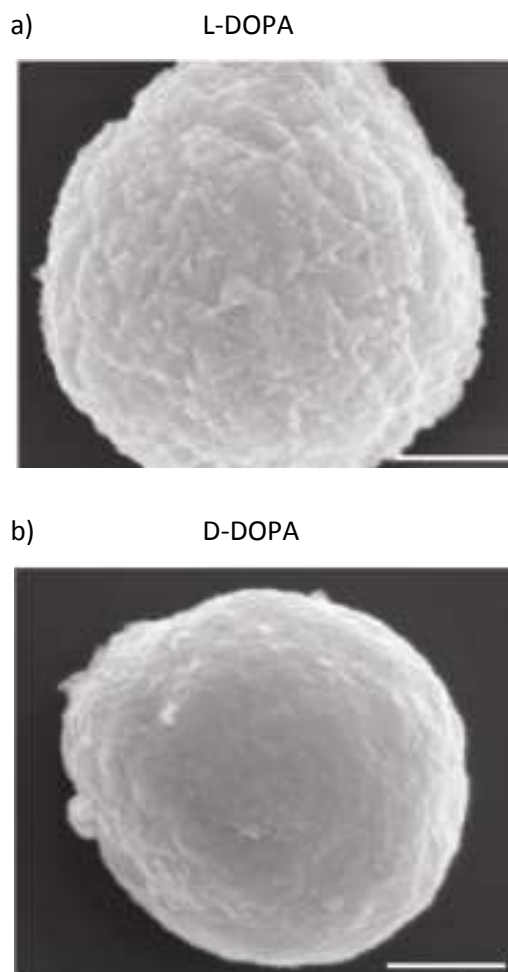


**Slika 4.7.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta spora gljive *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt), uvećanju 1000, 3500 i 10000 puta





**Slika 4.8.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta gljive *P. linteus*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta



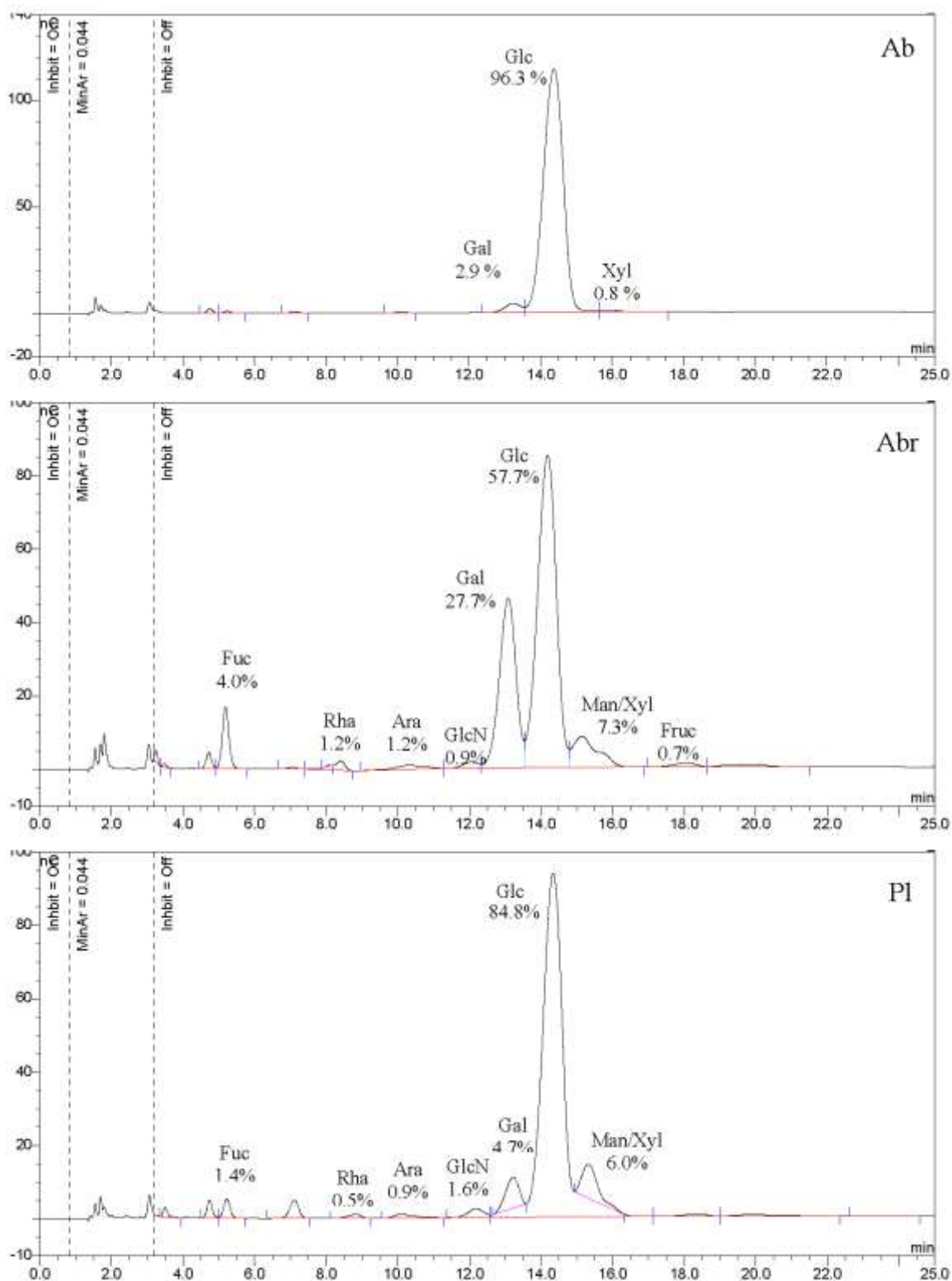
**Slika 4.9.** SEM mikrografije melanina iz *Cryptococcus neoformans* nastalog od prekursora L- i D-DOPA (a, b). Skala, 1  $\mu\text{m}$ . (Eisenman et al., 2007)

#### 4.2.1.7. TEČNA HROMATOGRAFIJA ISPITIVANIH UZORAKA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

HPLC hromatogrami monosaharidnih komponenti hidrolizovanih polisaharida gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis* i *P. linteus* prikazani su na slici 4.10.

Polisaharidi ekstrahovani iz gljiva *A. bisporus* i *P. linteus* su najvećim delom (> 85%) sadržavali glukozu (Glc) pri čemu su u manjem procentu bile prisutne galaktoza (Gal) i ksiloza (Xyl). Polisaharidi gljive *A. brasiliensis* su pored Glc (58%) sadržavali značajne količine Gal (28%), Man/Xyl (7%), Fuc (4%) i male količine ramnoze (Rha), arabinoze (Ara), fruktoze (Fru) i glukozamina (GlcN) (~1% od svakog). GlcN je u polisaharidima prisutan u obliku N-acetilglukozamina (GlcNAc) koji je nakon kisele hidrolize (sa TFA) prešao u GlcN.

Na osnovu LC/MS analize uzoraka polisaharidnih hidrolizata gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora gljive *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt), utvrđeno je da svi hidrolizovani uzorci sadrže u najvećoj količini glukozu (na retencionom vremenu od 3,17 min nađeni su joni koji odgovaraju ovom jedinjenju). U uzorcima gljiva *A. brasiliensis* i *P. linteus* utvrđeno je prisustvo galaktoze, manoze, ksiloze, fukoze, ramnoze, arabinoze (u manjim količinama) i fruktoze (u tragovima). U polisaharidima iz spora gljive *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) kao dominantna monosaharidna komponenta utvrđena je glukoza, dok su galaktoza i manoza bile prisutne u tragovima. Kod gljive *A. bisporus* su izolovani polisaharidi, pored glukoze, sadržavali malu količinu galaktoze i u tragovima prisutne monosaharide: manozu, ksilozu i arabinozu.



**Slika 4.10.** HPLC hromatogrami monosaharidnih komponenti u hidrolizatima polisaharidnih ekstrakata izolovanih iz gljiva *A. bisporus* (Ab), *A. brasiliensis* (Abr) i *P. linteus* (Pl)

#### 4.2.1.8. PLANARNA HROMATOGRAFIJA

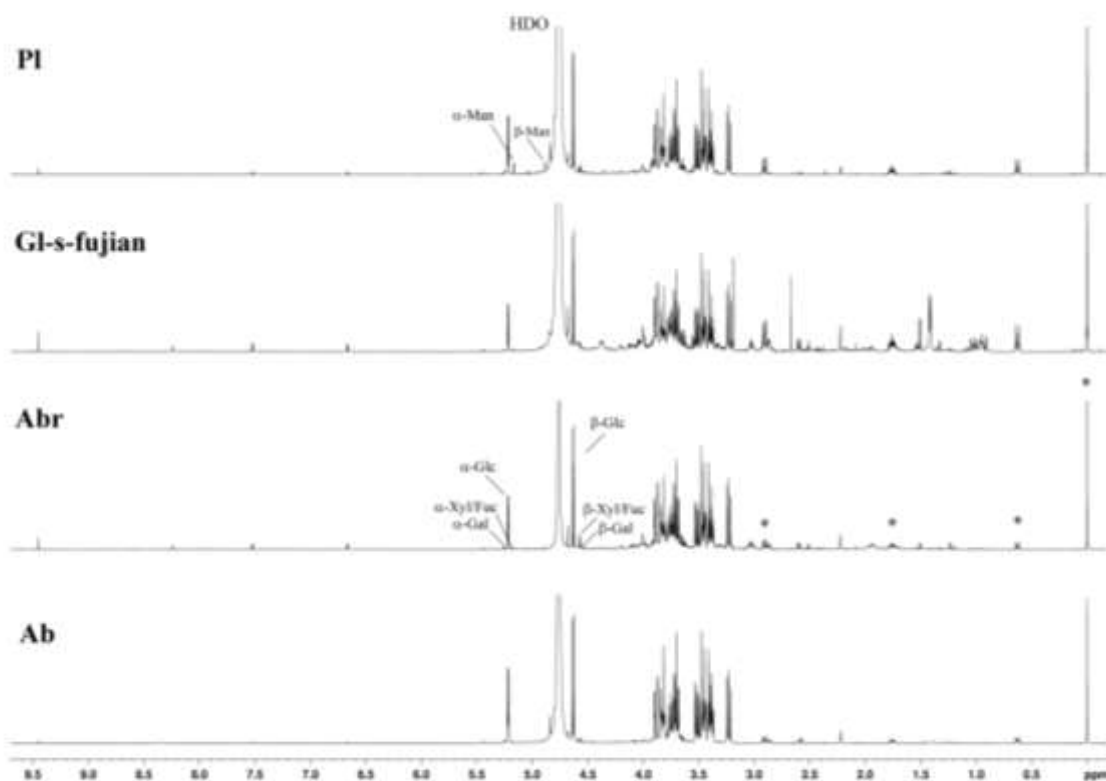
Nakon analize polisaharidnih ekstrakata gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt), PC i TLC hromatografijom, u poređenju sa standardima, utvrđeno je da ispitivani uzorci sadrže D-glukoze kao dominantnu komponentu, dok su znatno manje bile zastupljene D-galaktoza, D-manoza, D-ramnoza, D-arabinoza i L-fukoza.

U hidrolizovanom polisaharidnom ekstraktu gljive *P. linteus*, pored glukoze, potvrđeno je prisustvo galaktoze, manoze, arabinoze, ksiloze i fukoze u manjim količinama, dok je u ekstraktu gljive *G. lucidum* preovlađujuća monosaharidna komponenta bila glukoza, pored koje su se u tragovima nalazile galaktoza, manozna i ramnoza.

U ekstraktu gljive *A. bisporus* pored najviše zastupljene glukoze, potvrđeno je prisustvo galaktoze, manoze i fukoze u tragovima. Kod gljive *A. brasiliensis*, pored dominantne glukoze, u manjim količinama su pronađene galaktoza i manozna, kao ramnoza, arabinoza, ksiloza i fukoza u tragovima. Prisustvo uronskih kiselina nije potvrđeno ni u jednom ekstraktu.

#### 4.2.1.9. NMR SPEKTROSKOPIJA

<sup>1</sup>H-NMR spektri hidrolizovanih uzoraka polisaharidnih ekstrakata iz gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) prikazani su na slici 4.11.



**Slika 4.11.**  $^1\text{H-NMR}$  spektri hidrolizovanih uzoraka polisaharidnih ekstrakata gljiva *A. bisporus* (Ab), *A. brasiliensis* (Abr), *P. linteus* (PI) i spora gljive *G. lucidum* (GI-s-fujian) sa obeleženim anomernim H identifikovanih šećera (signali obeleženi \* potiču od standarda-DSS)

Monosaharidne komponente su identifikovane i kvantifikovane na osnovu njihovih H (1) signala, tabela 4.5.

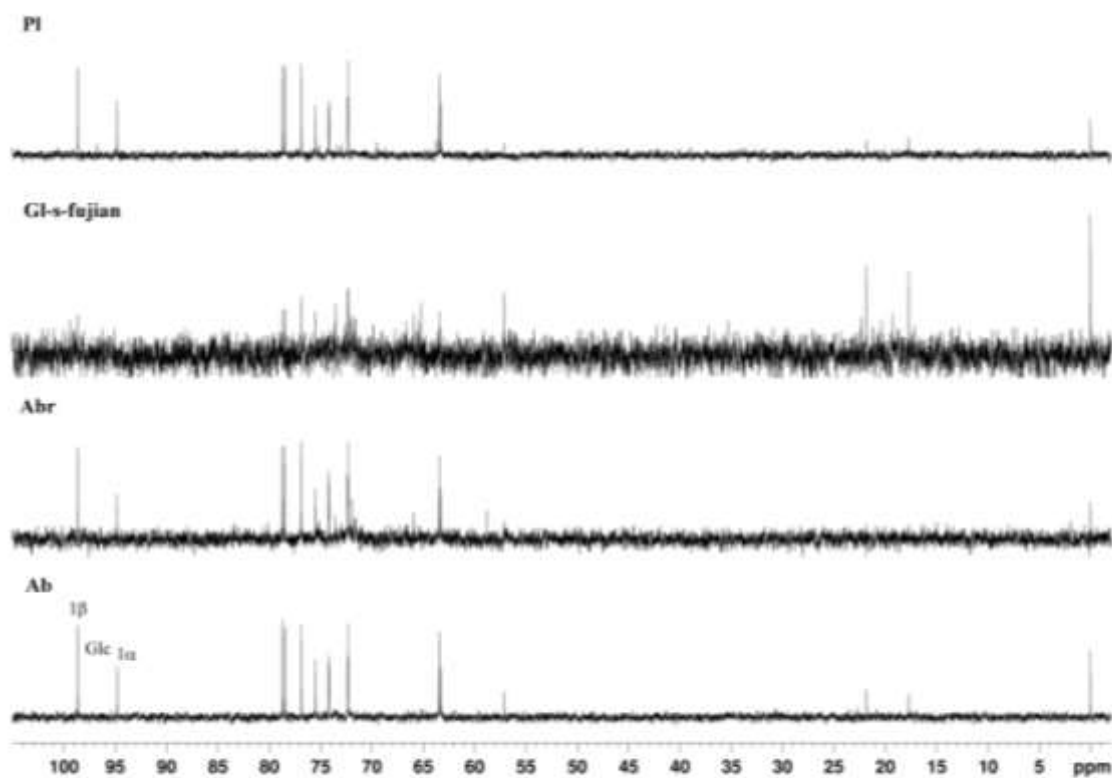
**Tabela 4.5.** Odnos integrala H-1 signala identifikovanih šećera i sadržaj aromatičnih jedinjenja (%) u  $^1\text{H-NMR}$  spektrima hidrolizata gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) u odnosu na integrale H-1 glukoze

ekstrakt	šećeri $\alpha/\beta$				aromatični signali
	Glc	Gal	Xyl+Fuc	Man	
<i>A. bisporus</i>	1 <sup>a</sup> /1,4	0,04/-	-/0,1	-	<b>1</b>
<i>A. brasiliensis</i>	1/1,7	0,08/0,1	-/0,03 <sup>b</sup>	0.04/0,05	<b>10</b>
<i>P. linteus</i>	1/1,6	0,07/-	-/0,2	0,2/0,2	<b>4</b>
<i>G.lucidum</i> spore (kom.)	<b>1/2</b>	<b>0,04/-</b>	<b>-/tragovi</b>	<b>0,05/-</b>	<b>15</b>

<sup>a</sup> H(1)-integral  $\alpha$ -Glc je kalibrisan na 1 (referentna vrednost).

<sup>b</sup> Preovlađuje fukoza.

Prema ovim podacima, D-Glc ( $\beta$ -anomer) dominira u sva četiri hidrolizata. Slabi signali D-Man, D-Fuc (+ Xyl) i D-Gal bili su prisutni u svim spektrima. Prema NMR podacima za ova četiri ekstrakata polisaharidi gljive *A. brasiliensis* sadrže najveću količinu Gal u odnosu na ostale uzorke, a Man je u najvećoj količini zastupljena kod polisaharida gljive *P. linteus*. U sva četiri spektra ispitivanih uzoraka hidrolizata utvrđeno je prisustvo veoma sličnih signala u aromatičnom regionu (9,5-6,5ppm). Njihovi intenziteti nalaze se u opsegu od 1% za uzorak *A.bisporus* do 15% za uzorak *G. lucidum* u poređenju sa količinom  $\beta$ -Glc, tabela 4.5. U svim spektrima prisutne su i alifatične, nešećerne komponente (signali na 1-3 ppm na  $^1\text{H}$ -spektru) u tragovima. Dodatni signali (nešećerne komponente) u alifatičnom i aromatičnom regionu su najuočljiviji na  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektrima spora gljive *G. lucidum*, slika 4.11. i 4. 12.



**Slika 4.12.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spektri hidrolizovanih uzoraka polisaharidnih ekstrakata gljiva *A. bisporus* (Ab), *A. brasiliensis* (Abr), *P. linteus* (PI) i spora *G. lucidum* (Gl-s-fujian) (kod hidrolizata Ab su obeleženi anomerni C glukoze)

Asignacija  $^1\text{H}$  (slika 4.11., tabela 4.5.) i  $^{13}\text{C}$  NMR (slika 4.12., tabela 4.6.) signala je potvrđena analizom H-C HSQC spektara, kao i H-H COSY i DEPT-135 spektara sličnih uzoraka (rezultati nisu objavljeni). Razlika između  $^{13}\text{C}$ -NMR hemijskih pomeranja navedenih u literaturi (Jansson, 2006) i signala ispitivanih uzoraka u ovom radu iznosi -1,8 ppm (tabela 4.6.) što je posledica internog referentnog standarda (<http://www.boc.chem.uu.nl/sugabase/sugabase.html>) koji je korišćen.

**Tabela 4.6.** Hemijska pomeranja (ppm) signala glukoze u  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima  
*A. bisporus* (Ab) (glukoza  $\alpha/\beta = 1/1,3$ )

	C1		C2		C3		C4		C5		C6	
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
Ab	94,81	98,63	74,20	76,86	75,48	78,67	72,37	72,32	74,16	78,48	63,31	63,47

#### 4.2.2. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA PREČIŠĆENIH DIJALIZOM

Polisaharidni ekstrakti iz plodonosnih tela gljiva *Lentinula edodes* (Le), *Trametes versicolor* (Tv), *Ganoderma applanatum* (Ga), *Ganoderma lucidum* (Gl) i spora (laboratorijski ekstrakt) *Ganoderma lucidum* (Gl-s) dodatno su prečišćeni dijalizom i alkoholnom precipitacijom, kako bi se uklonili molekuli nižih molekulskih masa, ispod 8-10 kD.

##### 4.2.2.1. PRINOS POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

Prinos polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt), pre i posle dijalize prikazan je u tabeli 4.7. Nakon dijalize i ponovnog taloženja dijalizovanog materijala sa 96% etanolom utvrđeno je značajno smanjenje prinosa polisaharidnih



ekstrakata. Na ovaj način uklonjeno je od 50-90% rastvornih komponenti iz polisaharidnih ekstrakata ispitivanih gljiva (*T. versicolor* 52,2%, *L. edodes* 52,5%, *G. lucidum* 68,8%, *G. applanatum* 88,2% kao i kod ekstrakta spora *G. lucidum* 87,7%). Smanjenje prinosa može da bude posledica degradacionih procesa u toku same ekstrakcije i prečišćavanja polisaharidnih ekstrakata, pri čemu su na taj način nastali molekuli manjih molekulske masa uklonjeni dijalizom (Klaus et al., 2011; Tseng et al., 2008).

**Tabela 4.7.** Prinos ukupnih polisaharida, glukana,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana, fenola i proteina polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt)

		<i>G. applanatum</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>G. lucidum</i> spore
Prinos ekstrakata (g/100g) <sup>a</sup>	Pre dijalize	1,7 ± 0,4 D <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 D	4,0 ± 0,2 C	4,6 ± 0,4 B	5,7 ± 0,3 A
	Posle dijalize	0,2 ± 0,1 D	0,5 ± 0,1 C	1,9 ± 0,2 B	2,2 ± 0,3 A	0,7 ± 0,1 C
Ukupan sadržaj polisaharida (g/100g)		0,2 ± 0,1 D	0,3 ± 0,0 D	1,5 ± 0,2 B	1,9 ± 0,2 A	0,6 ± 0,0 C
Sadržaj glukana (g/100g)	Ukupan	0,05 ± 0,02 D	0,2 ± 0,1 C	0,8 ± 0,1 A	0,8 ± 0,1 A	0,4 ± 0,1 B
	$\alpha$	0,01 ± 0,01 D	0,03 ± 0,00 C	0,03 ± 0,01 C	0,06 ± 0,01 B	0,08 ± 0,01 A
	$\beta$	0,04 ± 0,01 C	0,2 ± 0,0 B	0,8 ± 0,1 A	0,7 ± 0,1 A	0,3 ± 0,1 B
Ukupan sadržaj fenola (g/100g)		0,01 ± 0,001 C	0,02 ± 0,00 B	0,02 ± 0,00 B	0,04 ± 0,01 A	0,002 ± 0,0003 D
Ukupan sadržaj proteina (g/100g)		0,01 ± 0,00 B	0,01 ± 0,00 B	0,10 ± 0,01 A	0,09 ± 0,02 A	0,01 ± 0,00 B

<sup>a</sup>Sve vrednosti su izražene na suhu masu gljive. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

<sup>b</sup>Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0.05, ANOVA, Fisher's LSD

#### 4.2.2.2. POLISAHARIDNE KOMPONENTE

Sadržaj ukupnih polisaharida u ispitivanim ekstraktima se značajno razlikuje-od 56,6 g/100g suve mase za ekstrakt iz plodonosnih tela *G. lucidum* do 83,9 g/100g za ekstrakt

dobijen iz plodonosnih tela *T. versicolor*, tabela 4.8. Visok prinos polisaharida u ekstraktima spora gljive *G. lucidum* (82,3 g/100g) može se objasniti samim postupkom dobijanja ekstrakta. Komercijalni ekstrakt iz spora *G. lucidum* koji je okarakterisan niskim sadržajem ukupnih polisaharida (27,6 g/100g), dobijen je postupkom ekstrakcije vrelom vodom i taloženjem sa 96% etanolom. Kod ekstrakta spora koji je dobijen u laboratoriji posle ekstrakcije vrelom vodom i alkoholne precipitacije ekstrakt je dodatno ispran 70% etanolom i dijalizovan, nakon čega je ponovljena alkoholna precipitacija. Poređenjem ukupnog sadržaja proteina i fenola u oba ekstrakta, utvrđeno je da se u komercijalnom ekstraktu nalazi oko 20 puta veća količina fenolnih jedinjenja i oko 3 puta veći sadržaj proteina, tabele 4.2. i 4.8. Dodatno ispiranje ekstrakta alkoholom i dijaliza uklonili su molekule nižih molekulskih masa iz ekstrakta i time omogućili koncentrovanje polisaharida većih molekulskih masa ( $\geq 10$  kDa). Različit sadržaj polisaharida u ispitivanim ekstraktima može da bude posledica različitih uslova (spoljašnjih i nutritivnih) u kojima su uzgajane gljive (Jong i Birmingham, 1992; Minato et al., 1999; Minato et al., 2001).

**Tabela 4.8.** Ukupan sadržaj polisaharida, glukana,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana, fenola i proteina u polisaharidnim ekstraktima dobijenim iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i *G. lucidum* spora, nakon dijalize

		<i>G. applanatum</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>G. lucidum</i> spore
<b>Ukupan sadržaj polisaharida (g/100g)</b>		<b>63,5 ± 1,2 D<sup>b</sup></b>	<b>56,6 ± 0,7 E</b>	<b>78,2 ± 1,7 C</b>	<b>83,9 ± 0,9 A</b>	<b>82,3 ± 1,4 B</b>
<b>Sadržaj glukana (g/100g)</b>	<b>Ukupan</b>	<b>22,4 ± 0,5 E</b>	<b>47,1 ± 0,6 B</b>	<b>42,6 ± 0,2 C</b>	<b>36,3 ± 0,7 D</b>	<b>58,2 ± 0,5 A</b>
	<b><math>\alpha</math></b>	<b>6,4 ± 0,4 B</b>	<b>5,7 ± 0,1 C</b>	<b>1,4 ± 0,2 E</b>	<b>2,9 ± 0,1 D</b>	<b>10,8 ± 0,3 A</b>
	<b><math>\beta</math></b>	<b>16,0 ± 0,5 D</b>	<b>41,4 ± 1,4 B</b>	<b>41,2 ± 0,5 B</b>	<b>33,4 ± 0,8 C</b>	<b>47,4 ± 0,7 A</b>
<b>Ukupan sadržaj fenola (g/100g)</b>		<b>4,7 ± 0,2 A</b>	<b>3,3 ± 0,2 B</b>	<b>1,2 ± 0,0 D</b>	<b>1,8 ± 0,1 C</b>	<b>0,3 ± 0,0 E</b>
<b>Ukupan sadržaj proteina (g/100g)</b>		<b>3,9 ± 0,4 B</b>	<b>2,7 ± 0,3 C</b>	<b>5,2 ± 0,1 A</b>	<b>3,9 ± 0,3 B</b>	<b>0,9 ± 0,1 D</b>

<sup>a</sup>Sve vrednosti su izražene u odnosu na suhu masu ekstrakta. Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

<sup>b</sup>Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0.05$ , ANOVA, Fisher's LSD

Ukupan sadržaj glukana u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida nalazi se u granicama od 35% za ekstrakt dobijen iz gljive *G. applanatum* do 83% za ekstrakt iz plodonosnih tela *G. lucidum*, tabela 4.8. Razlika u ukupnom sadržaju glukana za ispitivane ekstrakte bila je statistički značajna,  $p \leq 0,05$ .

Sadržaj  $\alpha$ -glukana u ispitivanim ekstraktima je značajno manji u odnosu na sadržaj  $\beta$ -glukana i nalazio se u opsegu od 1,4 do 10,8 g/100g izračunato na suhu masu dijalizovanog polisaharidnog ekstrakta. Sadržaj  $\alpha$ -glukana izražen na suhu masu gljiva nalazio se u granicama od 0,01 g/100g kod ekstrakta gljive *G. applanatum* do 0,08 g/100g kod ekstrakta spora *G. lucidum*, tabela 4.7.

Ukupan sadržaj  $\beta$ -glukana bio je u opsegu od 16,0 do 47,4 g/100g izračunato na suhu masu polisaharidnih ekstrakata, odnosno od 0,04 do 0,8 g/100g na suhu masu celih gljiva, tabele 4.7. i 4.8.

#### 4.2.2.3. UKUPAN SADRŽAJ PROTEINA

Ukupan sadržaj proteina u polisaharidnim ekstraktima iz plodonosnih tela *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* prikazan je u tabeli 4.8. Procenat (%) proteina u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* bio je  $6,1 \pm 0,2$ ,  $4,8 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$ ,  $4,6 \pm 0,3$ . Za ekstrakt dobijen iz spora *G. lucidum* iznosio je  $1,1 \pm 0,1$  % .

Ukupan sadržaj proteina izračunat na suhu masu gljive bio je 0,01 g/100g kod ekstrakta plodonosnih tela *G. applanatum*, *G. lucidum* i spora *G. lucidum*, tabela 4.7. Za ekstrakte gljiva *T. versicolor* i *L. edodes* iznosio je 0,09 i 0,10 g/100g.

#### 4.2.2.4. UKUPAN SADRŽAJ FENOLA

Ukupan sadržaj fenola u polisaharidnim ekstraktima nakon dijalize i ponovljene alkoholne precipitacije, izražen na suhu materiju ekstrakata i suhu materiju gljiva, prikazan je u tabelama 4.7. i 4.8.

Nakon dijalize ( $> 8-10$  kDa) i alkoholne precipitacije fenolne komponente su i dalje bile prisutne u polisaharidnim ekstraktima.

Procenat ukupnih fenola u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* (lab. ekstrakt) bio je  $7,4 \pm 0,3$ ,  $5,8 \pm 0,1$ ,  $1,5 \pm 0,1$ ,  $2,1 \pm 0,2$  i  $0,4 \pm 0,0\%$ .

#### 4.2.2.5. FT-IR SPEKTROSKOPIJA

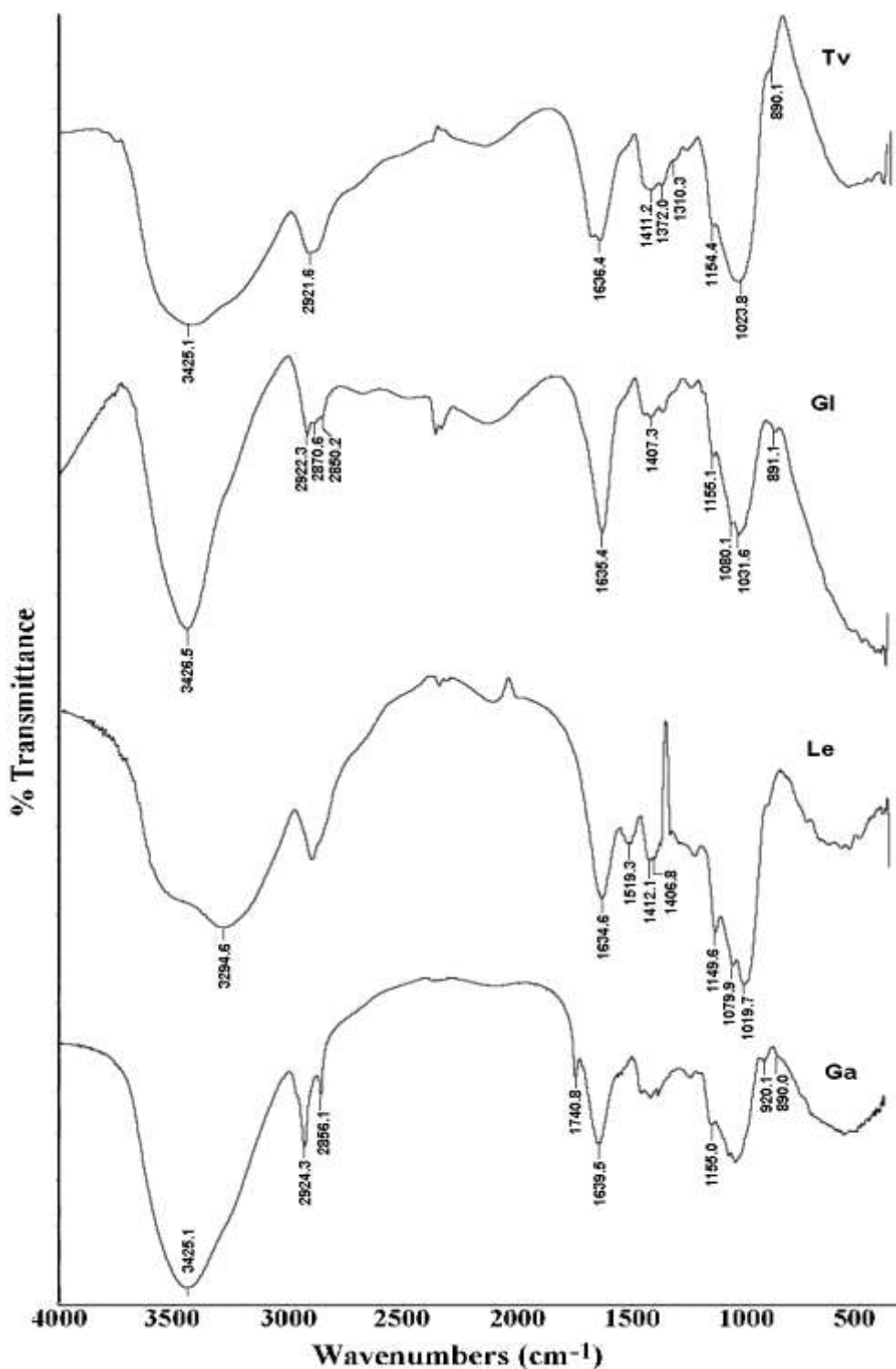
FT-IR spektri polisaharidnih ekstrakata iz gljiva *G. applanatum* (Ga), *G. lucidum* (Gl), *L. edodes* (Le), *T. versicolor* (Tv) i spora *G. lucidum* (Gl-s) prikazani su na slikama 4.13. i 4.14.

FT-IR spektar polisaharidnog ekstrakta koji je izolovan iz gljive *L. edodes* (slika 4.13) pokazuje karakterističnu široku kompleksnu apsorpcionu traku u oblasti  $3000\text{ cm}^{-1}$  -  $3500\text{ cm}^{-1}$  koja odgovara valentnim vibracijama O-H grupa kao i simetričnim i asimetričnim vibracijama istezanja N-H veza. Traka na  $1020\text{ cm}^{-1}$  pripisuje se valentnim vibracijama C-O-C veza, dok je traka između  $1000\text{ cm}^{-1}$ - $1100\text{ cm}^{-1}$ , odnosno na  $1080\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za prisustvo  $\beta$  glukana, odnosno  $\beta$ -supstituisanih glukoznih ostataka (Mathlouthi i Koenig, 1986; Stone i Clarke, 1992). Prisustvo male količine proteina u ispitivanom uzorku može se uočiti na osnovu karakterističnih traka na  $1635\text{ cm}^{-1}$ ,  $1520\text{ cm}^{-1}$  i  $1412\text{ cm}^{-1}$  kao i trake u regionu  $3000\text{ cm}^{-1}$  -  $3500\text{ cm}^{-1}$ . Intenzivna traka na  $1635\text{ cm}^{-1}$  preklapa se sa apsorpcijom aromata (Harki et al., 1997), najverovatnije polifenola (C=C i C=O vibracije istezanja), što bi bila indikacija za prisustvo pigmenta, na šta ukazuje i traka na  $1519\text{ cm}^{-1}$  koja takodje potiče od aromata. Traka na  $1407\text{ cm}^{-1}$  potiče od alifatičnih grupa.

Spektar polisaharida izolovanih iz gljive *T. versicolor* pokazuje apsorpcionu traku na  $1155\text{ cm}^{-1}$  koja je karakteristična za  $\beta$ -glikozidne veze. Traka na  $1024\text{ cm}^{-1}$  uslovljena je C-O vibracijama istezanja dok je slaba traka na  $890\text{ cm}^{-1}$  specifična za  $\beta$ -glikozidnu vezu. Prisustvo amidnih traka na  $1636\text{ cm}^{-1}$  i  $1411\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo manje količine proteina. Intenzivna traka na  $1636\text{ cm}^{-1}$  (region  $1650\text{ cm}^{-1}$ - $1600\text{ cm}^{-1}$ ) je indikativna takodje za aromatične C=C grupe koje su konjugovane sa C=O i/ili COO<sup>-</sup> grupama (MacCarthy i Rice, 1985), dok relativno jasna, ali i kompleksna traka u oblasti  $1410\text{ cm}^{-1}$ - $1310\text{ cm}^{-1}$  korespondira sa OH grupama fenolnih jedinjenja. Oštra, manje intenzivna traka na  $2922\text{ cm}^{-1}$  potiče od vibracija istezanja metilenskih (CH<sub>2</sub>) grupa iz primarnih alkoholnih grupa na C<sub>6</sub> u heksopiranoznim monomernim jedinicama polisaharida. Široka, jaka traka na  $3000\text{ cm}^{-1}$ - $3500\text{ cm}^{-1}$  rezultat je valentnih vibracija

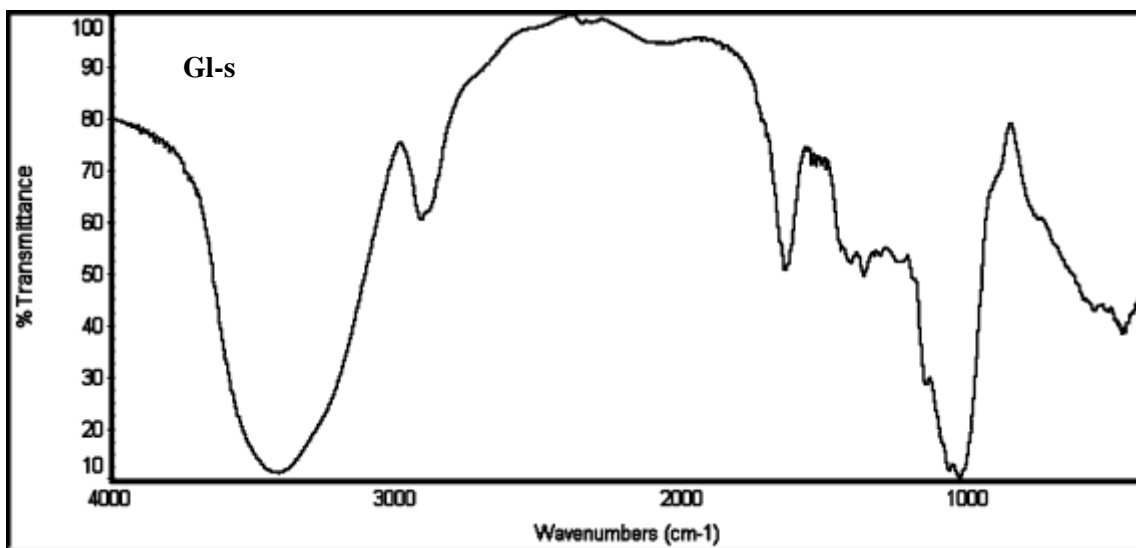
OH grupa koje učestvuju u formiranju različitih po jačini vodoničnih veza, kao i valentnih vibracija N-H grupa.

FT-IR polisaharidnog ekstrakta iz gljive *G. applanatum* sadrži jednu apsorpcionu traku na  $1155\text{ cm}^{-1}$  i slabu traku na  $890\text{ cm}^{-1}$  koje su pripisane  $\beta$ -glikozidnoj vezi, kao i traku na  $920\text{ cm}^{-1}$  koja se odnosi na  $\alpha$ -glikozidnu vezu. Pored široke kompleksne trake na  $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$  koja se odnosi na OH vibracije istezanja kao i na N-H valentne vibracije i trake na  $2924\text{ cm}^{-1}$  karakteristične za metilenske  $\text{CH}_2$  grupe, ovaj spektar pokazuje apsorpcione trake u oblasti  $1690-1750\text{ cm}^{-1}$  (intenzivna traka na  $1740\text{ cm}^{-1}$  karakteristična za uronske kiseline) koje ukazuju na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih C=O grupa kao strukturnih komponenti jednog (ili više) polisaharida koji se nalaze u ispitivanom ekstraktu. Mala količina proteina je takodje prisutna, što se može videti po karakterističnoj apsorpciji na  $1639\text{ cm}^{-1}$ . Ova intenzivna traka preklopljena je sa odgovarajućom C=C trakom aromatičnih jedinjenja koja potiče od pigmenata prisutnih u ovom polisaharidnom ekstraktu. Traka na  $2856\text{ cm}^{-1}$  ukazuje na prisustvo alifatičnih C-H vibracija fenolnih pigmenata.



**Slika 4.13.** FT-IR spektri polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljive *G. applanatum* (Ga), *G. lucidum* (Gl), *L. edodes* (Le) i *T. versicolor* (Tv). FT-IR apsorpcijske trake, vibracije istezanja (cm<sup>-1</sup>), (stretching vibration-str): 3000-3500 str za O-H i N-H; 2920-2930 str za asimetrične (CH<sub>2</sub>); 2950-2850 str za alifatične (C-H); 1690-1750 str slobodnih i esterifikovanih (C=O) grupa; 1600-1650 str za aromatične Amide I, C=O i C=C; 1520-1410 str za Amide II (CN vibracije, NH istezanje); 1410-1400 str alifatičnih C-C lanaca; 1410-1310 str za OH grupe fenola; 1200-900 *finger prints* za ugljene hidrate, 1155 -1150 str za C-O-C; 1080 str za β-glukane; 1020 str za C-O; 920 str α-glikozidne veze; 890 str β- glikozidne veze

Spektar polisaharida izolovanih iz gljive *G. lucidum* pokazuje karakterističan pik na oko  $890\text{ cm}^{-1}$  koji ukazuje na  $\beta$ -orijentisanu C<sub>1</sub>-H vezu kao i traku na  $1080\text{ cm}^{-1}$  koja ukazuje na  $\beta$ -vezane glukopiranozne veze. Traka na  $1032\text{ cm}^{-1}$  odnosi se na  $\alpha$ -glikozidne veze. Karakteristična traka koja se odnosi na O-H valentne vibracije nalazi se na  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ , dok se traka na  $2922\text{ cm}^{-1}$  odnosi na CH<sub>2</sub> grupe primarnih alkoholnih grupa monosaharidnih jedinica medjusobno povezanih glikozidnim vezama. Mala količina proteina uočava se na osnovu karakteristične apsorpcione trake na  $1635\text{ cm}^{-1}$ . Ova relativno intenzivna traka se preklapa sa C=C vibracijama istežanja aromatičnih jedinjenja koja potiču od pigmentata. Trake između  $2950\text{ cm}^{-1}$  i  $2850\text{ cm}^{-1}$  koreliraju sa frekvencijama istežanja alifatičnih C-H grupa. Dodatno, pik na  $1407\text{ cm}^{-1}$  takodje potiče od alifatičnih grupa.



**Slika 4.14.** FT-IR spektar polisaharidnog ekstrakta dobijenog iz spora gljive *G. lucidum* (Gl-s)

FT-IR spektar dijalizovanog polisaharidnog ekstrakta izolovanog iz spora *G. lucidum* takodje pokazuje izgled tipičan za polisaharide sa sličnim strukturnim karakteristikama, slika 4.14. Spektar sadrži pik na  $920\text{ cm}^{-1}$  karakterističan za  $\alpha$ -glikozidne veze kao i pik na  $1080\text{ cm}^{-1}$  koji ukazuje na prisustvo  $\beta$ -glukozidnih veza, dok se pik na  $1155\text{ cm}^{-1}$  odnosi na vibracije istežanja C-C veza i C-O-C veza glikozidno vezanih heksopiranoza. Traka na  $2925\text{ cm}^{-1}$  odnosi se na vibracije CH<sub>2</sub> grupa. Široka apsorpciona traka u oblasti  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  karakteristična je za OH valencione veze kao i N-H i vodonične veze, dok trake na  $1639\text{ cm}^{-1}$  i  $1242\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo manje količine proteina u

ispitivanom uzorku. Traka koja se odnosi na proteine na  $1639\text{ cm}^{-1}$  ( $1650\text{ cm}^{-1}$ - $1600\text{ cm}^{-1}$ ) preklapljena je sa trakom karakterističnom za C=C veze u aromatičnim jedinjenjima. Apsorpciona traka na oko  $1400\text{ cm}^{-1}$  karakteristična je za alifatični niz, dok trake u oblasti  $1410\text{ cm}^{-1}$ - $1310\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo OH grupa u fenolnim jedinjenjima, što ukazuje da su u ispitivanom polisaharidnom ekstraktu, pored manje količine proteina, prisutni i pigmenti.

FT-IR analiza dijalizovanih polisaharidnih ekstrakata iz gljiva *L. edodes*, *T. versicolor*, *G. applanatum*, *G. lucidum* i spora *G. lucidum* potvrđuju spektralni obrazac tipičan za polisaharide koji poseduju slične strukturne karakteristike. Medjutim, ovi spektri takodje sadrže dodatne, relativno intenzivne trake, koje se nalaze u regionu između  $1620\text{ cm}^{-1}$  i  $1650\text{ cm}^{-1}$ , koje ukazuju na prisustvo proteina kao i C=C aromatičnih jedinjenja koja potiču od pigmenata. Trake u oblasti  $1410\text{ cm}^{-1}$  - $1310\text{ cm}^{-1}$  ukazuju na prisustvo OH grupa u fenolnim jedinjenjima, dok se trake koje se nalaze između  $2950\text{ cm}^{-1}$  i  $2850\text{ cm}^{-1}$  kao i trake oko  $1405\text{ cm}^{-1}$  odnose na vibracije alifatičnih grupa.

Polisaharidi se u ćelijskom zidu gljiva mogu povezivati kovalentnim (estarskim) vezama sa proteinima preko ostataka tirozina i sa ferulinskom kiselinom nastalom u toku procesa degradacije lignina (Fry et al., 2004; Wong et al., 2006). Polisaharidni ekstrakti su dobijeni iz plodonosnih tela tzv. lignokolnih gljiva, što ukazuje na prisustvo enzimskih sistema koji učestvuju u procesima degradacije lignina. *Cis*-ferulinska kiselana je žuto obojena supstanca koja u FT-IR spektrima ima traku oko  $1600\text{ cm}^{-1}$  (Agarwal i Atalla, 1990) koja je takođe indikativna za aromatične C=C grupe koje su konjugovane sa C=O i/ili COO<sup>-</sup> grupama (MacCarthy i Rice, 1985). U toku vrele vodene ekstrakcije polisaharidnih ekstrakata dolazi do narušavanja native strukture proteina, ali je postupak nedovoljan za raskidanje kovalentnih interakcija između ostataka tirozina i polisaharida, kao i ferulinske kiseline i polisaharida (Fry, 1982; Fry et al., 2004.).

#### 4.2.2.6. ELEMENTALNA ORGANSKA MIKROANALIZA

Ukupan sadržaj azota (N), ugljenika (C) i kiseonika (O) u polisaharidnim ekstraktima iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* prikazan je u tabeli 4.9.



**Tabela 4.9.** Elementalna organska mikroanaliza polisaharidnih ekstrakata

<i>Ekstrakt</i>	<b>N (g/100g)</b>	<b>C (g/100g)</b>	<b>H (g/100g)</b>
<i>G. applanatum</i>	0,56	37,98	6,87
<i>G. lucidum</i>	3,83	40,68	6,84
<i>L. edodes</i>	2,20	38,30	7,21
<i>T. versicolor</i>	1,16	39,94	7,22
<i>G. lucidum spore (lab.)</i>	0,40	38,63	6,76

<sup>1</sup>Svi rezultati određivanja su srednje vrednosti dva nezavisna određivanja

Sadržaj proteina izračunat iz vrednosti sadržaja ukupnog N za polisaharidne ekstrakte iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum*, kada su korišćene vrednosti od 4,38 i 4,70 za NP faktor prikazane su u tabeli 4.10.

**Tabela 4.10.** Sadržaj proteina u ispitivanim ekstraktima na osnovu rezultata elementalne analize

<i>Ekstrakt</i>	<sup>a</sup> Sadržaj proteina (g/100g)	<sup>b</sup> Sadržaj proteina (g/100g)
<i>G. applanatum</i>	2,45	2,63
<i>G. lucidum</i>	16,78	18,00
<i>L. edodes</i>	9,64	10,34
<i>T. versicolor</i>	5,08	5,45
<i>G. lucidum spore (lab.)</i>	1,75	1,88

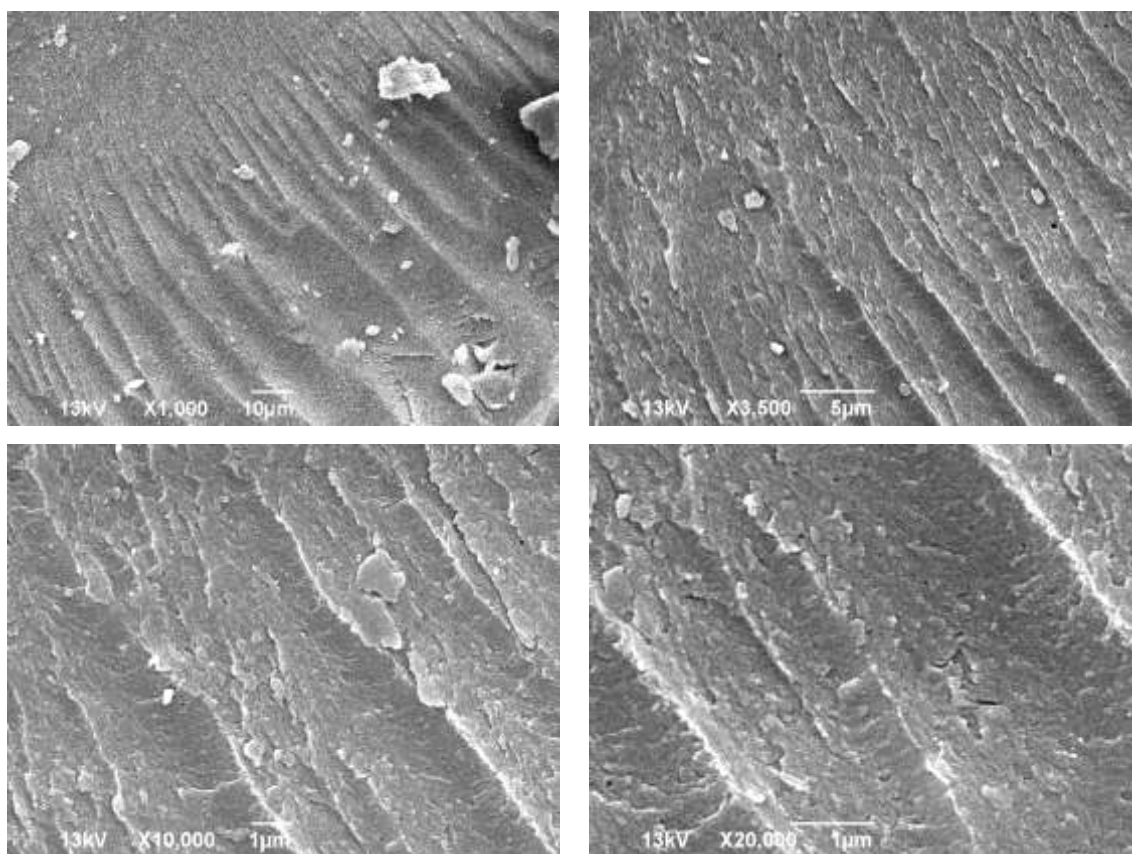
**a:** vrednost NP= 4,38; **b:** NP=4,70

Poređenjem dobijenih vrednosti za sadržaj proteina na osnovu rezultata elementalne analize sa ukupnim sadržajem proteina dobijenim Bradfordovom metodom, tabela 4.8., može se zaključiti da su vrednosti znatno više, osim u slučaju polisaharidnog ekstrakta iz gljive *G. applanatum*, koja je bila manja. Najmanji sadržaj elementarnog N bio je u ekstraktu spora *G. lucidum*. U ovom ekstraktu je pronađena najmanja količina ukupnih proteina i fenola u odnosu na druge ispitivane uzorke.

Rezultati su još jednom potvrdili činjenicu da je iz ukupnog sadržaja N teško odrediti ukupan sadržaj proteina u polisaharidnim ekstraktima gljiva. Rezultati dobijeni elementarnom analizom ukazuju na prisustvo N neproteinske prirode.

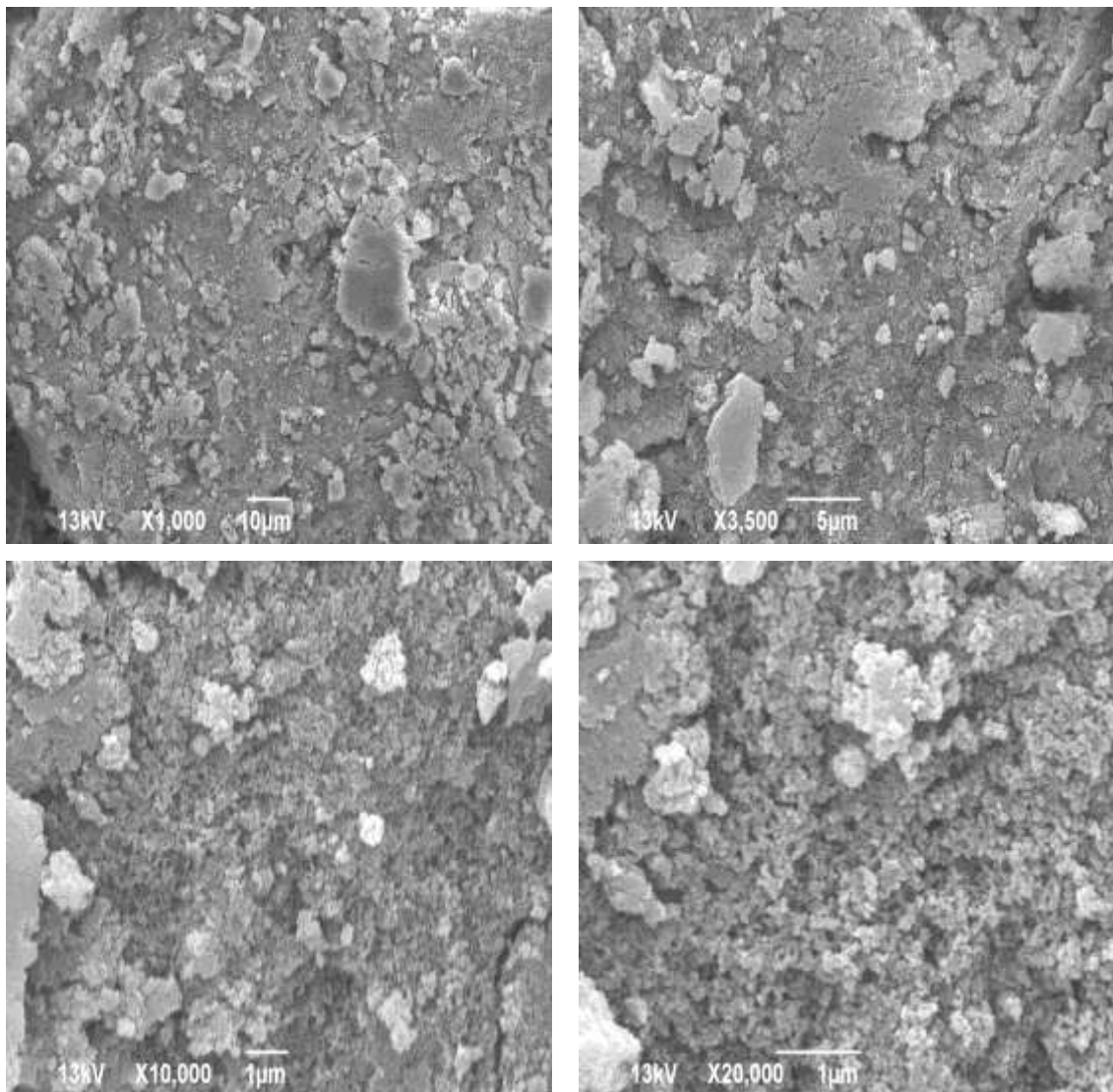
#### 4.2.2.7. SKENIRAJUĆA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Na mikrografijama polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i *G. lucidum* spora snimljenim SEM-om, može se uočiti različita površinska morfologija ekstrakata koja je uslovljena različitom strukturom polisaharida, kao i njihovim interakcijama sa proteinima i fenolima koji su prisutni u ekstraktima, slike 4.15-4.19.

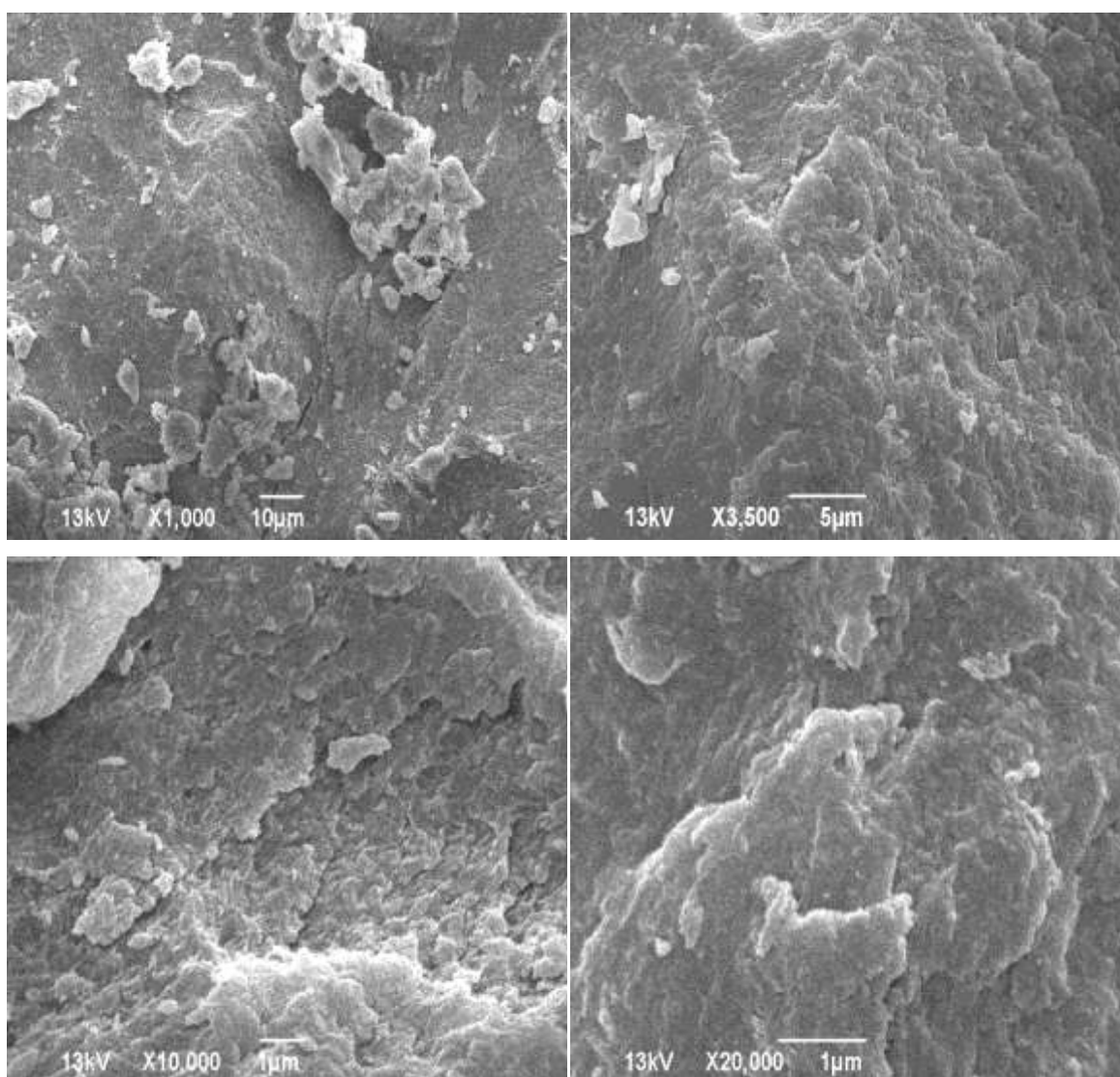


**Slika 4.15.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta iz plodonosnih tela gljive *T. versicolor*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta

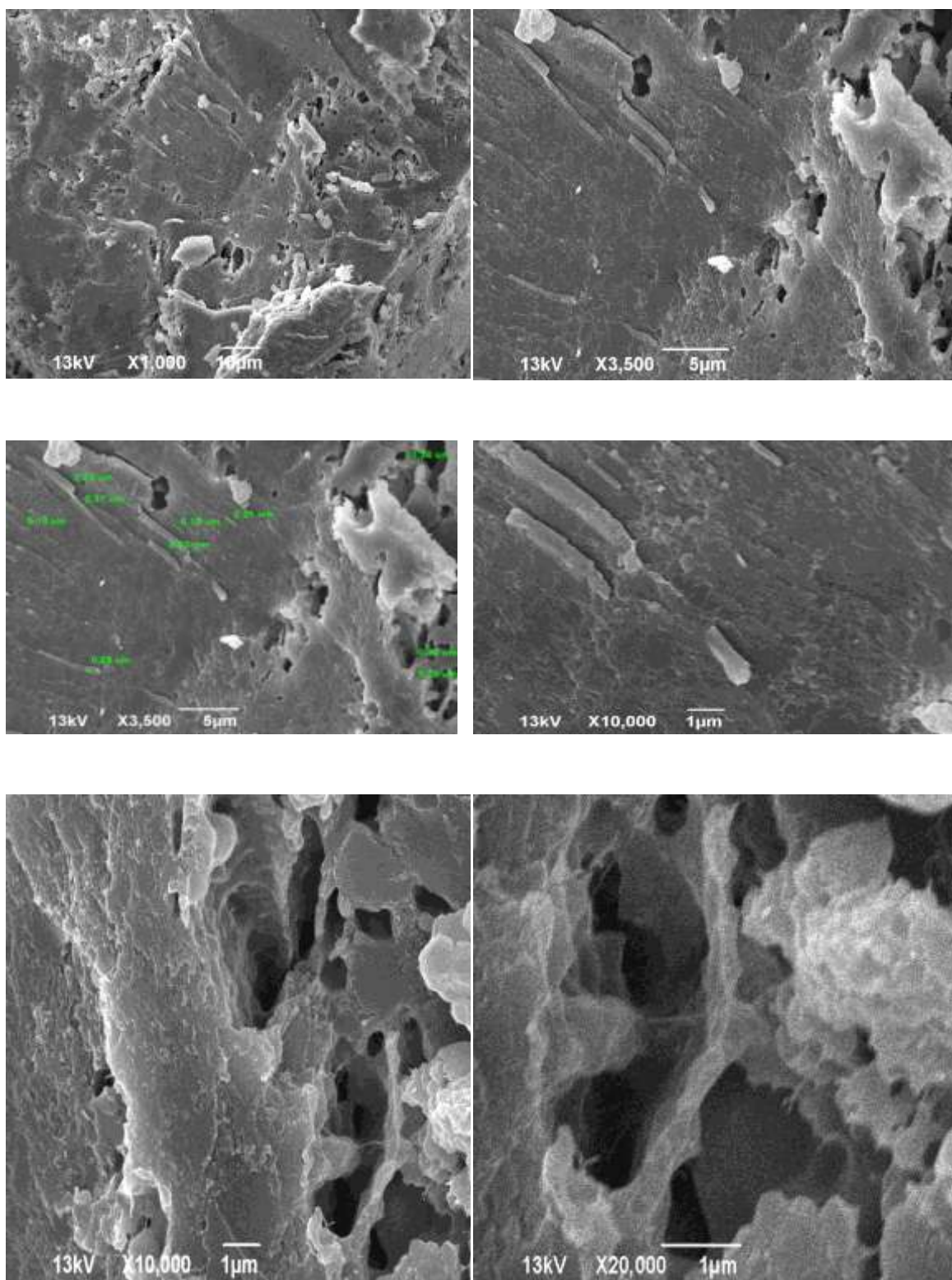
Na osnovu SEM mikrografija polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. lucidum* (slika 4.18.) i *G. applanatum* (slika 4.16., uvećanje 10000 i 20000) potvrđena je njihova porozna, mrežasta struktura, što bi, pored interesantnih antioksidativnih osobina ovih ekstrakata (poglavlje 4.3) moglo da utiče na njihovu potencijalnu primenu u prehrambenoj industriji kao agenasa za zgušnjavanje, odnosno geliranje.



**Slika 4.16.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta iz gljive *G. applanatum*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta

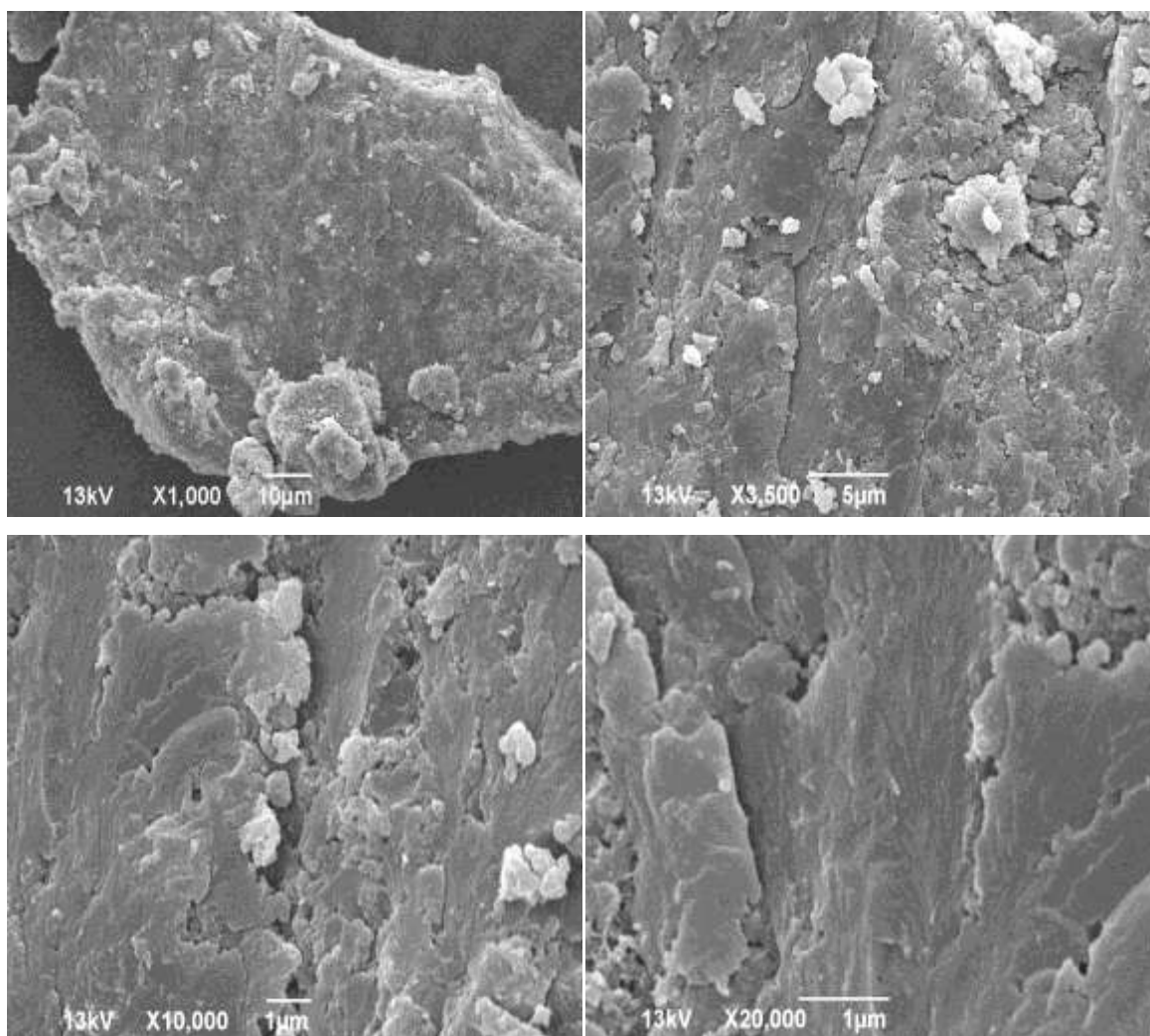


**Slika 4.17.** SEM mikrografija polisahardinog ekstrakta iz plodonosnih tela gljive *L. edodes*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta



**Slika 4.18.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta iz plodonosnih tela gljive *G. lucidum*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta





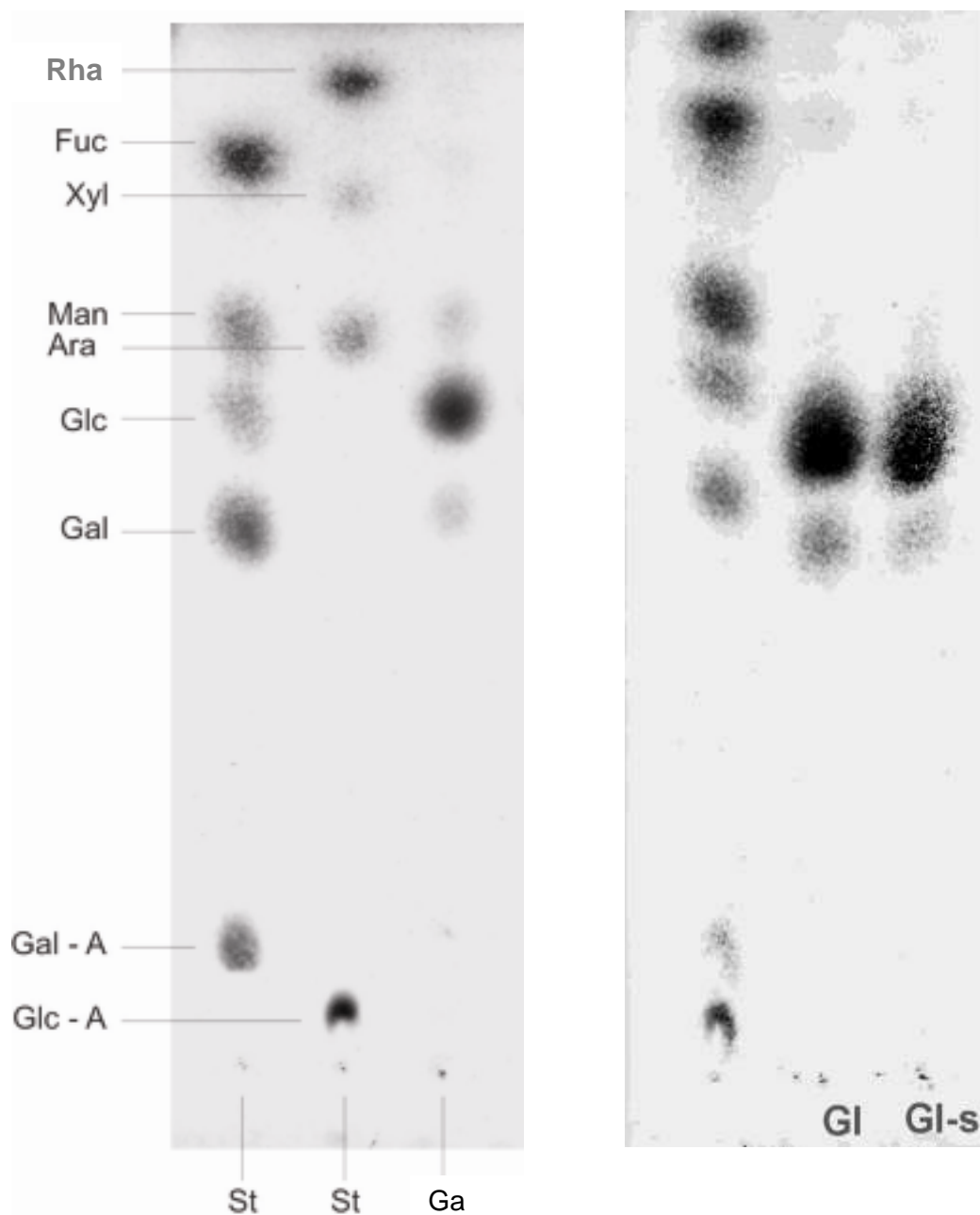
**Slika 4.19.** SEM mikrografija polisaharidnog ekstrakta iz spora gljive *G. lucidum*, uvećanju 1000, 3500, 10000 i 20000 puta

#### 4.2.2.8. TEČNA HROMATOGRAFIJA ISPITIVANIH UZORAKA HIDROLIZATA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA

Na osnovu LC/MS analize uzoraka hidrolizata polisaharidnih ekstrakata iz polodnosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* može se sa sigurnošću tvrditi da svi uzorci sadrže u najvećoj količini glukozu. U uzorcima je potvrđeno prisustvo galaktoze, manoze, kao i ksiloze i fukoze u manjim količinama. Kod polisaharida gljive *G. applanatum* pronađena je arabinoza u tragovima. Joni koji odgovaraju drugim utvrđenim jedinjenjima nisu nađeni u masenim hromatogramima analiziranih uzoraka.

#### 4.2.2.9. PLANARNA HROMATOGRAFIJA

Nakon analize hidrolizovanih polisaharidnih ekstrakata PC i TLC hromatografijom, u poređenju sa standardima, utvrđeno je da svi uzorci sadrže veliku količinu D-glukoze, dok je u znatno manjoj količini bila prisutna D-galaktoza i u tragovima D-manoza, D-ksiloza i D-fukoza. D-ramnoza i D-arabinoza su bile prisutne u tragovima u hidrolizatu gljive *G. applanatum* (slika 4.20.). Komponente veoma slabe pokretljivosti označene su kao parcijalno, odnosno delimično hidrolizovani polisaharidni molekuli. Mala količina disaharida je bila vidljiva u zoni pokretljivosti koja odgovara ovim komponentama. U hidrolizatu ekstrakta *G. applanatum* potvrđeno je prisustvo male količine uronskih kiselina (slika 4.20.). Prisustvo uronskih kiselina nije potvrđeno u drugim ekstraktima.

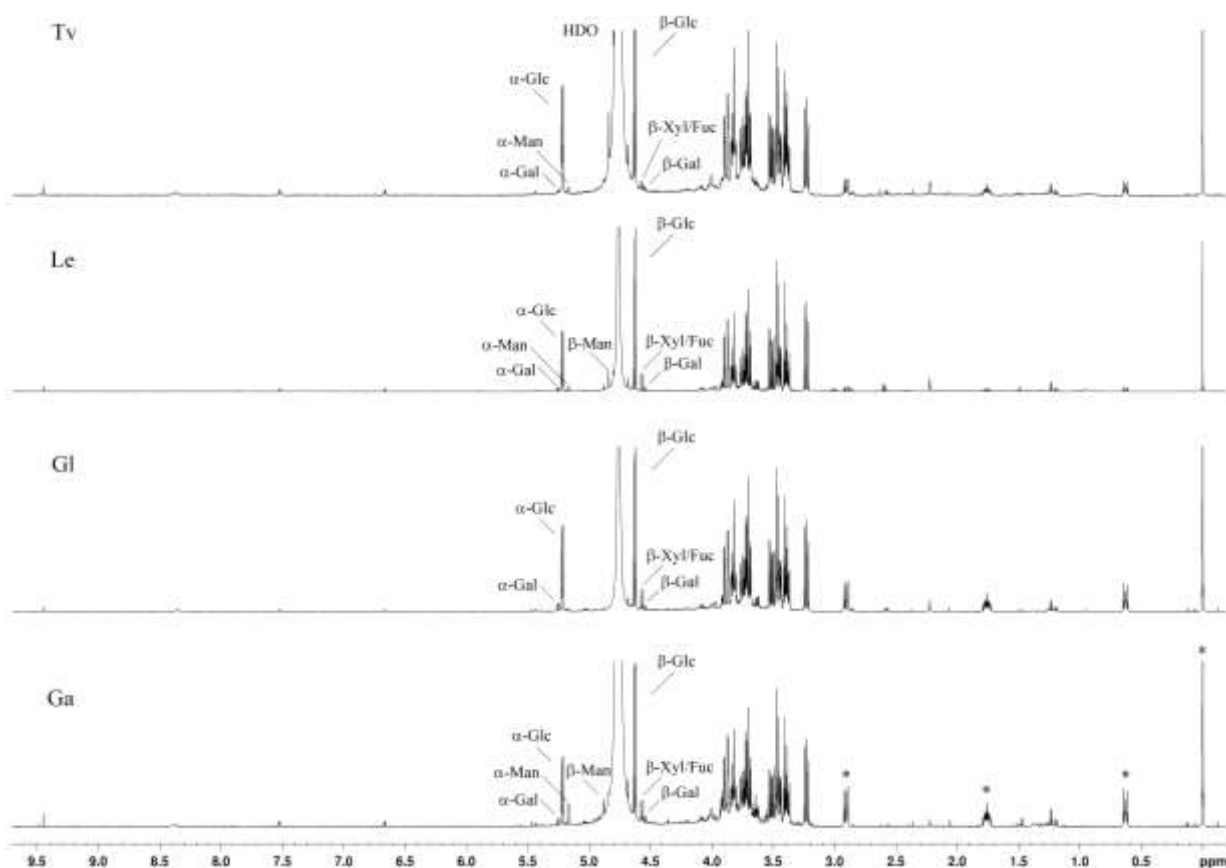


**Slika 4.20.** TLC hidrolizata polisaharidnog ekstrakta iz plodonosnih tela gljive *G. applanatum* (Ga) i ekstrakta iz plodonosnih tela gljive *G. lucidum* (GI) i spora *G. lucidum* (GI-s)

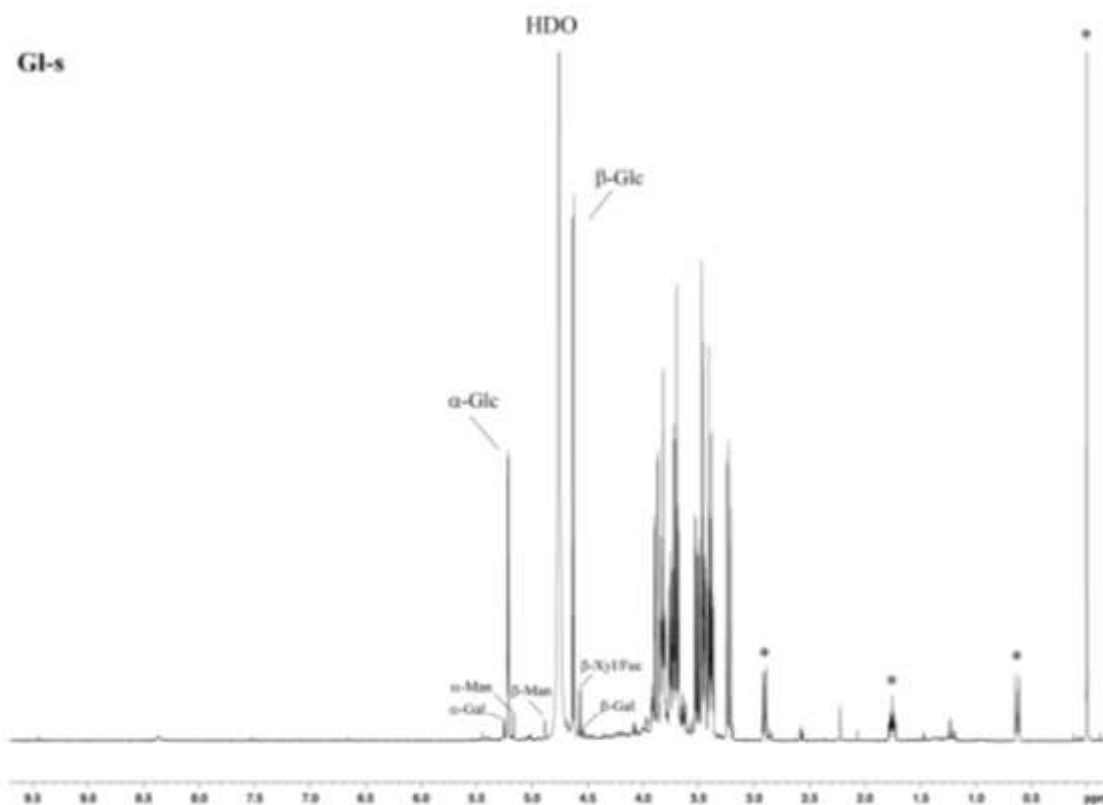


## 4.2.2.10. NMR SPEKTROSKOPIJA

$^1\text{H}$ -NMR spektri hidrolizovanih uzoraka polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* prikazani su na slikama 4.21. i 4.22.



**Slika 4. 21.**  $^1\text{H}$ -NMR spektri hidrolizovanih uzoraka polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum* (Ga), *G. lucidum* (Gl), *L. edodes* (Le) i *T. versicolor* (Tv) sa obeleženim anomernim H identifikovanih šećera (signali obeleženi \* potiču od standarda-DSS) Hemijska pomeranja H(1) u NMR spektrima: Glc,  $-5,22$  (d,  $J=3,7\text{Hz}$ ),  $\beta$ - $4,63$  (d,  $J=7,9$ ); Gal,  $-5,25$  (d,  $J=3,8$ ),  $\beta$ - $4,54$  (d,  $J=7,9$ ); Xyl/Fuc,  $-5,19$  (d,  $J=\text{n.d.}$ ),  $\beta$ - $4,57$  (d,  $J=7,9$ ); Man,  $-5,17$  (d,  $J=1,7$ ),  $\beta$ - $4,88$  (d,  $J=1,1$ ). Hemijska pomeranja izražena su u ppm, konstanta kuplovanja ( $J$ ) u Hz, d znači dublet; n.d.-nije detektovano



**Slika 4.22.**  $^1\text{H-NMR}$  spektar hidrolizovanog polisaharidnog ekstrakta iz spora gljive *G. lucidum* (GI-s) sa obeleženim anomernim H identifikovanih šećera

Monosaharidne komponente su identifikovane i kvantifikovane na osnovu njihovih H (1) signala, tabela 4.11.

**Tabela 4.11.** Kvantitativni odnos monosaharida u hidrolizovanim polisaharidnim ekstraktima iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* u  $^1\text{H-NMR}$  spektrima

ekstrakt	šećeri $\alpha/\beta$			
	Glc	Gal	Xyl+Fuc	Man
<i>G. applanatum</i>	1 <sup>a</sup> /1,5	0,1/0,07	<sup>b</sup> /0,23	<b>0,34/0,17</b>
<i>G. lucidum</i>	1/1,35	0,1/0,04	<sup>b</sup> /0,18	<b>0,03</b>
<i>L. edodes</i>	1/1,7	0,09/0,07	<sup>b</sup> /0,2	<b>0,09/0,05</b>
<i>T. versicolor</i>	1/1,3	0,05/0,06	<sup>b</sup> /0,08	<b>0,08/</b> <sup>c</sup>
<i>G.lucidum spore</i>	<b>1/1,5</b>	<b>0,06/0,02</b>	<b>- /0,12</b>	<b>0,08/0,04</b>

<sup>a</sup> H(1)-integral signala  $\alpha$ -Glc je kalibrisan kao 1 (referentna vrednost)

<sup>b</sup> signali  $\alpha$ -oblika su veoma slabi, u  $\beta$ -obliku preovlađuje fukoza

<sup>c</sup> signal veoma slab, preklapljen sa HDO

Prema ovim podacima, D-Glc ( $\beta$ -anomer) dominira u sva četiri hidrolizata. Slabi signali D-Man, D-Fuc (+ Xyl) i D-Gal bili su prisutni u svim spektrima. Man je u najvećoj količini prisutna kod polisaharida iz gljive *G. applanatum* (tabela 4.11.), dok su u spektrima hidrolizata polisaharida iz plodonosnih tela gljive *G. lucidum* signali manoze veoma slabog intenziteta. Kod sva četiri spektra hidrolizata postoje veoma slični signali u aromatičnim regionu (9,5-6,5 ppm). Njihovi intenziteti su manji od 5% za ekstrakte gljiva *T. versicolor*, *L. edodes* i *G. lucidum* i oko 8% za ekstrakt gljive *G. applanatum*, u poređenju sa referentnim signalom  $\alpha$ -Glc, slike 4.21. i 4.22. Intenzitet signala u aromatičnom regionu kod hidrolizata spora gljive *G. lucidum* je manji od 1%. Na svim spektrima prisutne su i alifatične, nešećerne komponente (signali na 1-3 ppm na  $^1\text{H}$ -spektru) u tragovima.

### 4.3. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA

Za merenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata gljiva, *in vitro*, korišćene su metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala praćena je u sistemu sa 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) radikalima, u model sistemu linoleinske kiseline praćena je inhibicija peroksidacije lipida, posmatrana je sposobnost redukcije feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) jona. Takođe je ispitivana sposobnost heliranja fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) jona. Smanjenje koncentracije fero jona ima zaštitnu ulogu u procesima oksidativnih oštećenja (Meir et al., 1995).

Antioksidativna svojstva su praćena u dve nezavisne grupe ekstrakata: I-polisaharidni ekstrakti dobijeni vrelom vodenom ekstrakcijom i alkoholnom precipitacijom i II-ekstrakti koji su nakon alkoholne precipitacije dodatno prečišćeni dijalizom (MWCO: 8000-10000).

#### 4.3.1. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA DOBIJENIH VODENOM EKSTRAKCIJOM

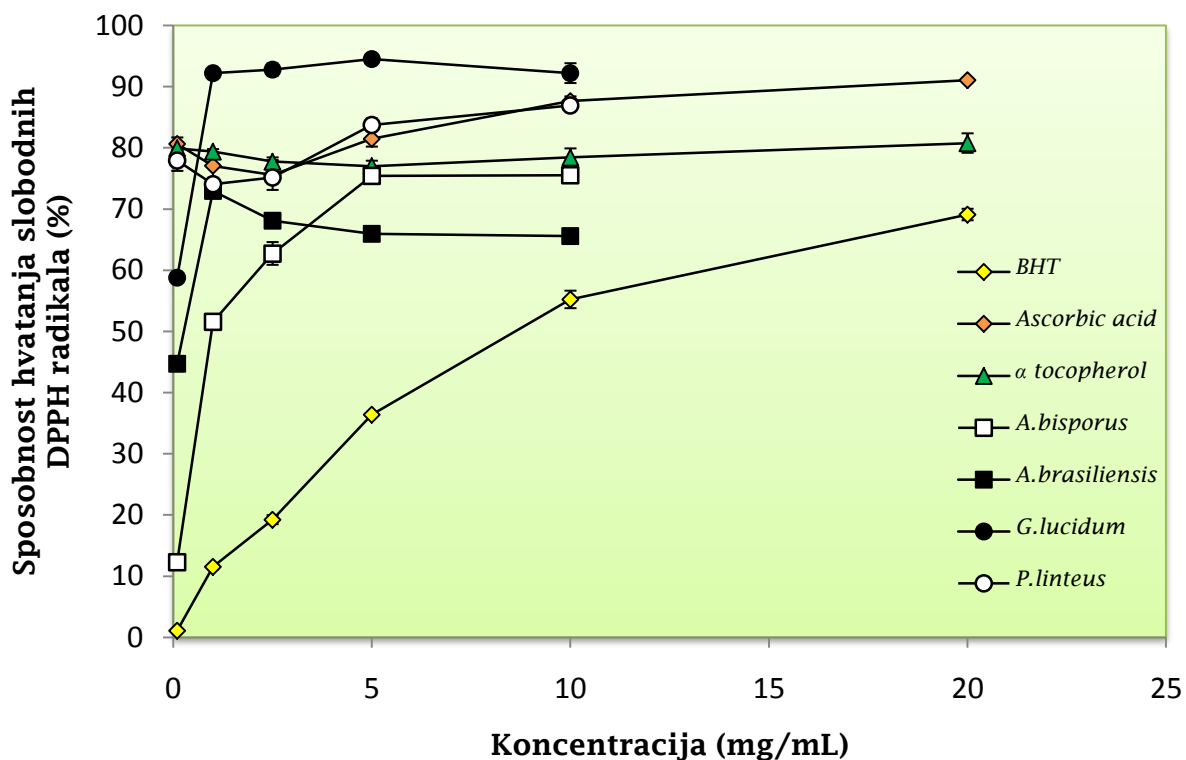
##### 4.3.1.1. SPOSOBNOST HVATANJA SLOBODNIH DPPH RADIKALA

U prisustvu antioksidansa koji ima sposobnost protonovanja, dolazi do redukcije DPPH slobodnih radikala (tamnoljubičasta boja rastvora) i nastanka neradikalskog oblika DPPH-H, uz obezbojavanje ispitivanog rastvora i snižavanje apsorbance (Gulcin et al, 2003).

U koncentracijama od 0,1 do 10 mg/mL, sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) bila je u sledećem opsegu, respektivno: 12,3-75,5%, 44,7-66,6%, 58,8-94,55% i 77,9-86,9%, slika 4.23. Sposobnost hvatanja DPPH u ispitivanom opsegu koncentracija, za pozitivne kontrole BHT, askorbinsku kiselinu i  $\alpha$ -tokoferol bila je između 1,1-55,2%, 80,6-87,6% i 79,9-78,4%. Pri koncentraciji od 5 mg/mL sposobnost redukcije slobodnih radikala se za ispitivane ekstrakte i pozitivne kontrole smanjivala sledećim redosledom: *G. lucidum* > *P. linteus* > askorbinska kiselina >  $\alpha$ -tokoferol  $\approx$  *A. bisporus* > *A. brasiliensis* > BHT.

Polisaharidni ekstrakti dobijeni ekstrakcijom vrelom vodom gljive *Ganoderma tsugae* (plodonosnih tela, micelijuma i filtrata dobijenog submerznim gajenjem), pri koncentraciji od 5 mg/mL pokazuju sposobnost hvatanja DPPH radikala između 36,4-58,4 % (Tseng et al., 2008). Pri koncentraciji od 20 mg/mL, sposobnost hvatanja DPPH radikala se povećala od 93,7 do 100%, osim u slučaju polisaharida dobijenih iz fermentacionog filtrata, 74,9% (Tseng et al., 2008).

Polisaharidni ekstrakti dobijeni termičkim tretmanom vrelom vodom gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *G. lucidum* i *P. linteus* pokazali su se kao dobri hvatači slobodnih radikala *in vitro*, zbog čega mogu da deluju kao primarni antioksidansi koji poseduju sposobnost da prekinu lančanu reakciju radikalskog tipa (Goldfarb, 1999), reagujući sa slobodnim radikalima (Gordon, 1990). Rezultati ukazuju da antioksidativna aktivnost polisaharidnih ekstrakata potiče od sposobnosti predavanja protona komponenti ekstrakata visoko reaktivnim DPPH radikalima.



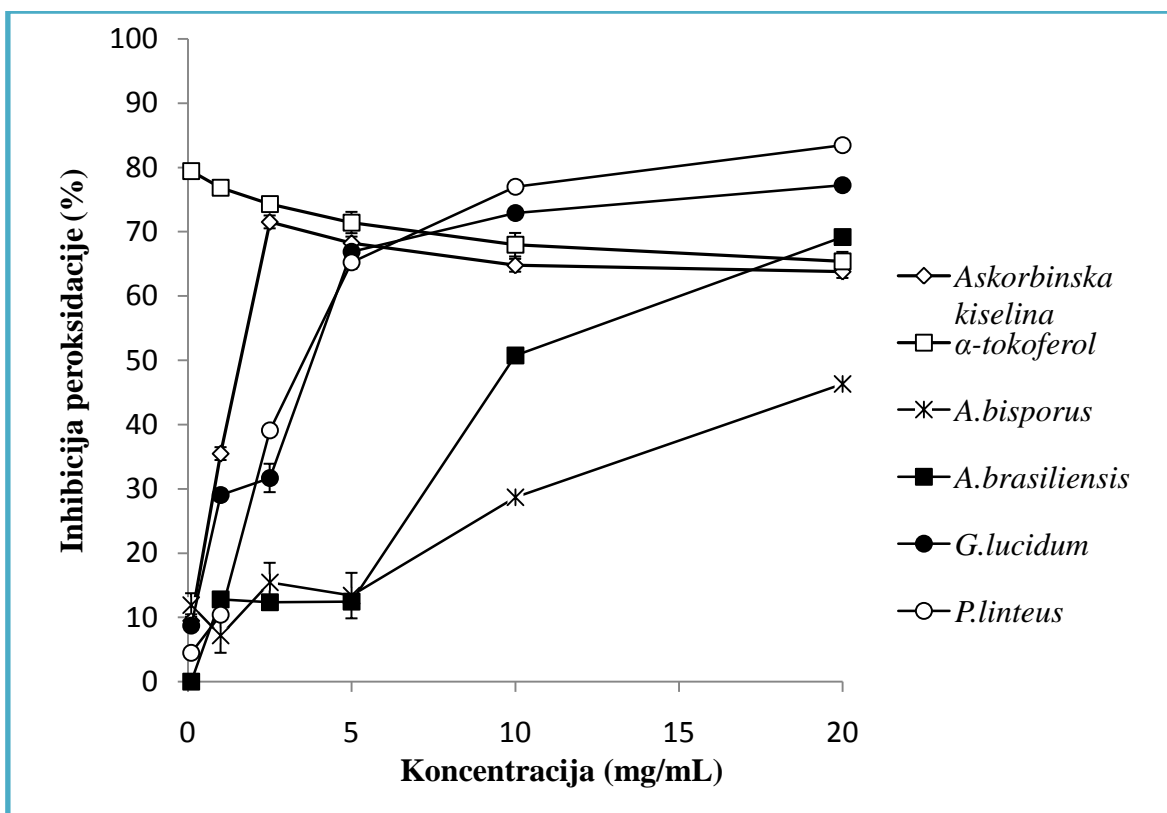
**Slika 4. 23.** Sposobnost hvatanja DPPH radikala polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt). Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

#### 4.3.1.2. INHIBICIJA PEROKSIDACIJE LIPIDA

Proces peroksidacije lipida je osnovni uzrok kvarenja hrane i direktno utiče na boju, ukus, teksturu i hranljivu vrednost. Oksidativna modifikacija lipoproteina male gustine (low-density lipoproteins LDLs) ima suštinsku ulogu u razvoju procesa ateroskleroze. U kom pravcu će se odvijati oksidativna modifikacija zavisi od početnog procesa (koraka) u peroksidaciji polinezasićenih masnih kiselina prisutnih u LDL sistemu (Puttaraju et al., 2006).

Polisaharidni ekstrakti pokazali su različito ponašanje u procesu inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu linoleinske kiseline za ispitivani opseg koncentracija od 0,1-20 mg/mL, slika 4.24. Sposobnost inhibicije polisaharidnih

ekstrakata spora gljive *G. lucidum* i plodonosnih tela *P. linteus* povećavala se sa porastom koncentracije od 0,1 do 10 mg/mL i dostigla je maksimum od 72,9-77,2% i 77,0-83,4% pri koncentracijama ekstrakata od 10 do 20 mg/mL. Polisaharidni ekstrakti gljiva *A. bisporus* i *A. brasiliensis* ispoljili su stalni porast inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline sa povećanjem koncentracija do 20 mg/mL, 46,3% i 69,2%. Sposobnost inhibicije askorbinske kiseline i  $\alpha$ -tokoferola na 20 mg/mL iznosila je 63,8 % i 65,4%. Tokoferol je ispoljio veći procenat inhibicije pri nižim koncentracijama, slika 4.24.

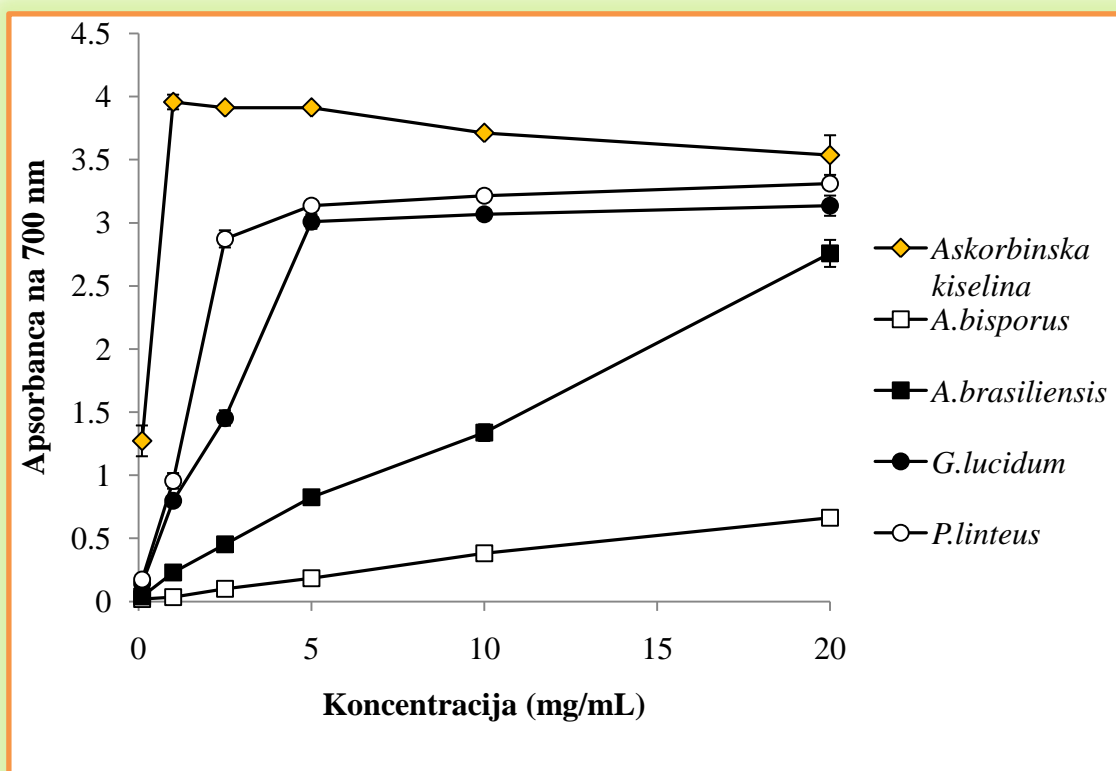


**Slika 4. 24.** Dejstvo polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* na inhibiciju lipidne peroksidacije u model sistemu linoleinske kiseline. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

#### 4.3.1.3. REDUKCIONA SVOJSTVA

Redukcija  $\text{Fe}^{3+}$  jona se veoma često koristi kao pokazatelj sposobnosti doniranja elektrona ispitivanih supstanci. U prisustvu antioksidansa dolazi do redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ . Povećanje izmerene apsorbanse ukazuje na povećanje reduktivne sposobnosti (Adesung et al., 2007).

Merenjem reduktivne sposobnosti ispitivanih ekstrakata uočena su dva modela ponašanja, slika 4. 25. Polisaharidni ekstrakti iz gljiva *A. bisporus* i *A. brasiliensis* pokazali su stalni porast reduktivne sposobnosti sa povećanjem koncentracije do 20 mg/mL. Pri ovoj koncentraciji izmerena je  $A_{700}$  od 0,66 i 2,76, respektivno. Reduktivna sposobnost polisaharidnih ekstrakata gljiva *G. lucidum* i *P. linteus* rasla je sa povećanjem koncentracija od 0,1 do 5 mg/mL i dostigla je svoj maksimum  $A_{700}$  na vrednostima od 3,01-3,14 i 3,14-3,11 u opsegu koncentracija od 5 do 20 mg/mL. Kod askorbinske kiseline maksimalna vrednost reduktivne sposobnosti postignuta je pri 1 mg/mL. Daljim porastom koncentracija njena reduktivna sposobnost se nije menjala, slika 4. 25. Pri koncentraciji od 5 mg/mL reduktivna sposobnost ispitivanih ekstrakata i askorbinske kiseline bila je u sledećem odnosu: askorbinska kiselina  $\approx$  *P. linteus*  $\approx$  *G. lucidum*  $>$  *A. brasiliensis*  $>$  *A. bisporus*. Visoka reduktivna sposobnost polisaharidnih ekstrakata gljiva *G. lucidum* i *P. linteus* pri koncentraciji od 5 mg/mL ukazuje na visok potencijal doniranja vodonika prisutnih komponenti u polisaharidnim ekstraktima (Adesung et al., 2009).



**Slika 4.25.** Sposobnost redukcije polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum*. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

#### 4.3.1.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA

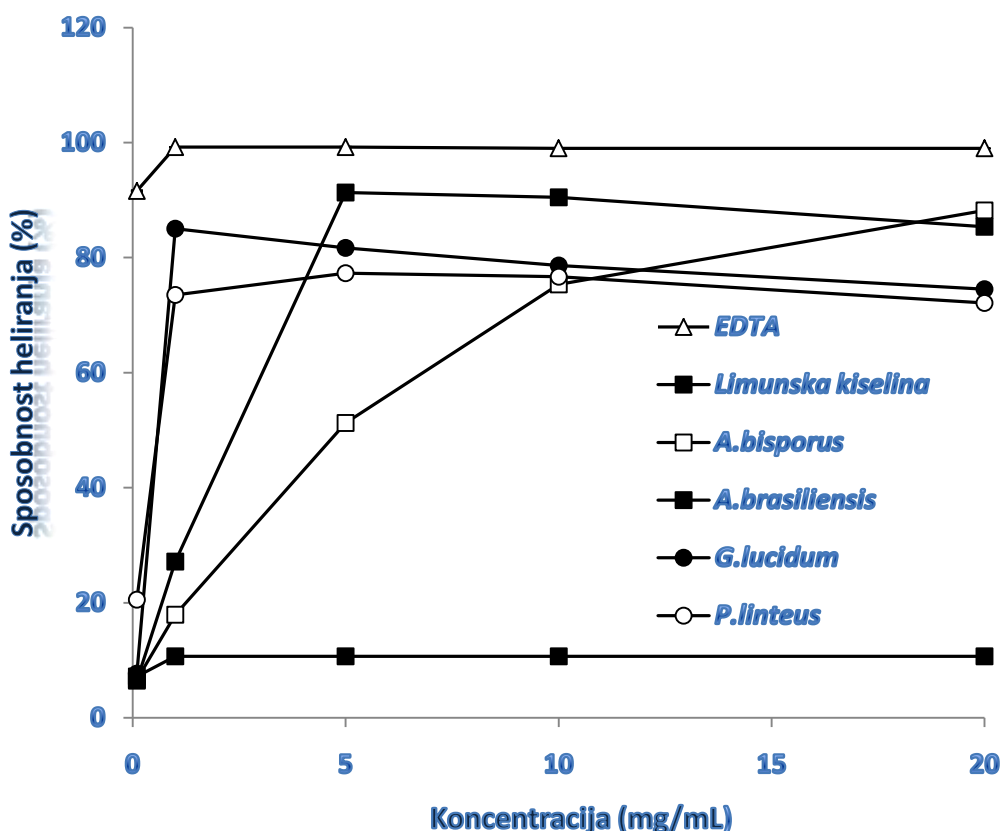
Fero joni su snažni pro-oksidansi. Trovanje gvožđem, odnosno pojava hemosideroze (nagomilavanja gvožđa u srcu, jetri, pankreasu, povećan nivo u krvi), povezano je sa povećanim rizikom od oštećenja organa koja su prouzrokovana slobodnim radikalima kao i od nastanka tumora. Sposobnost gvožđa da inicira stvaranje slobodnih radikala iz peroksida, Fentonovom reakcijom, može da bude uzrok nastanka kardiovaskularnih oboljenja. Ovako nastali slobodni radikali dovode do oštećenja lipoproteina male gustine (LDL), što kasnije dovodi do nakupljanja masnih naslaga i oštećenja zidova arterija i srčanog mišića. Helaciona terapija može da utiče na smanjenje nastalih Fentonovom reakcijom slobodnih radikala i time da smanji oštećenja koja su nastala kod kardiovaskularnih oboljenja (Halliwell i Gutteridge, 1990). Helirajući agensi uklanjaju gvožđe iz tkiva građenjem rastvornih, stabilnih kompleksa koji mogu lako da



se ekskretuju iz organizma (Ebrahimzadeh et al., 2009). Nastanak neurodegenerativnih bolesti kao što su Parkinsonova i Alchajmerova bolest se takođe povezuje sa nakupljanjem gvožđa u centralnom nervnom sistemu.

Ova metoda bazira se na činjenici da ferozin kvantitativno formira kompleks crvene boje sa jonima  $Fe^{2+}$ . U prisustvu helirajućih agenasa, formiranje kompleksa se prekida, a intenzitet crvene boje se smanjuje. Promena boje ukazuje na sposobnost heliranja ispitivanog jedinjenja i kompetitivno "hvatanje" fero jona pre nego što to učini ferozin (Wong & Chye, 2009).

Merenjem sposobnosti heliranja ispitivani polisaharidni ekstrakti pokazali su različito ponašanje u ispitivanom opsegu koncentracija od 0,1 do 20 mg/mL, slika 4.26.



**Slika 4.26.** Sposobnost heliranja gvožđa polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum*. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

Ekstrakt iz spora *G. lucidum* ispoljio je maksimalnu helirajuću sposobnost od 85,1% pri koncentraciji od 1 mg/mL. Ekstrakti gljiva *P. linteus* i *A. brasiliensis* postigli su svoj

maksimum od 77,3 i 91,3 % pri 5 mg/mL. Sa povećanjem koncentracija do 20 mg/mL, primećeno je smanjenje u sposobnosti heliranja oba ekstrakta. Ker et al., (2005) su u svojim istraživanjima potvrdili da koncentracija raspoloživih (slobodnih) hidroksilnih grupa direktno utiče na sposobnost heliranja polisaharida izolovanih iz micelijuma gljive *A. blazei*. Smanjenje sposobnosti heliranja pri većim koncentracijama polisaharida objašnjeno je smanjenjem rastvorljivosti ovih polimera usled povećanja vodoničnih interakcija između polisaharinih molekula. Smanjenje rastvorljivosti dovodi do agregacije polisaharida i formiranja malih koloidnih čestica; inter- i intramolekulske vodonične veze dovode do smanjenja raspoloživih slobodnih hidroksilnih grupa, koje pri niskim koncentracijama ostaju slobodne i dostupne su za heliranje  $Fe^{2+}$  jona. Utvrđeno je da je neophodan broj molova polisaharida potreban za heliranje određenog broja molova fero jona inverzno povezan sa veličinom polisaharidnih molekula (Ker et al., 2005).

Sposobnost heliranja polisaharidnog ekstrakta iz gljive *A. bisporus* povećavala se sa povećanjem koncentracije, slika 4.26. U ispitivanom opsegu koncentracija helirajuća sposobnost ekstrakta se kretala u granicama od 6,6-88,2%. Sposobnost heliranja EDTA bila je u opsegu od 91,6 do 99%. Izmerena sposobnost heliranja gvožđa limunske kiseline nije prelazila 10% po ovoj metodi.

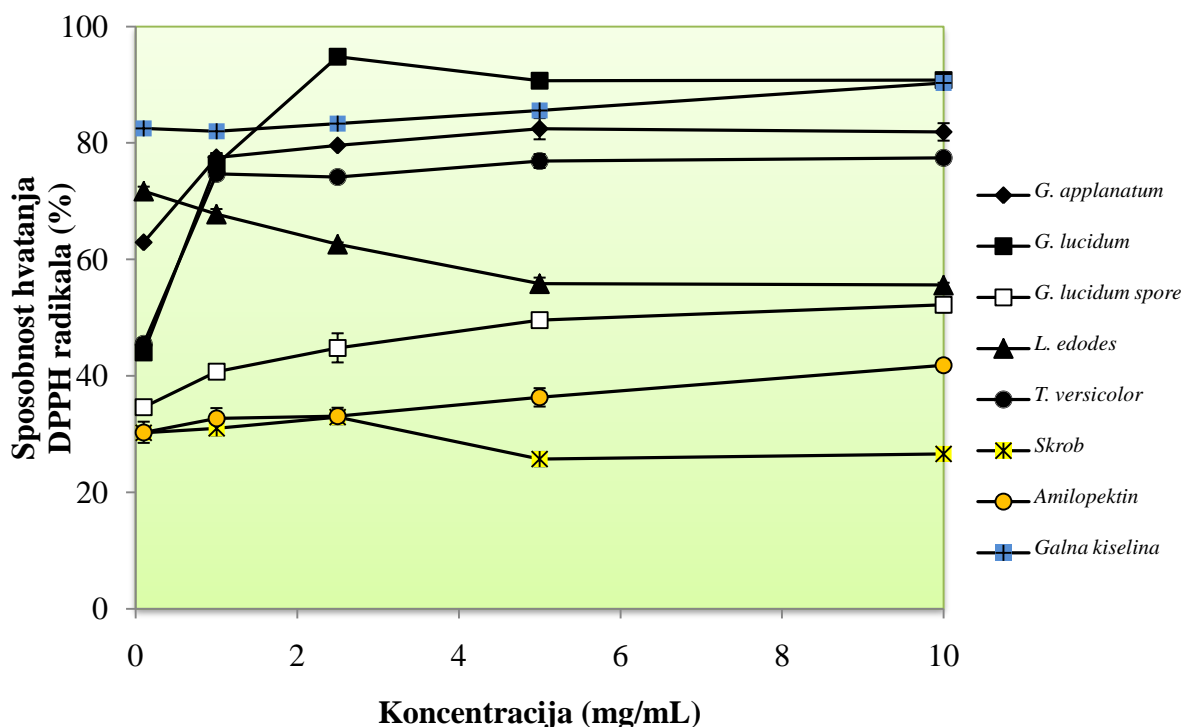
#### **4.3.2. ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA POLISAHARIDNIH EKSTRAKATA PREČIŠĆENIH DIJALIZOM**

##### **4.3.2.1. SPOSOBNOST HVATANJA DPPH RADIKALA**

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala polisaharidnih ekstrakata izolovanih iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum* i *T. versicolor* povećavala se sa porastom koncentracija od 0,1 do 1 mg/mL i postigla je svoj maksimum od 77,5-81,9 i 74,7-77,5%, na 1-10 mg/mL (slika 4.27). Ekstrakt gljive *L. edodes* pokazao je najveću sposobnost hvatanja radikala od 71,7 % pri 0,1 mg/mL. Sa porastom koncentracije (do 10 mg/mL) došlo je do smanjenja nastanka redukovanog neutralnog DPPH-H oblika. Kod polisaharidnog ekstrakta gljive *G. lucidum* zabeležen je maksimum od 94,8% pri 2,5 mg/mL. Pri većim koncentracijama, utvrđeno je opadanje sposobnosti hvatanja

slobodnih radikala. Isto ponašanje je primećeno i kod vodenog rastvora skroba koji je uzet za poređenje, slika 4.27. Sposobnost hvatanja slobodnih radikala polisaharidnog ekstrakta spora gljive *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt) dostigla je 52,2 % pri najvećoj koncentraciji (10 mg/mL). Različito ponašanje ispitivanih polisaharidnih ekstrakata može se objasniti strukturnom raznolikošću komponenti ekstrakata, različitom strukturom polisaharidnih molekula (Ker et al., 2005), različitim sastavom i količinom prisutnih fenolnih komponenti. Lo et al., (2011) potvrdili su direktnu vezu između monosaharidnog sastava, konformacije bočnih lanaca i sposobnosti hvatanja DPPH radikala polisaharida izolovanih iz filtrata submerznim gajenjem gljive *L. edodes*. Uočeno je da prisustvo glukopiranoznih jedinica međusobno povezanih  $\beta$ -(1,6)-glikozidnim vezama i arabinoze vezane (1,4)-vezama u bočnim lancima značajno utiče na sposobnost hvatanja radikala. Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala amilopektina i skroba u posmatranom opsegu koncentracija kretala se od 30,3-41,8% i 30,2-26,6%, respektivno. Galna kiselina je ispoljila značajno veću sposobnost hvatanja radikala u odnosu na ispitivane uzorke, od 82,5-90,3%. Polisaharidni ekstrakt spora okarakterisan kao uzorak sa najmanjim udelom nepolisaharidnih komponenti (% fenola u odnosu na sadržaj polisaharida 0,4; % proteina - 1,1; poglavlje 4.2.2.) pokazao je najmanju sposobnost hvatanja radikala u poređenju sa ostalim ekstraktima, što ukazuje na ulogu ostalih komponenti, prvenstveno fenolnih jedinjenja, prisutnih u polisaharidnim ekstraktima u ovom procesu.

U ispitivanom opsegu koncentracija, sposobnost hvatanja DPPH radikala za pozitivne kontrole BHT, askorbinsku kiselinu i  $\alpha$ -toferol bila je 1,1-55,2%, 80,6-87,6% i 79,9-78,4%, slika 4.23.



**Slika 4.27.**..Sposobnost hvatanja DPPH radikala polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt). Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

#### 4.3.2.2. INHIBICIJA PEROKSIDACIJE LIPIDA

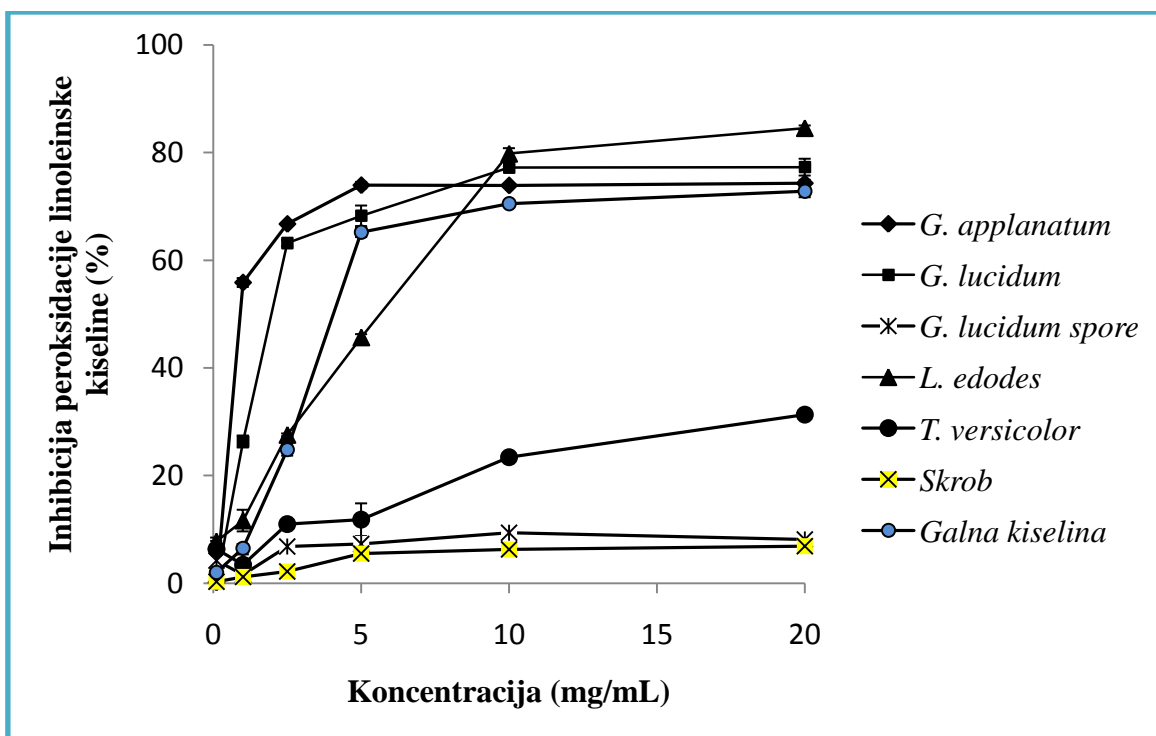
Ispitivani polisaharidni ekstrakti ispoljili su različito ponašanje u prevenciji peroksidacije linoleinske kiseline, slika 4.28. Stepenn inhibitorne aktivnosti ekstrakta gljive *G. applanatum* rastao je sa porastom koncentracija od 0,1 do 5 mg/mL i dostigao je maksimum od 73,9-74,3% pri 5-20 mg/mL. Ekstrakt gljive *G. lucidum* ispoljio je isto ponašanje u inhibiciji peroksidacije; stepenn inhibitorne aktivnosti povećavao se od 0,1 do 10 mg/mL, nakon čega je dostigao maksimum od 77,2-77,3% pri koncentracijama od 10-20 mg/mL. Nasuprot tome, ekstrakti gljiva *T. versicolor* i *L. edodes* pokazali su stalni porast inhibitorne aktivnosti do 31,3% i 84,6% pri najvećoj koncentraciji od 20 mg/mL. Inhibitorna aktivnost ekstrakta spora gljive *G. lucidum* nije prelazila 9%, slika 4.28. Inhibitorna aktivnost skroba bila je 6,5% za koncentraciju od 20 mg/mL.

Prema Lo et al. (2011), stepen inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu linoleinske kiseline polisaharida izolovanih iz gljive *L. edodes* kretao se od 14,56% do 58,27%, pri koncentraciji od 1,5 mg/mL. Ustanovljena je visoka korelacija između sadržaja pojedinih monosaharidnih jedinica u polisaharidnim ekstraktima i inhibitorne aktivnosti. Inhibitorna aktivnost se povećavala sa porastom koncentracija manoze i ramnoze, a smanjivala se sa smanjenjem koncentracija arabinoze i glukoze.

Galna kiselina je ispoljila porast inhibitorne aktivnosti sa povećanjem koncentracije do 10 mg/mL, pri čemu je maksimum od 70,5-72,8% postignut na 10-20 mg/mL.

Ekstrakt izolovan iz spora gljive *G. lucidum* i skrob ispoljili su skoro isto ponašanje u sprečavanju inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline. Nizak sadržaj nepolisaharidnih, prvenstveno fenolnih komponenti i dominantan sadržaj glukoze u ekstraktu iz spora *G. lucidum* ukazao je na značaj nepolisaharinih komponenti ekstrakta u ovom procesu.

Inhibitorna aktivnost askorbinske kiseline i  $\alpha$ -tokoferola iznosila je 63,8% i 65,4% na 20 mg/mL, slika 4.24.



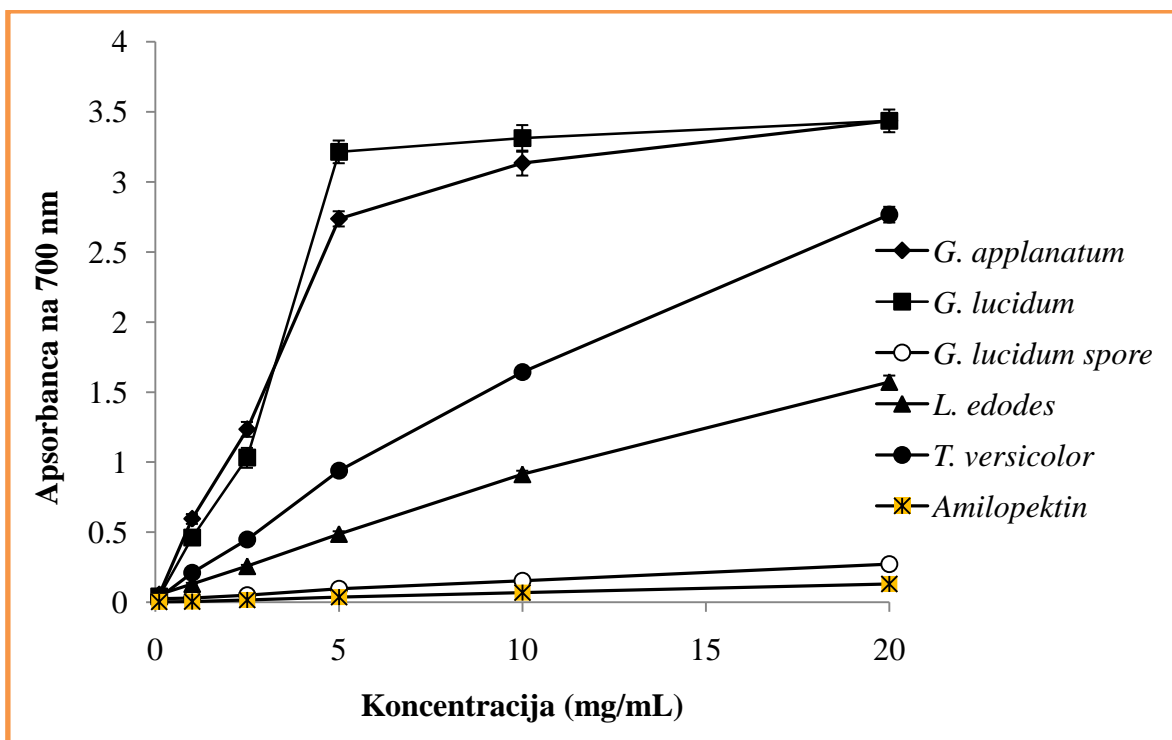
**Slika 4.28.** Dejstvo polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i *G. lucidum* spora na inhibiciju lipidne peroksidacije u model sistemu linoleinske kiseline. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

#### 4.3.2.3. REDUKCIONA SVOJSTVA

Polisaharidni ekstrakti plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum*, pokazali su visok potencijal doniranja elektrona u ovoj metodi, koja se bazira na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$ /fericijanidnog kompleksa u  $\text{Fe}^{2+}$  oblik u prisustvu antioksidansa (reduktora) u ispitivanom uzorku, slika 4.29. Ekstrakti gljiva *G. applanatum*, *T. versicolor* i *L. edodes* ispoljili su konstantno povećanje sposobnosti redukcije u ispitivanom opsegu koncentracija. Za koncentraciju od 20 mg/mL, sposobnost redukcije navedenih ekstrakata iznosila je, na osnovu rezultata dobijenih merenjem  $A_{700}$ : 3,4, 2,8 i 1,6. Moć redukcije ekstrakta gljive *G. lucidum* je rasla sa povećanjem koncentracija od 0,1 do 5 mg/mL i dostigla je maksimum od 3,2-3,4 za koncentracije od 5-20 mg/mL. Askorbinska kiselina je ispoljila vrednost od 3,5 pri na 20 mg/mL. Tamno plava boja (Perl's Prussian blue) rastvora posle reakcije sa galnom kiselinom ukazala je na njenu izuzetno visoku reduktivnu sposobnost. Yen et al. (2002) potvrdili su da je moć redukcije galne kiseline veća od askorbinske kiseline u opsegu koncentracija od 0–0,24 mM. Sposobnost redukcije amilopektina bila je izuzetno niska, 0,1 pri koncentraciji od 20 mg/mL. Sposobnost redukcije skroba nije zabeležena. Polisaharidni ekstrakt spora gljive *G. lucidum* ispoljio je veoma nisku (poredivu sa amilopektinom) sposobnost redukcije, slika 4.29.

Shimada et al. (1992) su potvrdili da ksantan i metilceluloza pokazuju zanemarljivo malu reduktivnu sposobnost u poređenju sa sposobnošću redukcije askorbinske kiseline. Lo et al. (2011) su takođe potvrdili slabu korelaciju između sadržaja ukupnih polisaharida i sposobnosti redukcije. Moć redukcije polisaharida izolovanih iz gljive *L. edodes* je bila daleko niža od izmerene sposobnosti za askorbinsku kiselinu, butilovani hidroksianisol (BHA) i limunsku kiselinu.

Dobijeni rezultati ukazuju takođe da je visoka sposobnost redukcije ispitivanih polisaharidnih ekstrakata uslovljena prisustvom nepolisaharidnih komponenti u ekstraktima, tabela 4.8., koje imaju svojstvo da reaguju sa slobodnim radikalima; da ih neutrališu i prekinu lančanu reakciju.



**Slika 4.29.** Sposobnost redukcije polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum*. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )

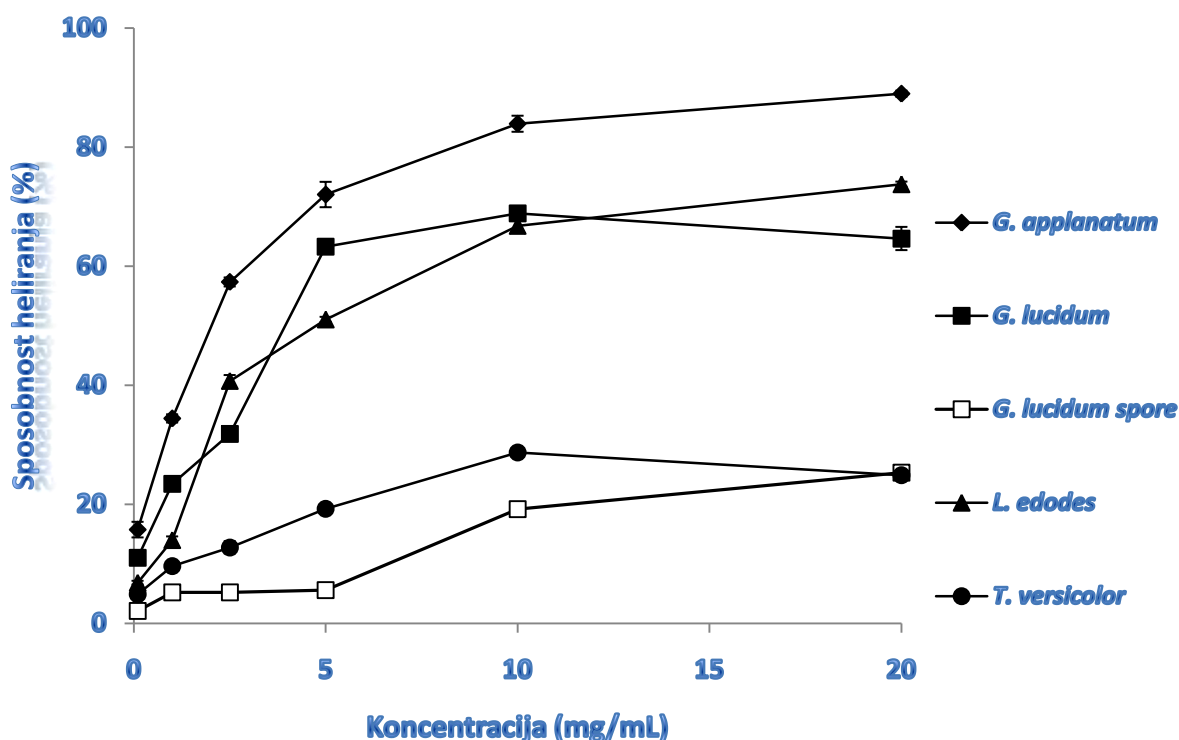
#### 4.3.2.4. SPOSOBNOST HELIRANJA JONA GVOŽĐA

Sposobnost heliranja gvožđa polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* pri koncentracijama od 0,1-20 mg/mL bila je od 15,7-89,0%, 11,0-64,6%, 6,8-73,8%, 4,9-24,9 i 2,1-25,3%, respektivno (slika 4.30). Polisaharidni ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *T. versicolor* dostigli su maksimum od 68,9 i 287% pri koncentraciji od 10 mg/mL. Helirajući efekat EDTA bio je između 91,6-99% za ispitivani opseg koncentracija. Galna kiselina, skrob i amilopektin nisu ispoljili sposobnost heliranja jona gvožđa u ovoj metodi.

Satoh i Sakagami, (1997) su potvrdili da reakcija galne kiseline sa jonima metala, kao što su  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{CuCl}_2$  i  $\text{FeCl}_2$ , utiče na pojačanu degradaciju galne kiseline, što povećava koncentraciju novonastalih radikala ovog jedinjenja. Yen et al. (2002) su potvrdili da galna kiselina ne ispoljava helirajući efekat sa fero jonima. Wang et al.,

(2009) su zaključili da vodeni ekstrakti dobijeni iz islandskih morskih algi ispoljavaju veću sposobnost heliranja gvožđa u poređenju sa ekstraktima dobijenim ekstrakcijom sa 70% acetonom. Nije potvrđena korelacija između ukupnog sadržaja fenola u ovim ekstraktima i sposobnosti heliranja, što sugeriše na činjenicu da su druge prisutne komponente, polisaharidi, proteini i peptidi bili efikasniji helirajući agensi.

Nasuprot tome, Budhiyanti et al. (2011), su uočili pozitivnu korelaciju između sposobnosti heliranja fero jona i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja ekstrakta ćelijske membrane alge *Sargassum hystrix*. Moć heliranja metalnih jona koju pokazuju fenolna jedinjenja u funkciji je njihove karakteristične strukture, broja i položaja hidroksilnih grupa, kao što su to, na primer, orto-dihidroksi fenoli (Khokhar i Apenten, 2003).



**Slika 4.30.** Sposobnost heliranja gvožđa polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum*. Podaci predstavljaju srednje vrednosti  $\pm$  standardne devijacije ( $n=3$ )



### 4.3.3. VREDNOSTI EC<sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE U ANTIOKSIDATIVNIM METODAMA

Antioksidativna sposobnost ekstrakata gljiva u ispitivanju hvatanja slobodnih DPPH radikala, inhibicije peroksidacije lipida, reduktivne sposobnosti i sposobnosti heliranja ferio jona izražene su pomoću EC<sub>50</sub> (mg/mL) vrednosti koje predstavljaju efektivne koncentracije polisaharidnih ekstrakata pri kojima se postiže 50% antioksidativnih aktivnosti, tabele 4.12 i 4.13. Manje EC<sub>50</sub> vrednosti ukazuju na veća antioksidativna svojstva ekstrakata.

#### 4.3.3.1. VREDNOSTI EC<sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE DOBIJENE VODENOM EKSTRAKCIJOM

Polisaharidni ekstrakti spora gljive *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) i plodonosnih tela *P. linteus* pokazali su veoma dobru sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Njihove EC<sub>50</sub> vrednosti bile su < 0,1 mg/mL, tabela 4.12. Dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti pri ispitivanju hvatanja DPPH radikala za ekstrakte plodonosnih tela *A. brasiliensis* i *A. bisporus* bile su 0,27 i 2,0 mg/mL. Askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol su se potvrdili kao veoma efikasni hvatači DPPH radikala (EC<sub>50</sub> < 0,1 mg/mL). Ove supstance se danas, u miligramskim količinama, najčešće koriste kao dodaci hrani. Za BHT, EC<sub>50</sub> vrednost je bila 11,86 mg/mL.

Dobijene EC<sub>50</sub> vrednosti pri ispitivanju sposobnosti inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline ekstrakata izolovanih iz spora *G. lucidum* i plodonosnih tela *P. linteus* i *A. brasiliensis* bile su 7,07, 7,11 i 13,25 mg/mL. Nije pronađena statistički značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ) između EC<sub>50</sub> vrednosti za ekstrakte gljiva *G. lucidum* i *P. linteus*. Vrednost EC<sub>50</sub> za ekstrakt gljive *A. bisporus*, u kome je pronađen nizak sadržaj fenolnih komponenti, bile su preko 20 mg/mL i nisu mogle da se očitaju, slika 4.24.  $\alpha$ -tokoferol se pokazao kao veoma efikasan agens u procesu inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline (EC<sub>50</sub> < 0,1 mg/mL). Izmerena vrednost EC<sub>50</sub> za askorbinsku kiselinu iznosila je 1,64 mg/mL.

Vrednosti EC<sub>50</sub> pri merenju sposobnosti redukcije polisaharidnih ekstrakata kretale su se od 0,47 mg/mL za ekstrakt gljive *P. linteus* do 14,83 mg/mL za ekstrakt gljive *A. bisporus*. Razlika u EC<sub>50</sub> vrednostima za ekstrakte gljiva *G. lucidum* i *P. linteus* nije bila statistički značajna ( $p \leq 0,05$ ). Askorbinska kiselina se pokazala kao veoma efikasan

redukujući agens ( $EC_{50} < 0,1$  mg/mL). Regresionom analizom je potvrđena statistički značajna, veoma visoka pozitivna korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za moć redukcije i ukupnog sadržaja glukana ( $r = 0,963$ ),  $\beta$ -glukana ( $r = 0,924$ ) i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,691$ ). Vrednosti  $EC_{50}$  su se povećavale sa povećanjem ukupne koncentracije glukana,  $\beta$ -glukana i polisaharida. Statistički značajna umerena negativna korelacija potvrđena je između  $EC_{50}$  vrednosti i ukupnog sadržaja proteina ( $r = -0,635$ ), što može da bude posledica prisustva reduktivnih amino kiselina cisteina, metionina i tirozina u proteinima ekstrakata. Korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti u sposobnosti redukcije i sadržaja ukupnih fenola je bila visoka i statistički značajna ( $r = -0,744$ ). Sa povećanjem ukupnog sadržaja fenola u ekstraktima  $EC_{50}$  vrednosti su se smanjivale, reduktivna moć se povećavala.

Vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti heliranja fero jona polisaharidnih ekstrakata bile su u rastućem redosledu, od 0,59 mg/mL za ekstrakt spora *G. lucidum* do 7,80 mg/mL za ekstrakt gljive *A. bisporus*, tabela 4.12. Razlika u  $EC_{50}$  vrednostima za ekstrakte gljiva *G. lucidum* i *P. linteus* nije bila statistički značajna ( $p \leq 0,05$ ). EDTA je ispoljio očekivanu veoma visoku sposobnost heliranja jona gvožđa ( $EC_{50} < 0,1$  mg/mL). Potvrđena je veoma visoka statistički značajna korelacija između dobijenih  $EC_{50}$  vrednosti za sposobnost heliranja i ukupnog sadržaja glukana ( $r = 0,967$ ),  $\beta$ -glukana ( $r = 0,939$ ) i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,725$ ). Regresiona analiza pokazala je umerenu negativnu korelaciju između  $EC_{50}$  vrednosti i sadržaja ukupnih proteina ( $r = -0,606$ ). Ostaci tirozinaza u polisaharidnim ekstraktima mogu da katalizuju oksidaciju  $Fe^{2+}$  i time da utiču na povećanje sposobnosti heliranja. Korelacija između ukupnog sadržaja fenola u ispitivanim ekstraktima i  $EC_{50}$  vrednosti za sposobnost heliranja bila je visoka negativna i statistički značajna ( $r = -0,733$ ).

Ekstrakt spora gljive *G. lucidum*, sa najmanjim sadržajem polisaharida, ukupnih glukana i  $\beta$ -glukana (tabela 4.1.) i najvećim procentom fenola u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida (20,4%) ispoljio je najveću sposobnost heliranja, što je rezultiralo najnižom vrednosti  $EC_{50}$ . Ekstrakt gljive *A. bisporus* sa najvećim sadržajem ukupnih polisaharida, ukupnih glukana,  $\beta$ -glukana i najmanjim sadržajem fenola (0,5%) pokazao je najmanju sposobnost heliranja gvožđa, odnosno najveću  $EC_{50}$  vrednost.

**Tabela 4.12.** Vrednosti EC<sub>50</sub> polisaharidnih ekstrakata iz plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *A. brasiliensis*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* (komercijalni ekstrakt) u antioksidativnim metodama

	EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (mg ekstrakta/mL)			
	<i>A. bisporus</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>G. lucidum</i> spore	<i>P. linteus</i>
Sposobnost hvatanja DPPH radikala	2,00 ± 0,18 A <sup>b</sup>	0,27 ± 0,02 B	< 0,1	< 0,1
Inhibicija peroksidacije lipida	> 20	13,25 ± 0,30 A	7,07 ± 0,23 B	7,11 ± 0,13 B
Sposobnost redukcije	14,83 ± 1,16 A	3,13 ± 0,14 B	0,67 ± 0,01 C	0,47 ± 0,03 C
Sposobnost heliranja jona gvožđa	7,80 ± 0,21 A	2,04 ± 0,58 B	0,59 ± 0,01 C	0,91 ± 0,18 C

<sup>a</sup> EC<sub>50</sub> vrednosti: efektivna koncentracija pri kojoj je 50% 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala prevedeno u redukovani DPPH-H oblik; postignuto 50% inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline; apsorbancija je bila 0,5 za reduktivnu sposobnost; helirano je 50% fero jona. EC<sub>50</sub> vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

<sup>b</sup> Svaka vrednost je izražena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju, p≤0,05, ANOVA, Fisher's LSD

#### 4.3.3.2. VREDNOSTI EC<sub>50</sub> ZA POLISAHARIDNE EKSTRAKTE KOJI SU PREČIŠĆENI DIJALIZOM

Rezultati sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala, inhibicije peroksidacije lipida, sposobnosti redukcije i heliranja fero jona izraženi u EC<sub>50</sub> (mg ekstrakta/mL) vrednostima prikazani su u tabeli 4.13.

Polisaharidni ekstrakti plodonosnih tela gljiva *G. applanatum* i *L. edodes* pokazali su veoma dobru sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Njihove EC<sub>50</sub> vrednosti bile su < 0,1 mg/mL. EC<sub>50</sub> vrednosti za ekstrakte iz plodonosnih tela gljiva *G. lucidum* i *T. versicolor* i spora *G. lucidum* bile su u opsegu od 0,10 do 3,99 mg/mL. Galna kiselina se pokazala kao veoma efikasan hvatač slobodnih DPPH radikala (EC<sub>50</sub> < 0,1 mg/mL, slika 4.27). EC<sub>50</sub> vrednosti za skrob i amilopektin bile su > 20 mg/mL.

U istraživanjima Tsiapali et al. (2001), potvrđeno je da je sposobnost hvatanja slobodnih radikala ugljenih hidrata mala u poređenju sa dobro poznatim hvatačima kao

što su pirolidin ditiokarbamat (PDTC) ili Troloks. Sposobnost hvatanja radikala zavisi od monosaharidnih komponenti u polisaharidima. Polimeri se odlikuju većom sposobnošću neutralisanja slobodnih radikala od samih monosaharida, ali je ta sposobnost i dalje prilično niska. Polielektroliti, kao što su sulfonovani ili fosforilovani glukani, lipopolisaharidi i iznenađujuće-manani, spoljavaju znatno višu sposobnost hvatanja slobodnih radikala. Vodene frakcije egzopolisaharida iz soja KFS-9 *Pantoea agglomerans*, koje u svom sastavu sadrže Ara, Glc, Gal, i GlcA, ispoljile su veoma jaku sposobnost hvatanja reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (Dong i Fang, 2001; Wang et al., 2007). Sposobnost hvatanja slobodnih radikala kod polisaharida može da bude uslovljena prisustvom vodonika iz specifičnih, određenih monosaharidnih komponenti i tipom njihovog povezivanja u bočnim nizovima glavnog lanca. Polisaharidi gljive *L. edodes* ispoljili su visoku sposobnost hvatanja radikala u poredjenju sa askorbinskom kiselinom, BHA i limunskom kiselinom (Lo et al., 2011).

Rezultati dobijeni ispitivanjem sposobnosti hvatanja slobodnih DPPH radikala ukazali su da je za ispitivane polisaharidne ekstrakte ova sposobnost bila zavisna od koncentracija ekstrakata, slika 4.27. Ekstrakt plodonosnih tela gljive *G. lucidum*, sa najvišim sadržajem glukana, tabela 4.8., ispoljio je najveću sposobnost hvatanja u koncentracijama preko 2,5 mg/mL. Ekstrakt gljive *L. edodes* dostigao je maksimum (71,7%) pri 0,1 mg/mL. Pri koncentraciji 1,0 mg/mL sposobnost hvatanja slobodnih radikala ekstrakata plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum* i *T. versicolor* bila je porediva i iznosila je 77,5, 76,4 i 74,7%, respektivno. U polisaharidima gljive *G. applanatum* potvrđen je najniži sadržaj glukana, tabela 4.29., kao i prisustvo uronskih kiselina, čije prisustvo nije utvrđeno u drugim ekstraktima. <sup>1</sup>H-NMR analiza je potvrdila najviši sadržaj manoze u polisaharidima gljive *G. applanatum*. Za ekstrakt spora gljive *G. lucidum*, sa visokim sadržajem ukupnih polisaharida (82,3g/100g), ukupnih glukana (70,7% u odnosu na ukupne polisaharide) i jako malim ukupnim sadržajem fenola (0,3 g/100g) u odnosu na druge ekstrakte, sposobnost hvatanja slobodnih radikala je dostigla svoj maksimum na 20 mg/mL (52,2%) i bila je nešto veća od rastvora amilopektina (41,8%).

Rezultati pokazuju da je konformacija polisaharida u dijalizovanim polisaharidnim ekstraktima od većeg značaja nego sadržaj ovih polimera u odnosu na sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala. Ekstrakti plodonosnih tela gljiva *G. applanatum* i *L.*

*edodes* su se mogli porediti sa  $\alpha$ -tokoferolom i askorbinskom kiselinom po sposobnosti hvatanja DPPH radikala,  $EC_{50} < 0,1$  mg/mL.

Vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline za ekstrakte gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum* i *L. edodes* iznosile su 2,07, 4,05 i 8,12 mg/mL. Vrednosti  $EC_{50}$  za ekstrakte gljive *T. versicolor* i spora *G. lucidum* bile su preko 20 mg/mL i nisu se mogle očitati sa grafika. Galna kiselina se pokazala kao dobar inhibitor peroksidacije linoleinske kiseline ( $EC_{50} = 5,83$  mg/mL). Skrob i amilopektin nisu ispoljili sposobnost inhibicije peroksidacije.

Vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti redukcije za ekstrakte gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *T. versicolor* i *L. edodes* bile su 0,18, 0,83, 2,66 i 5,37 mg/mL, respektivno. Vrednost  $EC_{50}$  za ekstrakt spora *G. lucidum* nije se mogao očitati sa grafika,  $> 20$  mg/mL. Moć redukcije skroba i amilopektina bila je veoma niska. Na 20 mg/mL izmerene su apsorbance od 0,07 i 0,1. Galna kiselina je ispoljila visoku sposobnost redukcije ( $EC_{50} < 0,1$  mg/mL). Regresiona analiza je potvrdila korelaciju između  $EC_{50}$  vrednosti za moć redukcije polisaharidnih ekstrakata gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *T. versicolor* i *L. edodes* i ukupnog sadržaja polisaharida,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukana i ukupnog sadržaja fenola. Korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za sposobnost redukcije i ukupnog sadržaja fenola bila je statistički značajna i veoma visoka ( $r = - 0,909$ ,  $p \leq 0,05$ ), kao i korelacija između  $EC_{50}$  i ukupnog sadržaja  $\alpha$ -glukana ( $r = - 0,966$ ). Potvrđena je visoka pozitivna korelacija između  $EC_{50}$  i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,718$ ). Korelacija između  $EC_{50}$  i ukupnog sadržaja  $\beta$ -glukana bila je statistički značajna ( $r = 0,585$ ,  $p \leq 0,05$ ). Korelacija sa ukupnim sadržajem glukana nije bila statistički značajna. Smanjenje  $EC_{50}$  vrednosti praćeno je povećanjem sadržaja ukupnih fenola i  $\alpha$ -glukana u polisaharidnim ekstraktima. Primećena je pozitivna visoka korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za sposobnost redukcije i ukupnog sadržaja proteina ( $r = 0,776$ ), što može da bude posledica prisustva reduktivnih amino kiselina cisteina, metionina i tirozina u proteinima ekstrakata (poglavlje 4.3.3.1). Ekstrakt gljive *G. applanatum*, sa najvišim sadržajem fenola i  $\alpha$ -glukana, ispoljio je najveću moć redukcije (najniža  $EC_{50}$ ). Vrednosti  $EC_{50}$  su se povećavale sa smanjenjem ukupnog sadržaja fenola i  $\alpha$ -glukana, tabela 4.8., što ukazuje na moguće komplekse fenola i  $\alpha$ -glukana u polisaharidnim ekstraktima gljiva.

Polisaharidi kovalentno vezuju fenolna jedinjenja preko svojih karbonilnih grupa (Fry, 2004; Wong, 2006). FT-IR analizom polisaharidnog ekstrakta gljive *G. applanatum* (slika 4.13) ukazano je na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih C=O grupa uronskih kiselina kao strukturnih komponenti jednog (ili više) polisaharida koji se nalaze u ispitivanom ekstraktu.

Određivanje sadržaja fenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa zasniva se na reakcijama prenosa elektrona (Huang et al., 2005). Zbog toga se prilikom određivanja ukupnog sadržaja fenola mora uzeti u obzir prisustvo drugih jedinjenja u ekstraktima kao što su organske kiseline, šećeri i amino kiseline, a koja takođe mogu da učestvuju u procesima prenosa elektrona. Ako se čak zanemari prisustvo navedenih jedinjenja, različita fenolna jedinjenja daju različite rezultate sa Folin Ciocalteu reagensom. Dok katehin, rutin, kafeinska i galna kiselina pokazuju slično ponašanje, neki flavonoidi pokazuju manje apsorbance od očekivanih što dovodi do pogrešnog tumačenja rezultata. Zbog toga je neophodno da se tačno identifikuju strukture fenolnih jedinjenja koja su odgovorna za antioksidativnu aktivnost u polisaharidnim ekstraktima.

Vrednosti  $EC_{50}$  za sposobnost heliranja fero jona ekstrakata gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum* i *L. edodes* bile su 3,58, 7,34 i 8,83 mg/mL. Vrednosti  $EC_{50}$  za ekstrakte gljiva *T. versicolor* i spora *G. lucidum* iznosile su preko 20 mg/mL i nisu mogle da se očitaju sa grafika. Galna kiselina, skrob i amilopektin nisu pokazali sposobnost heliranja jona gvožđa. Vrednosti  $EC_{50}$  u sposobnosti heliranja za ispitivane ekstrakte smanjivale su se sledećim redosledom: spore *G. lucidum*  $\approx$  *T. versicolor* > *L. edodes*  $\approx$  *G. lucidum* > *G. applanatum*. Kod polisaharida ekstrakta gljive *G. applanatum* potvrđen je najmanji sadržaj glukana, tabela 4.8. Prisustvo uronskih kiselina utvrđeno je samo u polisaharidima gljive *G. applanatum*. Vrednosti  $EC_{50}$  za ovaj ekstrakt su bile 2-2,5 puta niže od  $EC_{50}$  vrednosti za ekstrakte gljiva *G. lucidum* i *L. edodes*. Slobodne karboksilne grupe iz uronskih kiselina, kao i njihova homogena raspodela u ekstracelularnim polisaharidima iz *Chlorella* spp. imaju glavnu ulogu u sposobnosti heliranja metalnih jona (Kaplan et al., 1987). Pristov et al. (2011) su, pomoću elektronske paramagnetne rezonance (electron paramagnetic resonance-EPR), metodom preklapanja spinova, utvrdili da su glavni nosioci anti-Fenton-ove aktivnosti u zidu biljnih ćelija, pektin i ksilan. Lo et al. (2011) su potvrdili da je ramnoza, prisutna u polisaharidima, dominantna komponenta u modulaciji intenziteta svojstva heliranja, kao i da struktura

glikozidne veze nema uticaja na sposobnost heliranja. U komercijalnom ekstraktu spora *G. lucidum*, koji je pokazao najbolju sposobnost heliranja fero jona, utvrđeno je da su gotovo svi glukani ekstrakta povezani  $\alpha$ -vezama (94,2%), suprotno od glukana iz plodonosnih tela ostalih ekstrakata koji su uglavnom bili  $\beta$ -glukani. Međutim, skrob i amilopektin nisu ispoljili sposobnost heliranja jona gvožđa po ovoj metodi, što ukazuje da struktura glikozidne veze nije presudna i da je prisustvo nepolisaharidnih, prvenstveno fenolnih komponenti u ovom ekstraktu značajno u ispoljavanju sposobnosti heliranja.

Ukupan sadržaj proteina u ekstraktima gljiva *G. applanatum* i *T. versicolor* se nije značajno razlikovao, tabela 4.8. Vrednosti  $EC_{50}$  za sposobnost heliranja ovih ekstrakata su se značajno razlikovale, 3,58 i > 20 mg/mL, što bi ukazivalo da proteini u ispitivanim ekstraktima nemaju značaj u procesu heliranja gvožđa.

**Tabela 4.13.** Vrednosti  $EC_{50}$  polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum*, *L. edodes*, *T. versicolor* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt) u antioksidativnim metodama

	$EC_{50}^a$ (mg ekstrakta/mL)				
	<i>G. applanatum</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>L. edodes</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>G. lucidum spore</i>
Sposobnost hvatanja DPPH radikala	< 0,1	0,10 ± 0,05 C	< 0,1	0,23 ± 0,02 B	3,99 ± 0,02 A
Inhibicija peroksidacije lipida	2,07 ± 0,03 C	4,05 ± 0,11 B	8,12 ± 0,02 A	> 20	> 20
Sposobnost redukcije	0,18 ± 0,09 D	0,83 ± 0,03 C	5,37 ± 0,44 A	2,66 ± 0,20 B	> 20
Sposobnost heliranja	3,58 ± 0,37 C	7,34 ± 0,28 B	8,26 ± 0,03 A	> 20	> 20

<sup>a</sup>  $EC_{50}$  vrednosti: efektivna koncentracija pri kojoj je 50% 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala prevedeno u redukovani DPPH-H oblik; postignuto 50% inhibicije peroksidacije linoleinske kiseline; apsorbancija je bila 0,5 za reduktivnu sposobnost; helirano je 50% fero jona.  $EC_{50}$  vrednosti su dobijene interpolacijom u linearnoj regresionoj analizi.

<sup>b</sup> Svaka vrednost je izražena kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n=3). Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički značajno razlikuju,  $p \leq 0.05$ , ANOVA, Fisher's LSD

$EC_{50} > 20$  mg/mL i  $EC_{50} < 1$  mg/mL se ne mogu čitati sa grafika

#### 4.4. ANTIMIKROBNA SVOJSTVA

Mikrobiološko kvarenje hrane i trovanje hranom su jedan od najvažnijih problema sa kojima se suočava prehrambena industrija. Bolesti nastale usled kvarenja hrane i trovanja hranom su danas globalni problem, čak i u razvijenim zemljama. S obzirom da postoji konstantni porast rezistentnosti patogena na poznate antimikrobne agense, potreba za novim terapijskim lekovima i konzervansima u prehrambenoj industriji je neophodnost. Stoga, rezultati istraživanja koji ukazuju na antimikrobnu aktivnost prirodnih proizvoda mogu biti od velikog praktičnog značaja.

##### 4.4.1. ANTIBAKTERIJSKA I ANTIFUNGALNA AKTIVNOST

Osetljivost svih ispitivanih bakterijskih ATCC sojeva i četiri ATCC soja kvasaca na polisaharidne ekstrakte i standarde antibiotika su prikazani u tabelama 4.14a.- 4.14f.

Iz prikazanih rezultata se uočava veća osetljivost Gram-pozitivnih bakterija na testirane ekstrakte, u odnosu na Gram-negativne bakterije. Najveću osetljivost su pokazale bakterije *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. faecalis* ATCC 49532, kod kojih su se najveće zone inhibicije javile u prisustvu svih polisaharidnih ekstrakata. Ekstrakti gljiva *G. applanatum*, *G. lucidum* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt) ispoljili su mikrobicidno dejstvo na oba soja. Ekstrakti gljiva *P. linteus* i *T. versicolor* pokazali su mikrobicidno dejstvo na *E. faecalis* ATCC 49532. Ekstrakt iz gljive *A. brasiliensis* i komercijalni ekstrakt iz spora *G. lucidum* delovali su mikrobicidno na bakteriju *E. faecalis* ATCC 29212. Dejstvo ekstrakata na ostale Gram-pozitivne bakterije je bilo mikrobiostatsko. Polisaharidni ekstrakti su ispoljili značajne zone inhibicije kod bakterije *B. cereus* ATCC 10876 (od 22,8 do 38,2 mm), osim nešto manjeg dejstva kod ekstrakta gljive *G. applanatum* (14,9 mm). Ekstrakti su ispoljili veće zone inhibicije kod bakterije *Geobacillus stearothermophilus* 7953. Najveće zone inhibicije su izmerene kod ekstrakata gljive *T. versicolor* (34,2 mm) i komercijalnog ekstrakta spora *G. lucidum* (38,8 mm).



**Tabela 4.14a.** Antimikrobna aktivnost<sup>a</sup> polisaharidnih ekstrakata (izolovanih iz *G. lucidum*, *G. applanatum*, spora *G. lucidum*, laboratorijski ekstrakt) na odabrane bakterije i kvasce; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	<i>G. lucidum</i>	spore <i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	23,2 ± 0,4	16,7 ± 0,2	17,8 ± 0,3
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	21,3 ± 0,3	19,4 ± 0,4	20,6 ± 0,4
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	43,7 ± 0,4*	38,6 ± 0,5*	34,5 ± 0,2*
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	46,8 ± 0,3*	44,3 ± 0,3*	33,2 ± 0,1*
<i>Bacillus cereus</i> 10876	36,5 ± 0,7	38,2 ± 0,4	14,9 ± 0,5
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	23,3 ± 0,4	26,2 ± 0,2	14,6 ± 0,7
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	21,7 ± 0,6	11,2 ± 0,3	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	17,1 ± 0,5	10,8 ± 0,1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	12,4 ± 0,3	11,3 ± 0,2	9,1 ± 0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	16,3 ± 0,4	14,3 ± 0,2	9,4 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i> 25922	17,4 ± 0,6	11,2 ± 0,3	8,2 ± 0,2
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	13,7 ± 0,3	12,2 ± 0,2	10,5 ± 0,1
<i>Proteus hauseri</i> 13315	15,6 ± 0,3	16,7 ± 0,3	8,2 ± 0,1
<i>Shigella sonnei</i> 29930	12,8 ± 0,2	10,7 ± 0,1	8,6 ± 0,4
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	12,5 ± 0,2	11,1 ± 0,1	10,5 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	16,3 ± 0,2	15,8 ± 0,4	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	18,4 ± 0,6	13,7 ± 0,3	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	18,7 ± 0,3	14,3 ± 0,1	16,9 ± 0,6
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke kolekcije tipskih kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland).

Svi testovi su urađeni u tri nezavisna ponavljanja za svaki mikroorganizam i polisaharidni ekstrakt.

<sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3). \*Ekstrakt je delovao mikrobicidno

Gram-negativne bakterije su bile manje osjetljive na dejstvo ekstrakata. Najveće zone inhibicije, mikrobiostatsko dejstvo, ispoljeno je kod bakterije *Klebsiella pneumoniae* ATTC 27736. Kod komercijalnog ekstrakta spora iz *G. lucidum* izmerena je najveća zona inhibicije, 28,3 mm.

Nijedan od ekstrakata u ispitivanoj koncentraciji nije imao uticaja na testirane kvasce.

**Tabela 4.14b.** Antimikrobna aktivnost<sup>a</sup> polisaharidnih ekstrakata (izolovanih iz *L. edodes*, *T. versicolor*, *A. brasiliensis*) na odabrane bakterije i kvasce; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	<i>L. edodes</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	11,6 ± 0,2	14,3 ± 0,1	9,0 ± 0,0
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	10,5 ± 0,2	9,8 ± 0,2	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	30,6 ± 0,2	35,6 ± 0,3	42,7 ± 0,4*
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	34,4 ± 0,4	39,5 ± 0,5*	38,6 ± 0,3
<i>Bacillus cereus</i> 10876	28,7 ± 0,2	33,6 ± 0,2	29,3 ± 0,7
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	26,2 ± 0,3	34,2 ± 0,7	24,3 ± 0,6
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	15,6 ± 0,4	10,2 ± 0,5	9,6 ± 0,3
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	-	12,7 ± 0,4	10,8 ± 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	10,2 ± 0,2	12,4 ± 0,3	9,5 ± 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	12,6 ± 0,3	14,8 ± 0,2	11,3 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i> 25922	10,6 ± 0,5	12,8 ± 0,3	10,2 ± 0,2
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	8,2 ± 0,1	15,3 ± 0,2	9,8 ± 0,3
<i>Proteus hauseri</i> 13315	12,3 ± 0,4	15,8 ± 0,2	13,9 ± 0,2
<i>Shigella sonnei</i> 29930	-	15,2 ± 0,2	8,7 ± 0,1
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	-	16,7 ± 0,5	9,7 ± 0,2
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 12900	16,6 ± 0,4	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,3
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 35150	18,3 ± 0,1	20,3 ± 0,3	15,5 ± 0,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	14,7 ± 0,5	24,6 ± 0,4	15,2 ± 0,1
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke kolekcije tipskih kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). <sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3). \*Ekstrakt je delovao mikrobicidno

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da su Gram-pozitivne bakterije bile osetljivije na primenjene ekstrakte gljiva, što je u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima (Turkoglu et al., 2006, Turkoglu et al., 2007a,b). Moguće je da se aktivnost ekstrakata ispoljava na nivou ćelijskog zida, odnosno na nivou razgradnje mureinskog sloja koji je znatno deblji i porozniji kod Gram-pozitivnih bakterija (Sarić, 1989).

**Tabela 4.14c.** Antimikrobna aktivnost<sup>a</sup> polisaharidnih ekstrakata (izolovanih iz *A. bisporus*, *P. linteus* i spora *G. lucidum*-komercijalni ekstrakt) na odabrane bakterije i kvasce; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	<i>A. bisporus</i>	<i>P. linteus</i>	spore <i>G. lucidum</i> (kom.)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	-	10,8 ± 0,0	11,6 ± 0,1
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	-	9,3 ± 0,4	10,4 ± 0,6
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	24,8 ± 0,3	37,5 ± 0,5	42,2 ± 0,2*
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	26,7 ± 0,2	43,6 ± 0,4*	44,8 ± 0,3*
<i>Bacillus cereus</i> 10876	27,5 ± 0,4	22,8 ± 0,4	34,7 ± 0,6
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	22,8 ± 0,3	21,8 ± 0,5	38,8 ± 0,6
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	8,6 ± 0,2	9,7 ± 0,3	10,3 ± 0,2
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	9,6 ± 0,4	10,4 ± 0,2	12,5 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	9,2 ± 0,3	10,7 ± 0,5	15,8 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	10,4 ± 0,6	12,3 ± 0,1	17,7 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> 25922	9,3 ± 0,1	9,8 ± 0,2	11,7 ± 0,3
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	8,8 ± 0,2	8,7 ± 0,1	12,7 ± 0,2
<i>Proteus hauseri</i> 13315	12,1 ± 0,1	11,6 ± 0,7	14,3 ± 0,3
<i>Shigella sonnei</i> 29930	9,2 ± 0,1	8,9 ± 0,1	14,6 ± 0,2
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	9,8 ± 0,1	10,2 ± 0,1	17,3 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	10,3 ± 0,2	-	13,8 ± 0,3
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	12,7 ± 0,4	-	14,6 ± 0,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	22,3 ± 0,2	17,6 ± 0,4	28,3 ± 0,2
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke kolekcije tipskih kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). <sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3). Svi testovi su urađeni u tri ponavljanja za svaki mikroorganizam i polisaharidni ekstrakt. \*Ekstrakt je delovao mikrobicidno

**Tabela 4.14d.** Antibiogram<sup>a</sup> testiranih bakterijskih i sojeva kvasaca na kanamicin, eritromicin, penicilin; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	Kanamicin (30 µg/disk)	Eritromicin (15 µg/disk)	Penicilin (6 µg/disk)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	17,8 ± 0,6	25,6 ± 0,2	25,4 ± 0,8
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	21,3 ± 0,6	25,3 ± 0,4	34,5 ± 0,5
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	11,5 ± 0,2	22,3 ± 0,4	13,7 ± 0,8
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	-	-	12,6 ± 0,5
<i>Bacillus cereus</i> 10876	13,5 ± 0,5	11,5 ± 0,2	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	12,6 ± 0,8	16,8 ± 0,2	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	13,6 ± 0,7	12,3 ± 0,5	11,2 ± 0,6
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	12,5 ± 0,5	13,6 ± 0,6	16,5 ± 0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	-	12,6 ± 0,2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	-	20,3 ± 0,4	-
<i>Escherichia coli</i> 25922	20,6 ± 0,1	-	11,5 ± 0,5
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	23,9 ± 0,8	11,6 ± 0,3	16,5 ± 0,5
<i>Proteus hauseri</i> 13315	24,3 ± 0,7	11,5 ± 0,3	19,8 ± 0,2
<i>Shigella sonnei</i> 29930	13,2 ± 0,8	-	14,2 ± 0,5
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	36,8 ± 0,2	19,6 ± 0,3	21,4 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	25,8 ± 0,5	19,6 ± 0,3	22,5 ± 0,6
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	11,3 ± 0,7	11,6 ± 0,5	11,8 ± 0,3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	9,6 ± 0,9	12,4 ± 0,5	15,4 ± 0,3
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

Svi testovi su urađeni u tri nezavisna ponavljanja za svaki mikroorganizam i antibiotik.

<sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

Standardi antibiotika su ispoljili antibakterijsko i antifungalno dejstvo u opsegu koncentracija od 6 do 30 µg/disk. Za tetraciklin i hloramfenikol je karakteristično da deluju na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, ali ne i na bakterije roda *Pseudomonas*; tetraciklin nije delovao na bakteriju *Shigella sonnei* ATCC 29930. Aminoglikozid kanamicin je delovao na ispitivane Gram-pozitivne bakterije, osim kod bakterije *Enterococcus faecalis* ATTC 49532. Bakterijski sojevi *Enterococcus faecalis* ATTC 29212 i *Enterococcus faecalis* ATTC 49532 bili su rezistentni na gentamicin i

neomicin. Aminoglikozidi su delovali na ispitivane Gram-negativne bakterije, osim bakterije roda *Pseudomonas*. Za penicilin i eritromicin je karakteristično da deluju na Gram-pozitivne bakterije; penicilin nije delovao na sojeve *Bacillus cereus* ATTC 10876 i *Geobacillus stearothermophilus* ATTC 7953. Bakterija *Enterococcus faecalis* ATTC 49532 bila je rezistentna na eritromicin. Bakterije *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 i *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 35032 su bile rezistentne na penicilin, dok su *Escherichia coli* ATTC 25922 i *Shigella sonnei* ATTC 29930 bile rezistentne na eritromicin. Antimikotik bifonazol je delovao na testirane ATCC sojeve kvasca.

**Tabela 4.14e.** Antibiogram<sup>a</sup> testiranih bakterijskih i sojeva kvasaca na hloramfenikol, gentamicin, tetraciklin; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	Hloramfenikol (30 µg/disk)	Gentamicin (30 µg/disk)	Tetraciklin (30 µg/disk)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	21,3 ± 0,3	18,2 ± 0,4	29,9 ± 0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	23,3 ± 0,2	20,8 ± 0,6	28,5 ± 0,2
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	12,6 ± 0,3	12,1 ± 0,9	15,8 ± 0,6
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	18,9 ± 0,3	-	24,3 ± 0,6
<i>Bacillus cereus</i> 10876	18,9 ± 0,4	14,8 ± 0,3	12,4 ± 0,6
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	15,6 ± 0,2	13,8 ± 0,6	17,6 ± 0,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	14,3 ± 0,7	12,6 ± 0,6	15,2 ± 0,8
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	13,2 ± 0,7	15,2 ± 0,5	17,3 ± 0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	-	21,3 ± 0,6	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	-	13,5 ± 0,7	-
<i>Escherichia coli</i> 25922	12,8 ± 0,3	22,9 ± 0,4	11,4 ± 0,8
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	25,8 ± 0,6	25,3 ± 0,4	22,5 ± 0,6
<i>Proteus hauseri</i> 13315	15,8 ± 0,2	25,6 ± 0,4	24,8 ± 0,7
<i>Shigella sonnei</i> 29930	13,8 ± 0,2	16,6 ± 0,1	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	26,5 ± 0,4	30,9 ± 0,4	26,8 ± 0,8
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	32,7 ± 0,4	21,8 ± 0,6	33,7 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	14,2 ± 0,5	14,9 ± 0,5	13,2 ± 0,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	14,2 ± 0,7	17,2 ± 0,8	16,7 ± 0,1
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

<sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

**Tabela 4.14f.** Antibiogram<sup>a</sup> testiranih bakterijskih i sojeva kvasaca na neomicin i bifonazol; prečnik zone inhibicije (mm)

Mikroorganizam	Neomicin (30 µg/disk)	Bifonazol (30 µg/disk)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	15,2 ± 0,4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	18,7 ± 0,6	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	12,5 ± 0,4	-
<i>Bacillus cereus</i> 10876	13,8 ± 0,2	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	16,8 ± 0,6	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	14,5 ± 0,4	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	12,6 ± 0,8	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	-	-
<i>Escherichia coli</i> 25922	20,3 ± 0,7	-
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	24,5 ± 0,8	-
<i>Proteus hauseri</i> 13315	23,7 ± 0,4	-
<i>Shigella sonnei</i> 29930	14,7 ± 0,2	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	27,8 ± 0,2	-
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 12900	20,5 ± 0,9	-
<i>Escherichia coli</i> (0157:H7) 35150	13,7 ± 0,8	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	14,8 ± 0,5	-
<i>Candida albicans</i> 24443	-	28,9 ± 0,9
<i>Candida albicans</i> 10259	-	33,9 ± 0,6
<i>Candida albicans</i> 10231	-	31,7 ± 0,4
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	27,6 ± 0,4

Svi testovi su urađeni u tri nezavisna ponavljanja za svaki mikroorganizam i antibiotik

<sup>a</sup>Podaci predstavljaju srednje vrednosti ± standardne devijacije (n=3)

#### 4.4.2. MINIMALNE INHIBITORNE KONCENTRACIJE (MIC)

MIC vrednosti (mg/mL) polisaharidnih ekstrakata prikazane su u tabelama 4.15a-c.

MIC vrednosti za polisaharidne ekstrakte nalazile su se u opsegu od 1,25 do 10 mg/mL. U malim zonama inhibicije (ispod 10 mm), MIC vrednosti su označene sa > 10 mg/mL, jer je povećanje početne koncentracije ekstrakta neophodno (između 10-20 mg/mL), kako bi se precizno odredile MIC vrednosti.

**Tabela 4.15a.** MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *G. lucidum*, *G. applanatum* i spora *G. lucidum*

Mikroorganizam	MIC <sup>a</sup> (mg/mL)		
	<i>G. lucidum</i>	spore <i>G. lucidum</i>	<i>G. applanatum</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	2,5	5	2,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	2,5	5	2,5
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	1,25	2,5	1,25
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	1,25	2,5	1,25
<i>Bacillus cereus</i> 10876	2,5	2,5	5
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	2,5	2,5	5
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	5	10	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	5	10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	5	10	10
<i>Escherichia coli</i> 25922	10	10	>10
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	10	10	10
<i>Proteus hauseri</i> 13315	5	5	10
<i>Shigella sonnei</i> 29930	10	10	10
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	10	10	10
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	5	5	-
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	5	10	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	5	10	5
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

**Tabela 4.15b.** MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *L. edodes*, *T. versicolor* i *A. brasiliensis*

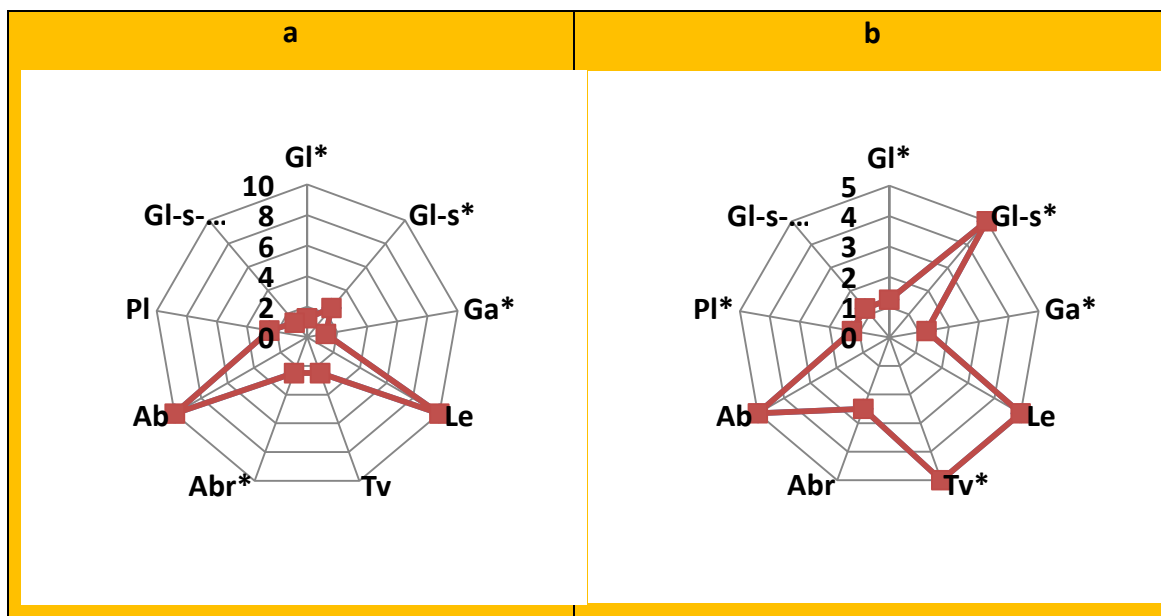
Mikroorganizam	MIC <sup>a</sup> (mg/mL)		
	<i>L. edodes</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	10	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	10	5	-
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	5	2,5	2,5
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	5	2,5	2,5
<i>Bacillus cereus</i> 10876	5	2,5	5
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	5	2,5	5
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	10	10	10
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	-	>10	>10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	10	>10	>10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	10	10	10
<i>Escherichia coli</i> 25922	10	10	10
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	>10	10	>10
<i>Proteus hauseri</i> 13315	>10	10	10
<i>Shigella sonnei</i> 29930	-	10	>10
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	-	10	>10
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	10	5	5
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	5	5	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	10	5	10
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-



**Tabela 4.15c.** MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata dobijenih iz plodonosnih tela gljiva *A. bisporus*, *P. linteus* i komercijalnog ekstrakta spora *G. lucidum*

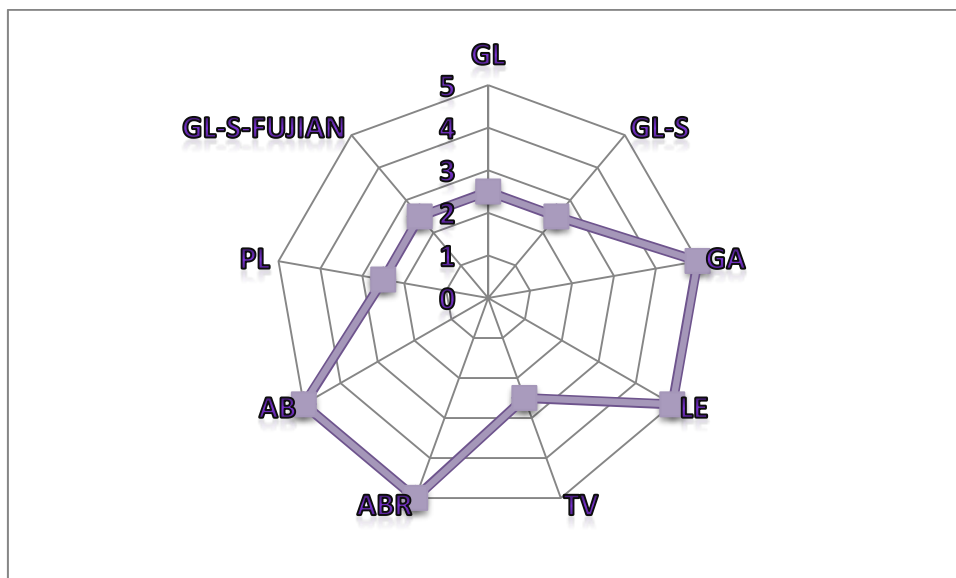
Mikroorganizam	MIC <sup>a</sup> (mg/mL)		
	<i>A. bisporus</i>	<i>P. linteus</i>	spore <i>G. lucidum</i> (kom.)
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	-	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> 6538	-	10	10
<i>Enterococcus faecalis</i> 29212	10	2,5	1,25
<i>Enterococcus faecalis</i> 49532	5	1,25	1,25
<i>Bacillus cereus</i> 10876	5	5	2,5
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> 7953	10	10	2,5
<i>Listeria monocytogenes</i> 19115	>10	10	10
<i>Listeria monocytogenes</i> 19112	>10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	>10	10	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 35032	10	10	5
<i>Escherichia coli</i> 25922	>10	>10	>10
<i>Salmonella enteritidis</i> 13076	>10	>10	10
<i>Proteus hauseri</i> 13315	10	10	10
<i>Shigella sonnei</i> 29930	>10	>10	10
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729	>10	>10	10
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 12900	>10	-	10
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7) 35150	10	-	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 27736	10	10	5
<i>Candida albicans</i> 24443	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10259	-	-	-
<i>Candida albicans</i> 10231	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i> 76484	-	-	-

Kod bakterije *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. faecalis* ATCC 49532, MIC vrednosti su bile 1,25 mg/mL za ekstrakte plodonosnih tela gljiva *G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus* i spora *G. lucidum* dobijenih u laboratoriji i komercijalno proizvedenih. MIC vrednosti od 2,5 mg/mL dobijene su za ekstrakte gljiva *T. versicolor* i *A. brasiliensis*. Za ekstrakt gljive *L. edodes* dobijena je vrednost od 5 mg/mL, za *A. bisporus* 10 mg/mL. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su i ekstrakti sa većim udelom fenolnih jedinjenja u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida, od 5,8-20,4% (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus*, komercijalni ekstrakt spora *G. lucidum*) bili efikasni kao i ekstrakti u kojima je udeo fenolnih komponenti bio manji ili vrlo mali, od 0,4-2,6 % (*T. versicolor*, *A. brasiliensis* i laboratorijski ekstrakt iz spora *G. lucidum*), slika 4.33. Ekstrakti sa veoma malim udelom fenolnih komponenti i proteina u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida (*A. bisporus* i laboratorijski ekstrakt spora iz *G. lucidum*) razlikovali su se značajno po svojim MIC vrednostima, što ukazuje da struktura polisaharidnih komponenata ima uticaj na antimikrobna svojstva, slike 4.31, 4.32 i 4.33.

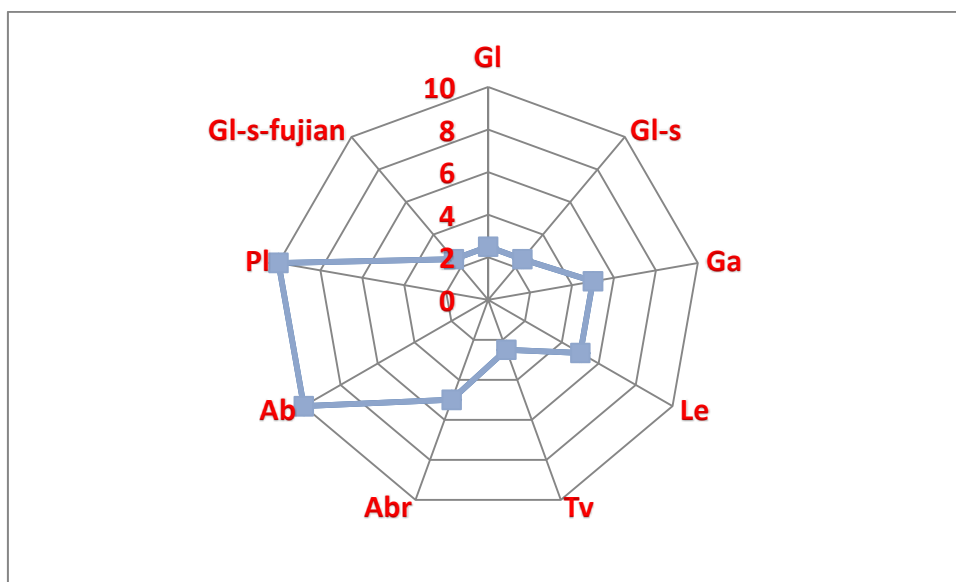


\*ekstrakt je delovao mikrobicidno

Slika 4.31. MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata u odnosu na bakterije *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (a) i *Enterococcus faecalis* ATCC 49532 (b)



Slika 4.32. MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata u odnosu na bakteriju *Bacillus cereus* ATTC 10876



Slika 4.33. MIC vrednosti polisaharidnih ekstrakata u odnosu na bakteriju *Geobacillus stearothermophilus* ATTC 7953

Polisaharid iz aktinomicete *Streptomyces virginia* H03 ispoljio je visoku antimikrobnu aktivnost u odnosu na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Zygosaccharomyces bailii* i *Candida utilis*, koji su veoma česti uzročnici kvarenja hrane i trovanja hranom (He et al., 2010). MIC vrednosti za pomenuti polisaharid u odnosu na testirane mikroorganizme bile su od 15,6 do 125 µg/mL. Elektronskom mikroskopijom je potvrđeno da antimikrobno dejstvo polisaharida može biti usmereno ka ćelijskom zidu bakterija, citoplazmatičnoj membrani (promenom permeabilnosti citoplazmatične membrane), oslobađanju enzima u ekstracelularni prostor i oštećenju dezoksiribonukleinske kiseline (DNA) (He et al., 2010).

Razlika u efikasnosti mikrobicidnog dejstva hitozana proizilazi iz različitih faktora: soja i starosti mikroorganizma; strukturnih karakteristika hitozana, u koje spada i stepen zastupljenosti pozitivnog naelektrisanja, molekulska masa, koncentracija ovog polisaharida, hidrofилnih/hidrofobnih karakteristika i sposobnosti heliranja; fizičkog stanja hitozana (da li je u obliku rastvora ili je u čvrstom stanju); faktora sredine: pH, temperature, jonske jačine (Kong et al., 2010).

Ameri et al., (2011) su potvrdili niske MIC vrednosti (0,390-6,25 mg/mL) etil-acetatnih ekstrakata gljiva *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma praelongum* i *Ganoderma resinaceum* u odnosu na meticilin rezistentan i meticilin senzitivan soj *Staphylococcus aureus* (MSSA). Polisaharidne frakcije ovih gljiva ispoljile su nisku antimikrobnu aktivnost na testirane mikroorganizme.

MIC vrednosti ispitivanih polisaharidnih ekstrakata, tabele 4.15.a-c, u odnosu na bakterije *Bacillus cereus* ATTC 10876 i *Geobacillus stearothermophilus* ATTC 7953 nalazile su se u opsegu od 2,5 do 10 mg/mL, slike 4.32. i 4.33. Ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *G. applanatum* su ispoljili MIC vrednosti od 2,5 mg/mL u odnosu na *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 i *Staphylococcus aureus* ATTC 6538.

Antimikrobna dejstva ispitivanih polisaharidnih ekstrakata se ispoljavaju i nakon termičkog tretmana (121 °C, 40 minuta), kojima su izloženi u toku postupka izolovanja.

## 5. ZAKLJUČCI

Na osnovu svih izloženih i diskutovanih rezultata u ovoj doktorskoj disertaciji, a u saglasnosti sa ranijim radovima i literaturnim podacima mogu se izvesti sledeći zaključci:

### ➤ Karakterizacija polisaharidnih ekstrakata

1. U radu je okarakterisano 9 polisaharidnih ekstrakata izolovanih iz spora i plodonosnih tela 7 odabranih vrsta gljiva iz klase *Basidiomycetes*. Polisaharidni ekstrakti dobijeni su iz plodonosnih tela sledećih komercijalno uzgajanih gljiva: *Agaricus bisporus* Horst U1, Mushroom Experimental Station, Horst, Holandija, *Agaricus brasiliensis*, Mushroom Experimental Station Horst, Holandija, *Ganoderma lucidum*, Jiangsu Alphay Bio-Tech, Co. Ltd., Kina, *Lentinula edodes*, Jiangsu Alphay Bio-Tech, Co. Ltd., Kina. Pored navedenih, izolovani su ekstrakti iz plodonosnih tela autohtonih gljiva: *Ganoderma applanatum*, prirodni rezervat "Obedska Bara", jugoistočni Srem, Srbija, *Trametes versicolor*, Košutnjak, Beograd, Srbija, *Phellinus linteus*, Amazing Grace Health Industries, Bangkok, Tajland. Ispitan je i polisaharidni ekstrakt izolovan iz spora komercijalno uzgajanih gljiva *Ganoderma lucidum*, Jiangsu Alphay Bio-Tech, Co. Ltd., Kina, kao i polisaharidni ekstrakt koji je komercijalno proizveden iz spora uzgajane gljive *Ganoderma lucidum*, Grade A, Fujian Xianzhilou Biological Sciences and Technology Co. Ltd., Kina.

2. Primenjena su dva postupka izolovanja polisaharidnih ekstrakata gljiva: vrela vodena ekstrakcija (121 °C, 40 minuta) i precipitacija etanolom; vrela vodena ekstrakcija (121 °C, 40 minuta), dijaliza (MWCO 8000-10000 Da) i precipitacija etanolom.

3. Na prinose ekstrakata značajno je uticao primenjeni postupak njihovog prečišćavanja. Kod vrelih vodenih ekstrakata prečišćenih dijalizom i alkoholnom precipitacijom, uklonjen je deo molekula sa molekulskim masama manjim od 8-10

kDa, što je značajno uticalo na redukciju prinosa (kod *T. versicolor* 52,2%, *L. edodes* 52,5%, *G. lucidum* 68,8%, *G. applanatum* 88,2% i ekstrakta spora *G. lucidum* 87,7%).

4. Primenom uobičajenih analitičkih postupaka: planarne hromatografije (PC, TLC), tečne hromatografije-masene spektrometrije (HPLC-MS), kao i nuklearne magnetne rezonance ( $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -NMR), utvrđeno je da svi polisaharidni ekstrakti sadrže D-glukozu kao preovlađujuću monosaharidnu komponentu. U većini ekstrakata je, u manjoj ili većoj koncentraciji, utvrđeno prisustvo D-galaktoze, D-manoze i L-fukoze/D-ksiloze, kao i alifatičnih jedinjenja i aromatičnih komponenti u tragovima. U ekstraktima gljiva *A. brasiliensis* i *P. linteus* u tragovima su prisutni L-ramnoza, L-arabinoza, D-fruktoza i D-glukozamin (~1% od svakog monosaharida). Utvrđeno je da polisaharidi ekstrakta gljive *G. applanatum* sadrže D-uronske kiseline.

5. Termičkim tretmanom (121 °C, 40 minuta) nije postignuta potpuna deproteinizacija polisaharidnih ekstrakata. Ukupan sadržaj proteina, određen spektrofotometrijski, u polisaharidnim ekstraktima iznosio je od 0,9 do 7,3 g/100g suve mase.

6. Ukupan sadržaj fenola u polisaharidnim ekstraktima bio je od 0,3 do 8,4 g/100g suve mase. Fenolna jedinjenja su prisutna u polisaharidnim ekstraktima u oba primenjena postupka ekstrakcije; ekstrakcija vrelom vodom i alkoholna precipitacija kao ni dodatna dijaliza ekstrakata (MWCO 8000-10000 Da) i potom alkoholna precipitacija nisu se pokazali kao dovoljno efikasni za uklanjanje fenolnih komponenti.

7. Utvrđeno je da dobijeni ekstrakti predstavljaju smešu/komplekse polisaharida, proteina i fenola, na osnovu rezultata dobijenih primenom navedenih analitičkih postupaka.

8. Ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima, određen spektrofotometrijski, nalazio se u opsegu od 27,6 do 83,9 g/100g suve mase, što je posledica različite građe ćelijskog zida gljiva, starosti ćelija, strukturne organizacije hifa u plodonosnim telima "mekih gljiva" *Agaricus* spp. i *Lentinula edodes*, morfologije spora i dodatnog prečišćavanja ekstrakata.

9. Ukupan sadržaj glukana u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida u ekstraktima, određen setom enzimskih metoda za kvantitativno određivanje  $\alpha$ -,  $\beta$ - glukana i

ukupnih glukana, iznosio je od 35% do 87%. Utvrđeno je da su glukani pretežno povezani  $\beta$ -glikozidnim vezama (57-97%). U komercijalnom ekstraktu spora *G. lucidum* sadržaj  $\alpha$ -glukana u odnosu na ukupan sadržaj glukana iznosio je 94,2%. Sadržaj glikogena, osnovnog rezervnog polisaharida gljiva, u mnogo čemu zavisi od spoljašnjih i nutritivnih uslova u kojima se uzgaja gljiva. Alfa-glukani se, kao intracelularne rezervne materije, lako ekstrahuju, za razliku od  $\beta$ -glukana koji predstavljaju strukturne komponente ćelijskog zida gljiva.

10. Analizom FT-IR spektara čvrstih uzoraka polisaharidnih ekstrakata utvrđeno je prisustvo karakterističnih apsorpcionih traka koje odgovaraju strukturama tipičnim za polisaharide. Pored navedenih, utvrđeno je prisustvo apsorpcionih pikova karakterističnih za proteinske strukture, a dodatno, u ispitivanim spektrima svih polisaharidnih ekstrakata utvrđeno je prisustvo apsorpcionih traka koje odgovaraju frekvencama karakterističnim za aromatične strukture, alifatične grupe i fenole, što sve ukazuje na prisustvo aromatičnih jedinjenja koja potiču od pigmenta. FT-IR spektar polisaharidnog ekstrakta gljive *G. applanatum* pokazao je apsorpcione trake u oblasti karakterističnoj za uronske kiseline koje ukazuju na prisustvo slobodnih ili esterifikovanih C=O grupa kao strukturnih komponenti jednog (ili više) polisaharida koji se nalaze u ispitivanom ekstraktu. *G. applanatum*, *G. lucidum*, *T. versicolor* pripadaju lignikolnim gljivama, što indicira prisustvo enzimskih sistema koji učestvuju u procesima degradacije lignina. *Cis*-ferulinska kiselana je žuto obojena supstanca koja u FT-IR spektrima ima traku koja je indikativna za aromatične C=C grupe koje su konjugovane sa C=O i/ili COO<sup>-</sup> grupama.

11. Rezultati dobijeni elementarnom analizom ukazuju, pored proteinskog, takođe i na prisustvo azota neproteinske prirode u ekstraktima.

12. Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) utvrđena je različita površinska morfologija polisaharidnih ekstrakata. Različita morfologija uslovljena je različitom strukturom polisaharida, prisustvom proteina i fenola, kao i interakcijama polisaharida sa proteinima i fenolima u ispitivanim ekstraktima.

Na osnovu rezultata koji su dobijeni proučavanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata zaključeno je sledeće:

Ispitana su antioksidativna svojstva dobijenih polisaharidnih ekstrakata. Utvrđeno je da se antioksidativna aktivnost ekstrakata ispoljava u značajnom stepenu i posle termičkog tretmana (121 °C), kom su ispitivane bazidiomicete bile izložene tokom postupka izolovanja ekstrakata. Antioksidativne aktivnosti zavise od sadržaja polisaharida, fenola i proteina u polisaharidnim ekstraktima.

Za merenje antioksidativnih osobina u *in vitro* uslovima korišćene su različite metode koje odgovaraju različitim nivoima antioksidativne aktivnosti. Poređene su sposobnost hvatanja slobodnih 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikala, inhibicija lipidne peroksidacije i sposobnost redukcije jona gvožđa ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Takođe, praćena je sposobnost heliranja jona gvožđa ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

➤ **Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala:**

1. Utvrđeno je da je sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala polisaharidnih ekstrakata dobijenih vrelom vodenom ekstrakcijom i alkoholnom precipitacijom i ekstrakata koji su nakon toga bili dijalizovani i dodatno precipitirani alkoholom, bila uporediva.
2. Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za ekstrakte gljiva *P. linteus*, *G. applanatum*, *L. edodes* i komercijalni ekstrakt spora *G. lucidum* bile su poredive sa  $\text{EC}_{50}$  vrednostima  $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline,  $\text{EC}_{50} < 0,1$  mg/mL.
3. Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za ekstrakte gljiva *A. brasiliensis*, *T. versicolor* i *G. lucidum* bile su od 43-120 puta manje od vrednosti  $\text{EC}_{50}$  za BHT, 11,86 mg/mL.
4. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja, sadržaj i konformacija polisaharida pokazali su se kao izuzetno važni faktori u sposobnosti hvatanja DPPH radikala. Ekstrakti gljive *A. bisporus* i spora *G. lucidum* (laboratorijski ekstrakt) sa najmanjim sadržajem fenola i proteina u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida i najvišim sadržajem glukana u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida imali su najviše  $\text{EC}_{50}$  vrednosti: 2,00 i 3,99 mg/mL.  $\text{EC}_{50}$  vrednosti skroba i amilopektina bile su  $> 20$  mg/mL.  $\text{EC}_{50}$  galne kiseline bila je  $< 0,1$  mg/mL.



➤ **Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida:**

1. Sposobnost inhibicije peroksidacije lipida u model sistemu linoleinske kiseline se povećavala sa povećanjem koncentracija ekstrakata i zavisila je od strukture polisaharidnih molekula kao i od sadržaja fenolnih komponenti.  $EC_{50}$  vrednosti polisaharidnih ekstrakata nalazile su se u opsegu od 2,07 do 13,25 mg/mL.  $\alpha$ -tokoferol je pokazao visoku sposobnost inhibicije ( $EC_{50} < 0.1$  mg/mL). Vrednost  $EC_{50}$  za askorbinsku kiselinu bila je 1,64 mg/mL, za galnu kiselinu 5,83 mg/mL. Amilopektin nije ispoljio sposobnost inhibicije. Inhibitorna aktivnost laboratorijski dobijenog ekstrakta spora *G. lucidum* nije prelazila 9% pri koncentraciji od 20 mg/mL. Inhibitorna aktivnost skroba bila je 6,5 % pri istoj koncentraciji ( $EC_{50} > 20$  mg/mL).

➤ **Sposobnost redukcije:**

1. Utvrđeno je da je visoka sposobnost redukcije ( $Fe^{3+}$ ) jona polisaharidnih ekstrakata uslovljena prisustvom nepolisaharidnih komponenti.

2. Kod nedijalizovanih polisaharidnih ekstrakata potvrđena je pozitivna korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za moć redukcije i ukupnog sadržaja glukana ( $r = 0,963$ ),  $\beta$ -glukana ( $r = 0,924$ ) i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,691$ ). Negativna korelacija utvrđena je između  $EC_{50}$  vrednosti i ukupnog sadržaja proteina ( $r = -0,635$ ) i ukupnog sadržaja fenola ( $r = -0,744$ ). Sa povećanjem ukupnog sadržaja fenola i proteina u ekstraktima,  $EC_{50}$  vrednosti se smanjuju, a reduktivna moć se povećava. Povećanjem ukupnog sadržaja glukana i polisaharida  $EC_{50}$  vrednosti se povećavaju, a reduktivna moć se smanjuje. Reduktivna sposobnost amilopektina bila je 0,1 na 20,0 mg/mL ( $EC_{50} > 20$  mg/mL). Skrob nije pokazao reduktivnu sposobnost.

3. Kod ekstrakata koji su dodatno prečišćeni dijalizom i alkoholnom precipitacijom korelacija između  $EC_{50}$  vrednosti za sposobnost redukcije i ukupnog sadržaja fenola bila je veoma visoka ( $r = -0,909$ ), kao i korelacija između  $EC_{50}$  i ukupnog sadržaja  $\alpha$ -glukana ( $r = -0,966$ ). Visoka pozitivna korelacija bila je između  $EC_{50}$  i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,718$ ) i ukupnog sadržaja proteina ( $r = 0,776$ ). Ekstrakt gljive *G. applanatum*, sa najvišim sadržajem fenola i  $\alpha$ -glukana, ispoljio je najveću moć redukcije (najniža  $EC_{50}$ ).  $EC_{50}$  vrednosti su se smanjivale sa povećanjem ukupnog sadržaja fenola i  $\alpha$ -glukana što ukazuje na moguće komplekse fenola i  $\alpha$ -glukana u polisaharidnim ekstraktima gljiva. FT-IR analizom polisaharidnog ekstrakta gljive

*G. applanatum* potvrđeno je prisustvo slobodnih/esterifikovanih C=O grupa uronskih kiselina kao strukturnih komponenti jednog (ili više) polisaharida koji se nalaze u ispitivanom ekstraktu.

➤ **Sposobnost heliranja jona gvožđa:**

1. Sadržaj polisaharida, fenola i proteina u polisaharidnim ekstraktima uticao je na sposobnost heliranja jona ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Kod nedijalizovanih polisaharidnih ekstrakata korelacija između ukupnog sadržaja fenola i  $\text{EC}_{50}$  vrednosti za sposobnost heliranja bila je visoka i negativna ( $r = -0,733$ ). Umerena negativna korelacija postojala je između  $\text{EC}_{50}$  i sadržaja ukupnih proteina ( $r = -0,606$ ). Moguće je da ostaci tirozinaza u ispitivanim ekstraktima katalizuju oksidaciju  $\text{Fe}^{2+}$ , čime utiču na malo povećanje sposobnosti heliranja. Korelacija između  $\text{EC}_{50}$  vrednosti za sposobnost heliranja i ukupnog sadržaja glukana bila je veoma visoka ( $r = 0,967$ ),  $\beta$ -glukana ( $r = 0,939$ ) i ukupnog sadržaja polisaharida ( $r = 0,725$ ). Komercijalni ekstrakt spora *G. lucidum*, sa najmanjim sadržajem polisaharida, glukana i  $\beta$ -glukana, najvećim procentom fenola u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida ispoljio je najveću sposobnost heliranja, (najniža  $\text{EC}_{50}$ ). Ekstrakt gljive *A. bisporus* sa najvećim sadržajem ukupnih polisaharida, glukana,  $\beta$ -glukana i najmanjim sadržajem fenola pokazao je najmanju sposobnost heliranja gvožđa, najveću  $\text{EC}_{50}$  vrednost.

2. Od ekstrakata dodatno prečišćenih dijalizom i alkoholnom precipitacijom najvišu sposobnost heliranja jona  $\text{Fe}^{2+}$  imao je ekstrakt gljive *G. applanatum*, sa najvišim sadržajem fenola i najnižom  $\text{EC}_{50}$  vrednošću. Uronske kiseline su prisutne samo u polisaharidima gljive *G. applanatum*.

3. Ukupan sadržaj proteina u ekstraktima gljiva *G. applanatum* i *T. versicolor* se nije značajno razlikovao,  $p \leq 0,05$ . Vrednost  $\text{EC}_{50}$  za sposobnost heliranja ovih ekstrakata su se značajno razlikovale, 3,58 i  $> 20$  mg/mL.

4. Svi ispitivani polisaharidni ekstrakti bili su efektivniji helatori jona gvožđa u odnosu na limunsku kiselinu, čija sposobnost nije prelazila 10% u ispitivanom opsegu koncentracija (0,1-20 mg/mL).

### ➤ Antimikrobna aktivnost

1. Ispitivanjem antimikrobnih svojstava polisaharidnih ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vrelom vodom kao i ekstrakata prečišćenih dijalizom utvrđeno je da su ispitivane Gram-pozitivne vrste bakterija uglavnom bile osjetljivije na prisustvo ekstrakata od ispitivanih Gram-negativnih vrsta bakterija. Pored toga, nijedan od ekstrakata u ispitivanoj koncentraciji nije imao uticaja na rast ispitanih kvasaca.

2. Najveću osjetljivost su pokazali bakterijski sojevi *E. faecalis* ATCC 29212 i *E. faecalis* ATCC 49532, kod kojih su se najveće zone inhibicije javile u prisustvu svih polisaharidnih ekstrakata (24,8-46,8 mm). Na ove sojeve uočeno je mikrobicidno dejstvo. MIC za ekstrakte plodonosnih tela gljiva *G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus*, *T. versicolor*, *A. brasiliensis* i spora *G. lucidum*, dobijenih u laboratoriji i komercijalno proizvedenih, bile su od 1,25-2,5 mg/mL. Antimikrobno dejstvo ekstrakata sa većim sadržajem fenolnih jedinjenja u odnosu na ukupan sadržaj polisaharida, od 5,8-20,4 % (*G. lucidum*, *G. applanatum*, *P. linteus*, komercijalni ekstrakt spora *G. lucidum*) moglo je da se uporedi sa dejstvom ekstrakata sa manjim sadržajem (od 0,4-2,6 %) fenolnih komponenti (*T. versicolor*, *A. brasiliensi* i laboratorijski ekstrakt spora *G. lucidum*).

3. Dejstvo ekstrakata na ostale Gram-pozitivne bakterije bilo je mikrobiostatsko. MIC vrednosti ekstrakata za *Bacillus cereus* ATTC 10876 i *Geobacillus stearothermophilus* ATTC 7953 bile su u opsegu od 2,5 do 5 mg/mL. Ekstrakti gljiva *G. lucidum* i *G. applanatum* su ispoljili MIC vrednosti od 2,5 mg/mL u odnosu na *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 i *Staphylococcus aureus* ATTC 6538.

4. Termički tretman ne utiče na antimikrobna dejstva ekstrakata. Mikroorganizmi izazivaju različita oboljenja, utiču na kvarenje prehrambenih, kozmetičkih i farmaceutskih proizvoda čijom upotrebom može doći do intoksikacije. Korišćenje gljiva i njihovih ekstrakata kao prirodnih izvora antimikrobnih agenasa otvara mogućnosti za dalja istraživanja, tim pre što se njihovom upotrebom ne izazivaju štetni efekti.

## 6. LITERATURA

1. Abraham, W.R., 2001. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for human as well? *Current Medicinal Chemistry* 8, 583-606.
2. Acharya, K., Yonzon, P., Rai, M., Rupa, A., 2005. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Ganoderma applanatum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 926-9.
3. Adesegun, S. A., Fajana, A., Orabueze, C. I., Coker, H. A. B., 2009. Evaluation of antioxidant properties of *Phaulopsis fascisepala* C.B.Cl. (Acanthaceae). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 6, 227-231.
4. Agarwal, U. P., Atalla, R. H., 1990. Formation and identification of cis/trans ferulic acid in photoyellowed white spruce mechanical pulp. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 10, 169-190.
5. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 7915-7922.
6. Anke T., Kupka, J., Schramm, G., Steglich, W., 1980. Antibiotics from basidiomycetes. X. Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorononius* (Fr.) Fr. *The Journal of Antibiotics* 33, 463-467.
7. Anke T., Watson, W.H., Giannetti, B.M., Steglich, W., 1981. Antibiotics from Basidiomycetes. XII. The alliacols A and B from *Marasmius alliaceus* (Jacq. Ex Fr.). *The Journal of Antibiotics* 34, 1271-1277.
8. Bailey, R.W. & Bourne, E.J., 1960. Color reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. *Journal of Chromatography* 4, 206-213.
9. Becker, G.L., 1993. Preserving food and health: antioxidants make functional, nutritious preservatives. *Food Processing* 12, 54-56.

10. Beelman, R.B., Royse, D., Chikthmah, N., 2003. Bioactive components in *Agaricus bisporus* (J.LGE) imbach of nutr itional, medicinal or biological importance. *International Journal of Medicinal Mushroom* 5, 1–18.
11. Bilos, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Science* 181, 1199–1200.
12. Blum, T. L. & Sarco, A., 1977. The triple helical structure of lentinan, a  $\beta$ -(1-3)-D-glucan, *Canadian journal of Chemistry* 55, 293-299.
13. Bohn, J. A. & Be Miller, J. N., 1995. (1-3)- $\beta$ -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydrate Polymers* 28, 3-14.
14. Boldizsar, I., Horvath, K., Szedlay, G. & Molnar-Perl, I., 1998., Simultaneous GC-MS quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of immunostimulans, water soluble polysaccharides of *Basidiomycetes*. *Chromatographia (Germany)* 47, 413-419.
15. Bocco, A., Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C., 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2123-2129.
16. Bradford, M. M., 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-255.
17. Brekhman, I.I., 1980. *Man and biologically active substances*. Pergamon Press, New York
18. Brizuela, M.A., Garciam, L., Mansur, M., 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolites secundarios. *Revista Iberoamericana de Micología* 15, 69-74.
19. Budhiyanti, S. A., Raharjo, S., Marseno, D. W., Lelana, I. Y. B., 2011. Free radical scavenging, metal chelating and singlet oxygen quenching activity of fractionated brown seaweed *Sargassum hystrix* extract. *Journal of Biological Science* 11, 288-298.
20. Carey, P. R., 1992. *Biochemical application of Raman and resonance Raman spectroscopies*. New York: Academic Press.

21. Chan, G.C.F., Chan, W.K.C., Sze, D.M.Y., 2009. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology* 2, 25.
22. Chen, T., Li, K., Chen, C., 1998. The Microstruture of sporoderm between *Ganoderma Lucidum* and *Zizhi Basidiopore*[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences* 13, 33-38.
23. Chen, Y., Xie, M.Y., Nie, S.P., Li, C., Wang, Y.X., 2008. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. *Food Chemistry* 107, 231–241
24. Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., 2003. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry* 81, 249–55.
25. Chihara, G., 1981. The antitumor polysaccharide Lentinan: an overview. In: Aoki, T. et al., (eds). *Manipulation of host defence mechanisms*. Excerpta Med, Int Congr Ser 576, Elsevier, Amsterdam.
26. Chicara, G., 1992. Immunopharmacology of lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: its application as a host defense potentiator. *International Journal of Oriental medicine* 17, 55-77.
27. De la Fuente, M., 2002. Effects of antioxidants on immune system ageing. *European Journal of Clinical Nutrition* 56, S5–S8.
28. Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 315, 161–169.
29. Dong, Q., Fang, J. N., 2001. Characterization of polysaccharides from the roots of *Sophora subprostrata*. *The Chinese Pharmaceutical Journal* 36, 85-87.
30. Dong, Q., Yao, J., Yang, X.T., Fang, J.N., 2002. Structural characterization of water-soluble  $\beta$ -D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. *Carbohydrate Research* 337, 1417-1421.
31. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Reders, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry* 28, 350-356.

32. Đukić, M., 2008. Oksidativni stres: slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Mono i Manjana, Beograd, Srbija.
33. Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., 2009. Antioxidant activities of methanol extract of *Sambucus ebulus* L. Flower. Pakistan Journal of Biological Sciences 12, 447-450.
34. Eisenman, H.C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., Casadevall, A., 2007. *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA. Microbiology 153, 3954-3962.
35. Ekanayake, P.M., Park, G., Lee, Y.D., Kim, S.J., Jeong, S.C., Lee, J., 2005. Antioxidant potential of Eel (*Anguilla Japonica* and *Conger Myriaster*) flesh and skin. Journal of Food Lipids 12, 34-47.
36. Elmastas, M., Isildak, O., Turkecul, I., Temur, N., 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis 20, 337-345.
37. Eo, S.K., Kim, Y.S., Lee, C.K., Han, S.S., 1999a. Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum*. Journal of Ethnopharmacology 68, 129–136.
38. Eo, S.K., Kim, Y.S., Lee, C.K., Han, S.S., 1999. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum*. Journal of Ethnopharmacology 68, 175–181.
39. Fenoll, L., G., Rodriguez-Lopez, J., N., Varon, R., Garcia-Ruiz, P., A., Garcia-Canovas, F. & Tudela, J., 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. The Journal of Biological Chemistry 381, 313-320.
40. Fenoll, L., G., Rodriguez-Lopez, J., N., Garcia-Sevilla, F., Tudela, J., Garcia-Ruiz, P., A., Varon, R., Garcia-Canovas, F., 2000a. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. European Journal of Biochemistry, 267, 5865-5878.
41. Finley, J. W., Kong, A. N., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L. L., Lei, X. G., 2011. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. Journal of Agricultural and Food chemistry 59, 6837-6846.

42. Fu, H., Shieh, D., Ho, C., 2002. Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids* 9, 35–46.
43. Fry, S.C., 1982. Phenolic components of the primary cell wall. Feruloylated disaccharides of D-galactose and L-arabinose from spinach polysaccharide. *Biochemistry* 203,4493-44504.
44. Fry, S.C., 2004. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews* 3, 97-111.
45. Fujihara, S., Kasuga, A., Aoyagi, Y., Sugahara, T., 1995. Nitrogen-to-protein conversion factors for some common edible mushrooms. *Journal of Food Science* 60, 1045-1047.
46. Funami, T., Funami, M., Yada, H., Nakao, Y., 1999. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. *Journal of Food Science* 64, 129-132.
47. Gao, Y.H., Tang, W.B., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X.T., et al., 2005. Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International*, 21(2), 211–229.
48. Gao, Q. P., Jiang, R. Z., Chen, H. Q., Jersen, E., Seljelid, R., 1996. Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. *Planta Medica* 62, 297-302.
49. Goldfarb, A.H., 1999. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal of Applied Physiology* 24, 249-266.
50. Griffin, D.H., 1994. *Fungal Physiology*, 2<sup>nd</sup> edition. Wiley-Liss, Inc.
51. Gordon, M.H., 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro. In *Food Antioxidants*; Hudson, B.J.F., Ed.; Elsevier Applied Science, 1-18.
52. Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E., Kufrevioglu, O.I., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 83, 371-382.
53. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219-224.



54. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology* 186, 1–85.
55. Harki, E., Talou, T., Dargen, R., 1997. Purification, characterisation and analysis of melanin extracted from *Tuber mehnosporum* Vitt. *Food Chemistry* 58, 69-73.
56. He, F., Yang, Y., Yang, G., Yu, L., 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* HO3. *Food Control*, 21, 1257-1262.
57. Hirasawa, M., Shouji, N., Neta, T., Fukushima, K., Takada, K., 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents* 11, 151–157.
58. Hiroshi, S., Takeda, M., 1993. Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor* (Fr.) Quél. In: Chang, S.T., Buswell, J.A., Chiu, S.W. (eds) *Mushroom biology and mushroom products*. The Chinese University Press, Hong Kong, pp 237–245.
59. Hobbs, C., 1986. *Medicinal Mushrooms*, Loveland Interweave Press.
60. Hobbs, C., 1995. *Medicinal mushrooms*, Botanica press, 10226, Empire Grade, Santa Cruz, CA, 95060
61. <http://www.fungiperfecti.com>; © Paul Stamets, 2005. *Cross-Index of Mushrooms and Targeted Therapeutic Effects*, Fungi Perfecti® LLC.
62. [http://media.photobucket.com/image/agaricus%20blazei/janaille0811/GFI/199487\\_1790153085950\\_1603308365\\_31797995\\_3833101\\_n-1.jpg?o=10](http://media.photobucket.com/image/agaricus%20blazei/janaille0811/GFI/199487_1790153085950_1603308365_31797995_3833101_n-1.jpg?o=10). (10.03.2012)
63. [http://www.forestbioproducts.umaine.edu/project\\_enzymes\\_biopulping.php](http://www.forestbioproducts.umaine.edu/project_enzymes_biopulping.php). (23.02.2012)
64. [http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes\\_versicolor\(mgw-02\).jpg](http://www.mykoweb.com/CAF/photos/Trametes_versicolor(mgw-02).jpg) (25.02.2012)
65. [http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes\\_versicolor](http://en.wikipedia.org/wiki/Trametes_versicolor) (25.02.2012)
66. <http://www.pcelica.co.rs/gljive/vrste/basidiomycetes/polyporales/trametes/trametes-versicolor.php> (25.02.2012)
67. <http://www.food-info.net/uk/colour/enzymaticbrowning.htm>. (25.02.2012)
68. [http://www.stevenfoster.com/photography/imageviewsl/lentinus/edodes/le2\\_102710/content/Lentinus\\_edodes\\_28136\\_large.html](http://www.stevenfoster.com/photography/imageviewsl/lentinus/edodes/le2_102710/content/Lentinus_edodes_28136_large.html) (25.02.2012)

69. <http://en.wikipedia.org/wiki/Shiitake> (25.02.2012)
70. [http://www.phellinus-research.com/images/index/clip\\_image001.jpg](http://www.phellinus-research.com/images/index/clip_image001.jpg) (25.02.2012)
71. <http://easycalculation.com/statistics/regression.php>. (15.03.2011)
72. <http://www.bionet-skola.com/w/Gljive> (15.02.2012)
73. Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1841-1856.
74. Huang, K.C., 1993. *The Pharmacology of Chinese Herbs*. Boca Raton, FL: CRC Press.
75. Ikeda, S., Shishido, Y., 2005. Atomic force microscopy studies on heat-induced gelation of curdlan. *Journal and Agricultural and Food Chemistry* 53, 786-791.
76. Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M., Fukuoka, F., 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* 29, 734-735.
77. Ikekawa, T., Ikeda, Y., Yoshioka, Y., Nakanishi, K., Yokoyama, E., Yamazaki, E., 1982. Antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* 2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5. *Journal of Pharmacobiology Dynamics* 5, 576-581.
78. Imlay, J., 2003. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 57, 395-418.
79. Isaka, M., Tantichareon, M., Kongsaree, P., 2001. Structures of Cordypyridones A-D, Antimalarial N-Hydroxy- and N-Methoxy-2-pyridones from the Insect Pathogenic Fungus *Cordyceps nipponica*. *The Journal of Organic Chemistry* 66, 4803-4808.
80. Ismail, A., Marjan, Z. M., Foong, C. W., 2004. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry* 87, 581-586.
81. Ismaya, W. T., Rozeboom, H.J., Weijn, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H. J., Dijkstra, B.W., 2011. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* 50, 5477-5486.
82. ISO 11465, 1993. *Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method*. Geneve.

83. Jacobs, F., 1985. Breakthrough: The True story of Penicillin, New York: Dodd, Mead & Company.
84. Jansson, P.E., Stenutz, R., Widmalm, G., 2006. Sequence determination of oligosaccharides and regular polysaccharides using NMR spectroscopy and a novel Web-based version of the computer program CASPER. Carbohydrate Research 341, 1003-1010.
85. Jeong, Y.T., Yang, B.K., Jeong, S.C., Kim, S.M., Song, C.H., 2008. *Ganoderma applanatum*: a promising mushroom for antitumor and immunomodulating activity. Phytotherapy Research 22 , 614–619.
86. Jong, S.C. & Birmingham, J.M., 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. Advances in Applied Microbiology 37, 101-134.
87. Jong, S. C. & Donovan, R., 1990. Antitumor and antiviral substances from fungi. Advances in Applied Microbiology 34, 183-262.
88. Joo, S.S., Ryu, I.W., Park, J.K., Yoo, Y.M., Lee, D.H., Hwang, K.W., 2008. Molecular cloning and expression of a laccase from *Ganoderma lucidum*, and its antioxidative properties. Molecular Cell 25, 112–8.
89. Jung, S.H., Lee, Y.S., Shim, S.H., Lee, S., Shin, K.H., Kim, J.S., Kim, Y.S., Kang, S.S., 2005. Inhibitory effects of *Ganoderma applanatum* on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. Phytotherapy Research 19, 477-80.
90. Kabir, Y., Kimura, S., Tamura, T., 1988. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR). Journal of Nutritional Science and Vitaminology 34, 433-438.
91. Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S., 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. Applied and Environmental Microbiology 53, 2953-2956.
92. Karaman, Y., Sahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Sengül, M., Adıgüzel, A., 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. Journal of Ethnopharmacology 85, 213–235.

93. Kavanagh, F., Hervey, A., Robbins, W.J., 1950. Antibiotic substances from basidiomycetes. VI. *Agrocybe dura*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 36, 102-106.
94. Kedage, V. V., Tilak, J. C., Dixit, G. B., Devasagayam, T. P. A., Mhatre, M., 2007. A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*Vitis vinifera* L.). Critical Reviews in Food Science and Nutrition 47, 175-185.
95. Ker, Y. B., Chen, K. C., Chyau, C. C., Chen, C. C., Guo, J. H., Hsien, C. L., Wang, H. E., Peng, C. C., Chang, C. H. & Peng, R. P. (2005). Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* Mycelia. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 7052-7058.
96. Khokhar, S., Apenten, R. K. O., 2003. Iron binding characteristics of phenolic compounds: Some tentative structure-activity relations. Food Chemistry 81, 133-140.
97. Kim, K.C. & Kim, I.G., 1999. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation, International Journal of Molecular Medicine 4, 273-277.
98. Kim, S. & Fung, D.Y.C., 2004. Antibacterial effect of water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on foodborne pathogens in ground beef and mushroom soup. Journal of Food Protection 67, 1953-1956.
99. Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. Dictionary of the Fungi. 10<sup>th</sup> ed. Wallingford: CABI., 272.
100. Klaus, A., Kozarski, M., Niksic, M., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Van Griensven, L. J. L. D., 2011. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. LWT-Food Science and Technology 44, 2005-2011.
101. Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J., 2010. Review: Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art. International Journal of Food Microbiology 144, 51-63.
102. Kotra, L.P. & Mobashery, S., 1998.  $\beta$ -lactam antibiotics,  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance. Bulletin de l'Institut Pasteur, 96, 139-150.

103. Kurzman, R. H., Jr., 1997. Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. *Mycoscience* 38, 247-253.
104. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, P. F. G. J., Van Griensven L. J. L. D., 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phelinus linteus*. *Food Chemistry* 129, 1667-1675.
105. Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Vrvic, M.M., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Van Griensven L. J. L. D., 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, In Press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2012.02.004>.
106. Laroche, C. & Michaud, P., 2007. New developments and prospective applications for  $\beta$  (1,3) glucans. *Recent Patents on Biotechnology* 1, 59-73.
107. Lee, Y. T. & Kim, Y. S., 2005. Water solubility of  $\beta$ -glucans in various edible mushrooms. *Journal of Food Science and Nutrition* 10, 294-297.
108. Lee, S.J., Yeo, W.H., Yun, B.S., Yoo, I.D., 1999. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus spp.* *Journal of Peptide Science* 5, 374–378.
109. Lee, S.H., Shim, S.H., Kim J.S., Kang, S.S., 2006. Constituents from the fruiting bodies of *Ganoderma applanatum* and their aldose reductase inhibitory activity. *Archive of Pharmaceutical Research* 29, 479-483.
110. Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D., 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)* 2, 285–299.
111. Lingnert, H., Vallentin, K., Eriksson, C.E., 1979. Measurement of antioxidative effect in model system. *Journal of Food Processing and Preservation* 3, 87–103.
112. Lo, T.C.-T., Chang, C. A., Chiuc, K.-H., Tsayd, P.-K., Jena, J.-F., 2011. Correlation evaluation of antioxidant properties on the monosaccharide

- components and glycosyl linkages of polysaccharide with different measuring methods. *Carbohydrate Polymers* 86, 320-327.
113. Löliger, J., 1991. The use of antioxidants in foods. In *Free radicals and food additives* London: Taylor and Francis, 121–150.
114. Mac Carthy, P., Rice, J. A., 1985. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. In *Humic substances in soil, sediment, and water*, Aiken, G. R., McKnight, G. R., Wershaw, R. L. & P. MacCarthy, P. (Eds.), Wiley-Interscience, New York, NY, USA, pp. 527–560.
115. Maeda, Y.Y., Watanabe, S.T., Chihara, C., Rokutanda, M., 1988. Denaturation and renaturation of a  $\beta$ -1,6; 1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses. *Cancer Research* 48, 671-675.
116. Maillard, M. N., & Berset, C., 1995. Evolution of antioxidant activity during kilning, role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1789-1793.
117. Maillard, M. N., Soum, M.-H., Boivin, P., Berset, C., 1996. Antioxidant activity of barley and malt, relationship with phenolic content. *LWT-Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 29, 238-244.
118. Manzi, P. & Pizzoferrato, L., 2000. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry* 68, 315-318.
119. Marieta, C., & Dueñas, M.T., 2010. Study of a 2-branched (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Lactobacillus suebicus* CUPV221 as observed by Tapping mode Atomic Force Microscopy. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.), Formatex Research Center.
120. Mattila, P., Salovaananen, P., Konko, K., Aro, H., Jalava, T., 2002. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6419-6422.
121. Matos, A.J., Bezerra, R.M., Dias, A.A., 2007. Screening of fungal isolates and properties of *Ganoderma applanatum* intended for olive mill wastewater decolourization and dephenolization. *Letters in Applied Microbiology* 45, 270–275.

122. Mathlouthi, M., & Koenig, J. L., 1986. Vibrational spectra of carbohydrates. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 44, 7–89.
123. Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., Hadas, S., P., 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence system of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 1813–1819.
124. Mercan, N., Duru, M.E, Türkoğlu, A., Gezer, K., Kıvrak, İ., Türkoğlu, H., 2006. Antioxidant And Antimicrobial Properties Of Ethanolic Extract From *Lepista nuda* (Bull.) Cooke., *Annals Of Microbiology* 56, 339-344.
125. Min, B.S., Nakamura, N., Miyashiro, H., Bae, K.W., Hattori, M., 1998. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chemistry and Pharmaceutical Bulletin* 46, 1607–1612.
126. Minato, K., Mizuno, M., Ashida, H., Hashimoto, T., Terai, H., Tsuchida, H., 1999. Influence of storage conditions on immunomodulating activities of *Lentinus edodes*. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 243-250.
127. Minato, K., Mizuno, M., Kawakami, S., Tatsuoka, S., Denpo, Y., Tokimato, K., Tsuchida, H., 2001. Changes in immunomodulating activities and content of antitumour polysaccharides during growth of two mushrooms, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing and *Grifola frondosa* (Dicks:Fr.) S.F. Gray. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3, 1-7.
128. Mizuno, T., 1999. The extraction and development of antiitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1, 9-29.
129. Mizuno, T., 2000. Development of an antitumor biological response modifier from *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng (Aphyllophoromycetidae). *Int J Med Mushrooms* 2, 21-33.
130. Mizuno, T., Zhuang, C., 1995. Maitake, *Grifola frondosa*: pharmacological effects. *Food Reviews International* 11, 135-149.
131. Mizuno, T., 1995. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Food Reviews International* 11, 7-21.
132. Mizuno, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990a. Antitumor activity and some properties of water-soluble

- polysaccharides from ‘‘Himematsutake’’, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agricultural and Biological Chemistry Journal 54, 2889-2896.
133. Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Asakura, A., 1990b. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from ‘‘Himematsutake’’, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murrill. Agricultural and Biological Chemistry Journal 54, 2897-2906.
134. Mizuno, T., Ando, M., Sugie, R., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T., Matsuura, A., 1992. Antitumor activity of some polysaccharides isolated from an edible mushroom, ningyotake, the fruiting body and the cultured mycelium of *Polyporus confluens*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56, 34-41.
135. Mizuno, T., Ma, Y., Ito, H., Suzuki, C., 1994. Water insoluble polysaccharide originating in mushroom, its production, and antitumor agent mainly comprising the polysaccharide. Japanese Patent 06-080703, 22 March 1994.
136. Mizuno, T., 1996. A development of antitumour polysaccharides from mushroom fungi. Food Ingredients Journal (Japan) 167, 69-85.
137. Moradali, M.F., Mostafavi, H., Hejaroude, G.A., Tehrani, A.S., Abbasi, M., Ghods, S., 2006. Investigation of potential antibacterial properties of methanol extracts from fungus *Ganoderma applanatum*. Chemotherapy 52, 241-244.
138. Mothana, R.A.A., Jansen, R., Jülich, W.D., Lindequist, U., 2000. Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesyl hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pfeifferi*. Journal of Natural Products 63, 416-418.
139. Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Domoanguez, J.M., Sineiro, J., Domoanguez, H., Nuanaez, M.J., Parajoa, J. C., 2001. Review: Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry 72, 145-171.
140. MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional)
141. Mushroom and Yeast  $\beta$ -glucan Assay Procedure K-YBGL 09/2010 (Megazyme Int.).
142. Nakamura, T., Akiyama, Y., Kawagishi, H., 2005. A study of pharmacological components from submerged culture mycelia of *Phellinus linteus* (Berk. Et Curt.) Teng. International Journal of Medicinal Mushrooms 7, 213.



143. Niki, E., Shimski, H., Mino, M., 1994. Antioxidantism, free radicals and biological defence. *Biochemical Journal*, 134-139.
144. Obuchi, T., Kondoh, H., Watanabe, N., Tamai, M., Omura, S., Yang, J.S., Liang, X.T., 1990. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea*. *Planta Medica*, 56, 198-201.
145. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition* 44, 307–315.
146. Papas, A.M., 1999. Antioxidant status, diet, nutrition and health, United Kingdom: CRC Press.
147. Park, H. G., Shim, Y. Y., Choi, S. O., Park, W. M., 2009. New method development for nanoparticle extraction of water-soluble  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from edible mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2147-2154.
148. Paterson, R.R., 2006. *Ganoderma* - a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, 1985–2001.
149. Phillips, R., 1979. Mushrooms and other fungi of Great Britain & Europe, Macmillan: New York, pp. 227-235.
150. Prakash, A. (2001). Antioxidant activity. *Medallion Laboratories, Analytical Progress*, 19 (2), 1-6.
151. Pristov, J.B., Mitrovic, A., Spasojevic, I., 2011. A comparative study of antioxidative activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate Research* 346, 2255-2259.
152. Prota, G., 1992. Tyrosinase. *In H. B. Jovanovich (Ed.), Melanins and Melanogenesis (pp. 34-62)*. San Diego, CA: Academic Press.
153. 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.
154. Rigas, F., Papadopoulou, K., Dritsa, V., Doulia, D., 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindane utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 140(1/2), 325-32.

155. Rua, J., Busto, F., De Arriaga, D., Soler, J., 1993. Glycogen in *Phycomyces blakesleeanus*: Influence of growth conditions and nutrient limitation. *Journal of General Microbiology* 139, 217-222.
156. Russell, R. & Paterson, M., 2006. Review: Ganoderma-A therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry* 67, 1985–2001.
157. Sandven, P., (2000). Epidemiology of candidemia. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 73-81.
158. Sarić, Z., 1989. Opšta mikrobiologija. Naučna knjiga, Beograd.
159. Sarkar, S., 1993. Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* on the replication of the herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research* 20, 293-303.
160. Sasaki, T. & Takasuka, N., 1976. Further study of the structure of lentinan, an antitumour polysaccharide from *Lentinus edodes*, *Carbohydrate Research* 47, 99-104.
161. Satoh, K., Sakagami, H., 1997. Effect of metal ions on radical intensity and cytotoxic activity of ascorbate. *Anticancer Research* 17, 1125-1130.
162. Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K., Raaman, N., 2008. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 2125–2131.
163. Sharon, N., Lis, H., 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American* 74-81.
164. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 945-948.
165. Sletmoen, M., Stokke, B.T., 2008. Review: Higher order structure of (1, 3)- $\beta$ -D-Glucans and its influence on their biological activities and complexation abilities. *Biopolymers* 89, 310-320.
166. Smania E.F.A., Smania A.J., Loguercio-Leite, C., 1998. Cinnabarin synthesis by *Picnoporus sanguineus* strains and antimicrobial activity against bacteria from food products, *Revista de Microbiologia*, 29.

167. Smiderle, F. R., Sasaki, G. L., Van Arkel, J., Iacomini, M., Wichers, H. J., Van Griensven, L. J. L. D., 2010. High molecular weight of the culinary mushroom *Agaricus bisporus* is an  $\alpha$ -glucan that forms complexes with low molecular weight galactan. *Molecules* 15, 5818-5830.
168. Sokovic, M. & van Griensven, L.J.L.D., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 116, 211–224.
169. Song, W., Van Griensven, L. J. L. D., 2008. Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10, 315-324.
170. Sorimachi, K., Akimoto, K., Ikehara, Y., Inafuku, K., Okubo, A., Yamazaki, S., 2001., Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro, *Cell Structure and Function* 26, 103-108.
171. Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. (2001). National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. Retrieved May 10, 2011 from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Home Page: <http://riodb01.ibase.aist.go.jp>
172. Stamets, P., 2005. *Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World*. Ten Speed Press, Berkeley, California.
173. Stamets, P., 2002. *MycoMedicinals: An Informational Treatise on Mushrooms*, Olympia, Washington, U.S.A., MycoMedia Productions.
174. Stone, B. A. & Clarke, A. E., 1992. *Chemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -glucans*. Australia: La Trobe University Press, 47-49.
175. Suay, I., Arena, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diez, M.T., 2000. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 129-139.
176. Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Dommes, J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, 1226-1233.

177. Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* iller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry* 90, 333–340.
178. Tiwari, A.K., 2004. Antioxidant: New generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science* 86, 1092-1102.
179. Trevelyan, W.E., Procter, D.P., Harrison, J.G., 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166, 444-445.
180. Tseng, Y.H., Yang, J.H., Mau, J.L., 2008. Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry* 107, 732–738.
181. Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., Browder, I. W., Williams, D. L. 2001. Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radical Biology & Medicine* 30, 393-402.
182. Türkoğlu, A., Durub, M.E., Mercanc, N., 2007. Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr: an edible wild mushroom, *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* 2, 54-67.
183. 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
184. Turkoglu, A., Kivrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K., Turkoglu, H., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *African Journal of Biotechnology* 5 11, 1146-1150.
185. Van Gelder, C. W. G. & Flurkey, W. A. A. W. H. J., 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45, 1309-1323.
186. Wallenfels, K., 1950. Über einen neuen nachweis reduzierender zucker in papierchromatogramm und dessen quantitative auswertung. *Naturwissenschaften*, 37, 491-492.
187. Wang, H., Jiang, X., Mu, H., Liang, X., Guan, H., 2007. Structure and protective effect of exopolysaccharide from *P. agglomerans* strain KFS-9 against UV radiation. *Microbiological Research* 162, 124–129.

188. Wasser, S. P., Weis A. L., 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* 19, 65-96.
189. Wasser, S. P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 258-274.
190. Wasser, S. P., Yabidukh, M., Nevo, E., 2005. Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushroom polysaccharides and polysaccharide-protein complexes in animals and humans (Review). *Mycologia Balcanica* 2, 221-250.
191. Wasser, S. P., 2005. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Marcel Dekker, Inc. 270 Madison Avenue, New York, NY
192. Wasser, S. P., 2010. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 12, 1-16.
193. Widjanarko, S. B., Nugroho, A., Estiasih, T., 2011. Functional interaction components of protein isolates and glucomannan in food bars by FTIR and SEM studies. *African Journal of Food Science* 5, 12-21.
194. Wong, D.W.S., 2006. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 133, 87-112.
195. Wong, J.Y. & Chye, F.Y., 2009. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms, *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 269–277.
196. Wong, D.W.S., 2006. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 133, 87-112.
197. Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., Kojima, T., Norizuye, T., Takano, N., Fujita, H. 1983. Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution. *Biophysical Chemistry* 17, 337-342.
198. Yanaki, T., Ito, W., Tabata, K., 1986. Correlation between antitumor activity of schizophyllan and its triple helix. *Agricultural and Biological Chemistry* 509, 2415-2416.

199. Yang, M., Sun, H., Yu, D.W., Cui, Z.Y., Tian, J., 2005. Effects of the polysaccharides isolated from *Ganoderma applanatum* (PGA) on the level of PGE2 and gastric mucosal blood flow (GMBF) and gastric mucus secretion of rats with gastric mucosa injury. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 30, 1176-1178.
200. Yap, A. T. & Ng, M-L. M., 2001. An improved method for the isolation of lentinan from edible and medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (*Agaricomycetidae*), *International Journal of Medicinal Mushrooms* 3, 6-19.
201. Yen, G. Ch., Duh, P. D., Tsai, H. L., 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chemistry* 79, 307-313.
202. Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y., Wen, H., 1987. *Icones of medicinal fungi from China*. Science Press, Beijing, China, 575.
203. Zhang, W., Wang, Y., Hou, Y., 2004. Effects of Chinese medicinal fungus water extract on tumor metastasis and some parameters of immune function. *International Immunopharmacology* 4, 461-468.
204. Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P.C.K., 2011. Review: Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocolloids* 25, 196-206.
205. Zhu, H.S., Yang, X.L., Wang, L.B., Zhao, D.X., Chen, L., 2000. Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells. *Cell Biology and Toxicology* 16, 201-206.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

**Maja S. KOZARSKI** (rođ. Ljubičić) rođena je u Varšavi, Poljska. Diplomirala je biohemiju na Hemijskom fakultetu sa prosečnom ocenom 8,47 u Beogradu 1997. godine. Magistarsku tezu pod nazivom "Karakterizacija biomodulatorskih polisaharida gljiva iz klase *Basidiomycetes*" odbranila je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2006. godine, iz oblasti prehrambeno-tehnoloških nauka-biohemija u prehrambenoj tehnologiji.

Od 1998. godine, zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu u Institutu za prehrambenu tehnologiju i biohemiju-Katedra za hemiju i biohemiju, u zvanju stručnog saradnika na predmetu biohemija. Od jula 2007. godine izabrana je za asistenta na predmetima Biohemija, Osnovi biohemije i Biohemija hrane.

Oblast interesovanja i naučno-istraživačkog rada je strukturna karakterizacija i ispitivanje bioloških svojstava aktivnih komponenti viših gljiva..

Autor i koautor je četiri naučna rada sa ISI liste objavljenih u uglednim inostranim časopisima i preko 20 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Jedan je od dobitnika FEMS-ove stipendije za mlade naučne radnike u 2005. godini, kao i ISMS stipendije u 2007. godini. Dobitnik je zlatne medalje na 74. Međunarodnom poljoprivrednom sajmu u Novom Sadu, za najbolji naučno istraživački rad kao doprinos razvoju agrobiznisa u 2007 godini. Od 2005. član je Mikrobiološkog društva Srbije. U 2005. godini boravila je na naučnom usavršavanju "Plant Research International Institute of the University of Wageningen" (Holandija), na odseku za Biološke nauke.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Маја Козарски \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, АНТИОКСИДАТИВНА И

АНТИМИКРОБНА СВОЈСТВА ПОЛИСАХАРИДНИХ

ЕКСТРАКАТА ОДАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА

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

У Београду, 25.06.2012.

Потпис докторанда

Маја Козарски



Прилог 2.

**Изјава о истоветност  
штампане и електронске верзије докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Маја Козарски \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, АНТИОКСИДАТИВНА  
И АНТИМИКРОБНА СВОЈСТВА ПОЛИСАХАРИДНИХ ЕКСТРАКТА  
ОДАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА

Ментор \_\_\_\_\_ др Мирослав М. Врвић, редовни професор \_\_\_\_\_  
и \_\_\_\_\_ др Драгица Јаковљевић, виши научни сарадник \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ Маја Козарски \_\_\_\_\_

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 25.06.2012.

Потпис докторанда

Маја Козарски

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА, АНТИОКСИДАТИВНА И АНТИМИКРОБНА СВОЈСТВА ПОЛИСАХАРИДНИХ ЕКСТРАКТА ОДАБРАНИХ ВРСТА ГЉИВА

која је моје ауторско дело.

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

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

1. 1. Ауторство
- ② 2. Ауторство – некомерцијално
3. 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. 5. Ауторство – без прераде
6. 6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 25.06.2012.

Потпис докторанда

Милош Козареки