

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Milena D. Savić

**AKUMULACIJA I TRANSFORMACIJA
SELENA U INDUSTRIJSKIM GLJIVAMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Milena D. Savić

**ACCUMULATION AND
TRANSFORMATION OF SELENIUM IN
INDUSTRIAL MUSHROOMS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr Miroslav M. Vrvic, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

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

dr Anita Klaus, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Maja Kozarski, docent
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije:

Veliku zahvalnost na pomoći, poverenju i podršci koju mi je pružio tokom izrade i pisanja doktorske disertacije dugujem svom mentoru prof. dr Miomiru Nikšiću.

Iskreno se zahvaljujem i prof. dr Miroslavu M. Vrvicu na stručnoj pomoći i sugestijama prilikom pisanja rada i na razumevanju.

Veliko hvala prof. dr Ljubinku Jovanoviću na ukazanoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dela i korisnim savetima kad god su mi bili potrebni.

Doc. dr Maji Kozarski veliko hvala na pomoći prilikom izrade doktorske disertacije i više nego korisnim sugestijama prilikom pisanja rada.

Doc. dr Aniti Klaus hvala na svim godinama kolegijalnosti, na korisnim savetima, podršci i pomoći tokom izrade i pisanja rada kao i savetima korisnim za život.

Zahvaljujem se divnim ljudima, doc. dr Jadwigi Turlo i kolegama sa Katedre za sintezu lekova i biotehnologiju Medicinskog Univerziteta u Varšavi na ukazanom poverenju, pruženoj pomoći i podršci prilikom izrade velikog dela disertacije tokom realizacije stipendije FEMS i COST Bioflavour.

Prof. dr Dragojlu Obradoviću zahvaljujem se na neizmernoj podršci koju mi je pružio od prvog dana mog rada na fakultetu.

Zahvaljujem se prof. dr Viktoru Nedoviću za uključivanje u Cost akciju, doc. dr Nenadu Filipoviću za selenosemikarbazonskom kompleksu i saradnju i dipl. hem. Milici Pavličević na elektroforetskim analizama.

Najsrdačnije se zahvaljujem dr Ivanu Andjelkoviću sa Hemijskog fakulteta u Beogradu i laboratoriji Abiotech Univerziteta Educons na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se i Ministarstvu za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, koje je finansiralo projecte br. 46001 i 46010, u okviru kojih je rađena i ova teza.

Posebno se zahvaljujem mojoj ekipi: kolegama i prijateljima, dragim devojčicama i dečacima sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Katedre za ekološku mikrobiologiju, Katedre za Konzervisanje i vrenje i Katedre za hemiju pre svega na prijateljstvu, razumevanju i nesebičnoj pomoći koju su mi pružili kad god je to trebalo.

Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima, sestri i mom voljenom Ivanu na neizmernoj ljubavi, razumevanju, strpljenju, pomoći i podršci svih ovih godina. Bez vas sve ovo ne bi imalo smisla.

Autor

AKUMULACIJA I TRANSFORMACIJA SELENA U INDUSTRIJSKIM GLJIVAMA

REZIME

Pečurke su bogat izvor gotovo svih esencijalnih aminokiselina i vitamina, mineralnih materija, ugljenih hidrata, proteina; imaju nizak sadržaj masti, ali vrlo visok udeo nezasićenih masnih kiselina. Gljive roda *Pleurotus*, imaju vrlo visoku nutritivnu vrednost, a spadaju u grupu industrijskih gljiva, lako se gaje te se na njima uspešno može pratiti mogućnost akumulacije i transformacije selen. Gljive imaju različit kapacitet usvajanja selen, što zavisi od vrste gljive, hranljive podloge na kojoj je gljiva odgajana, kao i od oblika i koncentracije u kom je selen dodat u podlogu. Očekuje se da će gljiva usvojiti uspešno selen iz supstrata u vidu organskih i neorganskih jedinjenja u koncentraciji koja može da zadovolji dnevne potrebe čoveka. Kako gljive sadrže bioaktivne komponente, dodatno selenom obogaćene pečurke moguće je koristiti u svežem i sušenom stanju ili kao potencijalni dijetetski suplement.

Praćen je rast micelijuma različitih industrijskih gljiva na sladnom agaru sa selenom dodatim u obliku neorganskih i organskih jedinjenja. Selenski kvasac i kompleks cink (selenosemikarbazon) su stimulisali rast micelije gljive bukovače, dok je natrijum selenit delovao inhibitorno. Rast micelijuma gljive *Ganoderma lucidum* stimulisan je selenskim kvascem. Kada je u pitanju gljiva *Lentinus edodes*, najbolji izvor selen bio je natrijum selenit, a organska jedinjenja selen su delovala inhibitorno.

Ispitivana je mogućnost akumulacije i transformacije selen iz selenita (100 mg Se/kg supstrata), selenskog kvasca (100 mg Se/kg supstrata) i kompleksnog jedinjenja (50 mg Se/kg supstrata) u plodonosno telo model gljive *Pleurotus ostreatus* P70. Kod ostalih ispitivanih sojeva (*Pleurotus ostreatus* P80, *Pleurotus salmoneostramineus* i *Pleurotus cornucopiae*), praćena je mogućnost usvajanja selen samo iz selenskog kvasca kao najpogodnijeg izvora selen. Selen iz selenita efektno je akumuliran u plodonosno telo soja *P. ostreatus* P70, kao i selen iz organskog kompleksnog jedinjenja. Dokazano je da ispitivane vrste gljiva imaju različitu mogućnost apsorpcije selen

dodatog u supstrat u formi selenskog kvasca. Ukupan sadržaj selena je bio najveći kod *P. salmoneostramineus* (197.93 µg/g), a fruktifikacija je kasnila 3-5 dana.

Ispitivan je hemijski sastav gljiva u cilju utvrđivanja uticaja selena na eventualnu razliku u hemijskom sastavu i praćenja transformacije usvojenog selena u plodonosnom telu. Dobijeni rezultati potvrđuju da se selen vezuje za ugljene hidrate kao i to da vrsta jedinjenja selena verovatno utiče na sadržaj ugljenih hidrata. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u gljivama obogaćenim selenom iz kvasca bio je do 25% viši u odnosu na kontrolu. Selenit ili kompleks selenosemikarbazon ne menjaju značajno sadržaj ugljenih hidrata u gljivama. Uticaj selena u gljivama nije bio značajan za koncentraciju lipida. Utvrđeno je da postoji značajna razlika u sadržaju proteina između različitih sojeva sa dodatim selenom iz kvasca (13.31-23%), kao i da različita jedinjenja selena značajno menjaju sadržaj proteina. Sadržaj fenola je kod gljiva sa selenom bio za oko 30-40% viši u odnosu na sadržaj fenola kod kontrolnih gljiva, osim u slučaju kompleksa [Zn(dapsesc)].

U cilju praćenja transformacije usvojenog selena u plodonosnom telu gljive, određen je ukupan sadržaj selena, ugljenih hidrata, β-glukana, proteina, i fenola, FT-IR spektroskopija i određen je monosaharidni sastav HPLC metodom u vrelinim vodenim i vrelinim alkalnim ekstraktima polisaharida. Primećena je vrlo visoka korelacija u sadržaju selena između celih gljiva sa jedne strane i vodenih i alkalnih ekstraktata sa druge strane. Utvrđeno je postojanje najmanje duplo više koncentracije selena u vrelinim vodenim nego u alkalnim ekstraktima, što znači da se selen najvećim delom zadržava u komponentama rastvorljivim u vodi. Selen koji se vezuje za ugljene hidrate nije značajno promenio sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima kako vrelinim vodenim tako i vrelinim alkalnim. Kod svih vrelih vodenih ekstrakata sa povećanim sadržajem selena, detektovan je značajno veći sadržaj β-glukana, osim kod vodenog ekstrakta gljive *P. ostreatus* P70 sa selenom koja je rasla na supstratu sa neorganskim selenom i kompleksom gde je došlo do statistički značajnog smanjenja u sadržaju β-glukana. Iz ovoga se pretpostavlja da vrsta jedinjenja selena utiče na sadržaj glukana i prednost je u korišćenju organskog jedinjenja selena. U vrelinim vodenim ekstraktima, sa povećanim sadržajem selena rastao je i sadržaj fenola, 10-30% u odnosu na kontrolne uzorke, osim u slučaju uzorka sa dodatkom selena iz kompleksa. Kod vrelih alkalnih ekstrakata sa povećanim sadržajem selena, fenola je bilo i do 80% manje

u odnosu na kontrolne uzorke. Najviše proteina izdvojeno je vrelom vodenom ekstrakcijom dok je sadržaj proteina izdvojenih vrelom alkalnom ekstrakcijom i do 20 puta niži. Ovim se takođe objašnjava znatno niža koncentracija selen u alkalnim polisaharidnim ekstraktima. FT-IR spektroskopijom utvrđeno je prisustvo spektara karakterističnih za ugljene hidrate. Vreli vodeni ekstrakti dobijeni iz uzoraka gljiva obogaćenih selenom iz kvasca imali su izraženije pikove α - i β -glikozidnih veza nego kontrolni ekstrakti. Takođe, samo kod ovih uzoraka detektovane su slabe apsorpcione trake karakteristične za hemicelulozu. Analizom monosaharidnog sastava utvrđeno je da su kod svih ispitivanih sojeva najzastupljeniji monosaharidi D-glukoza, D-galaktoza i D-manoza. Nije bilo statistički značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i selenom obogaćenih uzoraka, kao ni između vodenih i alkalnih ekstrakata.

Jedan od zadatih ciljeva rada je i određivanje proteinskog sastava gljiva preko aminokiselinskog sastava. Utvrđeno je da prisutan selen ne menja aminokiselinski profil gljiva, osim kada je reč o aminokiselinama sa sumporom. Dominantne aminokiseline u svim gljivama su glutaminska (13.13-28.46 mg/g suve mase) i asparaginska (6.81-12.55mg/g suve mase). U svim gljivama obogaćenim selenom, metionina je bilo više u odnosu na selenometionin. Odnos ove dve aminokiseline varirao je zavisno od vrste gljive i od vrste dodatog jedinjenja, što ukazuje na to da supstrat na kojem se gljiva gaji i parametri gajenja značajno utiču na odnos ove dve kiseline. Proteinske frakcije određene pomoću SDS-PAGE elektroforeze od oko 15 kDa i između 30 i 40 kDa bile su dominantne za sve proučavane sojeve. Udeo selen u proteinima u odnosu na celu gljivu bio je u proseku 44.45-70.34%. Ukupan sadržaj selen u selenoproteinima varirao je zavisno od soja. Razlika u usvojivosti selen korišćenjem organskih i neorganskih jedinjenja bila je statistički značajna.

U cilju optimizacije proizvodnje gljiva sa selenom praćena je akumulacija selen iz više koncentracija selenskog kvasca dodatog u proizvodni supstrat kao i njegovo antifungalno delovanje na *Mycogone pernicioza* P₁M₂, *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆, *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆ i *Trichoderma harzianum* P₁T₆. Najefikasnije koncentracije selenskog kvasca koje su inhibirale rast antagonističkih gljiva (plesni) su koncentracije 70-200 mg Se/kg supstrata. Dodavanjem koncentracije od 100 mgSe/kg supstrata, selen je usporio fruktifikaciju gljiva za nekoliko dana, ali su plodonosna tela usvojila visoke koncentracije selen, oko 100 μ g/g suve mase gljive *Pleurotus spp.*

računato na suhu masu gljive. Na ovaj način postignut je dvostruki efekat gajenja gljiva sa dodatkom selenskog kvasca. Dobijena je obogaćena gljiva, potencijalni dijetetski proizvod sa visokim sadržajem selena uz manji rizik od kontaminacije u industrijskom pogonu.

Ključne reči: gljive, *Pleurotus spp.*, natrijum selenit, selenosemikarbazon, selenski kvasac, akumulacija, transformacija, polisaharidi, proteini, optimizacija

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK: 635.8:66.094.529 (043.3)

ACCUMULATION AND TRANSFORMATION OF SELENIUM IN INDUSTRIAL MUSHROOMS

ABSTRACT

Mushrooms contain almost all essential amino acids and vitamins, minerals, carbohydrates, proteins, they have low content of fats, but they are very rich in unsaturated fatty acids. Fungi of the genus *Pleurotus*, have high nutritional value, they are member of industrial fungi, easy to grow and the possibility of accumulation and transformation of selenium in fruit body is easy to be monitored. Mushrooms have a different absorption capacity of selenium, which is dependent on the type of substrate for mushroom growing, on the strain of fungi as well as the form and concentration of the selenium which is added to the substrate. It is expected that selenium is going to be accumulated by fungi easy from the substrate in the form of organic or inorganic compounds in a concentration that can satisfy the daily needs of the man. As enriched fungi contain bioactive compounds with selenium, they can be used as a potential pharmaceutical supplement or as fresh or dry fruit body.

Mycelium growth of various industrial fungi on malt agar with selenium in the form of inorganic and organic compounds was monitored. Selenium yeast and complex zinc (selenosemicarbazone) stimulated the growth of Oyster mushroom mycelium, and sodium selenite seemed to be toxic. Mycelium growth of the fungus *G. lucidum* was stimulated by selenized yeast. When it comes to mushroom *L. edodes*, the best source of selenium was sodium selenite, and organic selenium compounds had inhibitory action.

The possibility of transformation and accumulation of selenium from sodium selenite (Se 100 mg/kg of substrate), selenium yeast (100 mg Se/kg of substrate) and complex selenosemicarbazone (50 mg Se / kg substrate) in fruit body of model mushroom *P. ostreatus* P70 was examined. For other tested strains (*P. ostreatus* P80, *P. salmoneostramineus* and *P. cornucopiae*), only the possibility of accumulation of selenium from selenized yeast as the most appropriate source of selenium was examined. Selenium in the form of sodium selenite and organic complex compound is effectively accumulated in the *P. ostreatus* P70 fruit body. It has been shown that the species of fungi have different possibility to absorb selenium in the form of selenium

yeast. The highest total selenium content was detected in *P. salmoneostramineus* fruit body, 197.93 mg/g and fructification was delayed for 3-5 days.

The present study was also focused on the fungi chemical composition in order to determine the effects of selenium on the eventual differences in the chemical composition comparing to control samples and monitoring transformation of selenium in mushroom fruit body. The results confirm that the selenium binds the carbohydrates, as well as that the type of selenium compounds probably affects the extractability of carbohydrates. The content of total carbohydrates in the mushrooms enriched with selenium yeast was increased by 25% compared to control. Selenite or complex compound did not change significantly the carbohydrate content of mushrooms. Selenium influenced the concentration of lipid in mushroom, but not significantly. There was significant difference in protein content between different strains enriched by selenized yeast (13.31-23%) as well as that different selenium compounds significantly alter the protein content. The phenol content in all selenized fungi was about 30-40% higher than in the control of fungi, except in the case of the complex [Zn (dapsesc)].

In order to follow the transformation of absorbed selenium in the body of the fungus, total content of selenium, carbohydrates, β - glucans, proteins and phenol, FT - IR spectroscopy and monosaccharide composition by HPLC were determined in the hot water and the alkaline polysaccharide extracts. Between whole mushrooms, water and alkali extracts positive correlation was noticed when it comes to the content of selenium. The hot water extracts had at least twice of total selenium content compared to the alkaline polysaccharide extracts, which means that the selenium mostly retains in the water-soluble compounds. The carbohydrate bound selenium did not significantly change the total carbohydrate content of hot water and alkaline polysaccharide. In all hot water extracts with high content of selenium, significantly higher content of β -glucans was detected except in the *P. ostreatus*P70 extract that was grown on the substrate with organic complex, where the β -glucan content was significantly decreased. The results indicate that selenium type probably influences the content of the glucans and the use of organic compounds of selenium is advantage. In the hot water extracts, with an increased content of selenium the content of phenol was also increased, about 10-30% compared to the control samples, except in the case of the sample enriched with selenium from the complex. In alkaline extracts with selenium,

the phenol content was up to 80% decreased comparing to the control samples. The major part of the protein was already extracted with hot water and in the alkaline extraction to 20 times less protein content. This also explains the much lower concentration of selenium in alkaline polysaccharide extracts. Polysaccharide extracts showed FT-IR spectra characteristic for carbohydrates. Hot water extracts obtained from mushrooms selenium enriched with yeast had more pronounced peaks of α - and β -glycoside bonds than control extracts. Also, only those samples showed the weak absorption band characteristic for the hemicelluloses. The monosaccharides in all samples were D-glucose, D-galactose and D-mannose. There were no significant differences between the monosaccharide composition of the control and selenium enriched samples, and neither between the hot water and alkaline extracts.

One of the goals of this research was determination of the amino acid composition of fungi. It was found that selenium does not change the amino acid profile of fungi, except in the case of amino acids with sulfur. The major amino acids of the protein in all samples were glutamic acid (13.13-28.46 mg/g dry weight) and aspartic acid 6.81-12.55 mg/g dry weight. In all selenium enriched fungi, there was more methionine compared to selenomethionine. The ratio of these two amino acids varied depending on the mushroom strain and the type of selenium compounds. It means that the substrate for mushroom growing and ecological parameters significantly affect the ratio of these two acids. Molecular weight of protein fractions were determined by SDS-PAGE electrophoresis. Fractions about 15 kDa and from 30 to 40 kDa were predominant for all strains. The total content of selenium in selenoproteins varied depending on the strain. Content of selenium in protein compared to whole mushroom was 44.45-70.34%. The difference in accumulation of selenium by using inorganic and organic selenium compounds was significant.

In order to optimize the production of mushrooms with selenium, the accumulation of selenium in different concentration of selenized yeast added in substrate and antifungal activity of selenized yeast on *Mycogone perniciosus* P₁M₂, *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆, *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆ and *Trichoderma harzianum* P₁T₆ was monitored. The results suggest that the most suitable concentrations of selenized yeast that inhibit the growth of the mycopathogenic molds are 70-200 μ g/g of selenium. With addition of 100mgSe/kg substrate concentrations to

the substrate, selenium will affect the growth rate of mushrooms for a few days, but the fruit bodies will uptake high level of selenium, about 100 µg/g for *Pleurotus spp.* on dry weight of the mushroom. In this way a double effect in the cultivation of mushrooms is achieved – Enriched fungi, the potential dietetic supplement with high content of selenium with a lower risk of contamination were obtained.

Key words: Fungi, *Pleurotus spp.*, Sodium selenite, Selenosemicarbazone, Selenized yeast, Accumulation, Transformation, Polysaccharides, Proteins, Optimization

Academic Expertise: Biotechnology

Field of Academic Expertise: Food and Industrial Microbiology

UDK: 635.8:66.094.529 (043.3)

SKRAĆENICE:

AAS: Atomski apsorpcioni spektrometar

ANOVA: Jednofaktorijska analiza varijansi

ATP: Adenozin tri fosfat

AUG: Kodon u iRNA sekvenci

BHT: Butilovani hidroksitoluen

BSA: Albumin iz goveđeg seruma

CPK: Kreatin fosfokinaza

CPL: Relativna kompresibilnost pletenina

DI-I: Jodotironin dejodinaza, tip I

DNK: Dezoksi ribonukleinska kiselina

EFSA: The European Food Safety Authority

FAO: The Food and Agriculture Organization

FDA: The Food and Drug Administration

FEEDAP: Animal feed panel group

FT-IR: Fourier Transform-Infrared Spectroscopy

GPX: Glutation peroksidaza

GSH: Glutation

HPLC: Tečna hromatografija visokog stepena razdvajanja

iRNK: Informaciona ribonukleinska kiselina

ICP-MS: Masena spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom

ICP-OES: Optička emisiona spektrometrija sa indukovano spregnutom plazmom

K: Kontrola

KBr: Kalijum bromid

OPA: o-ftalaldehid

PC: *Pleurotus cornucopiae*

PMP: 1-fenil-3-metil-5-pirazolon

PO: *Pleurotus ostreatus*

PO P70: *Pleurotus ostratus* P70

PO P80: *Pleurotus ostreatus* P80

PS: *Pleurotus salmoneostramineus*

RDA: Preporučeni dnevni unos

ROS: Reaktivne kiseonikove vrste

SDS-PAGE: Natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza

Se: Selen

SeO₃²⁻: Seleniti

SeO₄²⁻: Salenati

SeCys: Selenocistein

SeMet: Selenometionin

SeO₂: Selen-dioksid

SP: Selenoprotein

Ser: Serin

Sel-P: Selenoprotein P

Sel-R: Selenoprotein R

Sel-W: Selenoprotein W

T3: Trijodtrionin

T4: Tiroksin

TFA: Trifluorosirćetna kiselina

TR: Tioredoksin reduktaza

tRNK: Transportna ribonukleinska kiselina

UGA: Stop kodon

WHO: The World Health Organization

Zn(dapsesc): Kompleks cink selenosemikarbazona

Zn(CH₃COO)₂xH₂O: Cink-acetat-dihidrat

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Više gljive- carstvo Fungi	4
2.2. Industrijske gljive	6
2.3. Gljive kao funkcionalna hrana	8
2.4. Opšte karakteristike gljiva roda <i>Pleurotus</i>	12
2.4.1. <i>Pleurotus cornucopiae</i>	15
2.4.2. <i>Pleurotus salmoneo-stramineus</i>	15
2.4.3. <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
2.5. Selen u gljivama	17
2.6. Fizičko-hemijska svojstva selena	19
2.7. Selen u litosferi	20
2.8. Selen u ishrani	21
2.9. Biološka uloga selena	25
2.9.1. Selenoproteini	26
2.9.2. Biosinteza selenoproteina kod eukariota	27
2.9.3. Metabolizam selena kod sisara	30
2.9.4. Selenoprotein P	32
2.9.5. Selenoprotein W i R	33
2.9.6. Selen u funkciji glutation peroksidaze	33
2.9.7. Selen u funkciji štitne žlezde	34
2.9.8. Selen u hemoprevenciji	35
2.9.9. Selen u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja	37
2.9.10. Selen u zaštiti od infektivnih oboljenja	37
2.10. Toksičnost selena	38
2.11. Suplementi na bazi selena	39
2.11.1. Kvasac obogaćen selenom	40
2.12. Neorganske soli selena	41
2.13. Selenosemikarbazonski kompleksi	42

3. CILJEVI	43
4. MATERIJAL I METODE	45
4.1. Odredjivanje brzine rasta micelije	45
4.2. Industrijski postupak gajenja gljiva	45
4.3 Odredjivanje sadržaja ukupnog selen u plodonosnom telu gljiva, polisaharidnim i proteinskim ekstraktima	46
4.4. Priprema polisaharidnih ekstrakata	47
4.5. Ekstrakcija proteina iz gljiva	47
4.6. Odredjivanje sadržaja ukupnih fenola u plodonosnom telu gljiva i polisaharidnim ekstraktima	48
4.7. Odredjivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u gljivama i polisaharidnim ekstraktima	48
4.8. Odredjivanje sadržaja β -glukana u polisaharidnim ekstraktima	49
4.9. Odredjivanje sadržaja proteina	50
4.10. Odredjivanje sadržaja lipida	50
4.11. Tečna hromatografija polisaharidnih ekstrakata gljiva	51
4.12. FT-IR spektroskopija polisaharidnih ekstrakata gljiva	52
4.13. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)	52
4.13.1. Izolacija proteina	52
4.13.2. SDS-PAGE	53
4.14. Odredjivanje aminokiselinskog sastava gljiva	53
4.15. Ispitivanje antifungalnog delovanja preparata Sel-Plex [®]	54
4.16. Statistička analiza podataka	56
5. REZULTATI I DISKUSIJA	57
5.1 Odredjivanje brzine rasta micelije	57
5.1.1. Uticaj natrijum selenita, (Na_2SeO_3) na rast micelijuma gljiva	57
5.1.2. Uticaj kompleksa [Zn (dapsesc)] na rast micelijuma gljiva	58
5.1.3. Uticaj selenskog kvasca na rast micelijuma gljiva	59
5.2. Usvajanje selen u plodonosna tela gljive <i>Pleurotus spp.</i>	60
5.2.1. Usvajanje selen iz neorganskih soli u plodonosno telo gljive <i>Pleurotus ostreatus</i> P70	61
5.2.2. Usvajanje selen iz kompleksnog jedinjenja [Zn (dapsesc)]	

u plodonosno telo gljive <i>Pleurotus ostreatus</i> P70	62
5.2.3. Usvajanje selena u obliku selenskog kvasca u plodonosna tela gljive <i>Pleurotus spp.</i>	63
5.3. Nutritivni sastav gljiva sa selenom	65
5.3.1. Odredjivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u gljivama	67
5.3.2. Odredjivanje sadržaja vodorastvorljivih proteina u gljivama	69
5.3.3. Odredjivanje sadržaja lipida u gljivama	70
5.3.4. Odredjivanje sadržaja ukupnih fenola u gljivama	71
5.4. Hemijska karakterizacija polisaharidnih ekstrakata sa selenom	72
5.4.1. Prinos polisaharidnih ekstrakata	72
5.4.2. Ukupan sadržaj selena u ekstraktima polisaharida	73
5.4.3. Odredjivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima	76
5.4.4. Odredjivanje sadržaja β -glukana u polisaharidnim ekstraktima	79
5.4.5. Odredjivanje sadržaja ukupnih fenola u polisaharidnim ekstraktima	80
5.4.6. Odredjivanje sadržaja proteina u polisaharidnim ekstraktima	81
5.4.7. Strukturna analiza polisaharidnih ekstrakata (FT-IR spektroskopija)	82
5.4.7.1. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive <i>Pleurotus ostreatus</i> P70	
5.4.7.2. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive <i>Pleurotus ostreatus</i> P80	87
5.4.7.3. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive <i>Pleurotus cornucopiae</i>	90
5.4.7.4. FTIR spektri glikozidnih veza u <i>Pleurotus salmoneostramineus</i>	90
5.4.8. Tečna hromatografija polisaharidnih ekstrakata	91
5.5. Hemijska karakterizacija proteina sa selenom	
5.5.1. Ukupan sadržaj selena u proteinima rastvornim u vodi	
5.5.2. Aminokiselinski sastav gljiva sa selenom	104

5.5.3. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)	112
5.6. Optimizacija procesa proizvodnje gljiva	115
5.6.1. Određivanje antifungalne aktivnosti preparata Sel-Plex [®]	119
6. ZAKLJUČCI	123
7. LITERATURA	134
8. PRILOZI	160
8.1. Prilog A: Hromatogrami monosaharidnog sastava polisaharida gljiva <i>Pleurotus spp.</i>	160
8.2. Prilog B: Hromatogrami aminokiselinskog sastava plodonosnih tela <i>Pleurotus spp.</i>	170
8.3. Prilog C: FT-IR spektri dobijeni snimanjem polisaharidnih ekstrakata gljiva <i>Pleurotus spp.</i>	177

1. UVOD

Više gljive, pečurke, kojima se danas pridaje veliki značaj, od davnina se koriste u tradicionalnoj medicini Kine, Japana i Koreje, a danas širom sveta kao antitumorni preparat. Poznato je preko 600 vrsta sa potvrđenim terapijskim svojstvima (Griensven, 2000). Samo određeni broj ima primenu u prehrambenoj industriji i ishrani. Sadrže različite hidrolitičke enzime koji mogu da razgrade složene biopolimere do manjih molekulskih masa. Poseduju sposobnost metaboličke transformacije biljnih lignoceluloznih ostataka niske hranljive vrednosti u visokovredne delikatesne namirnice bogate proteinima. Najpre su sakupljane u svom prirodnom staništu, a tek u skorije vreme započeto je njihovo intenzivno gajenje u veštačkim uslovima, što je dovelo i do porasta njihove potrošnje. Moderna istraživanja su fokusirana na izučavanje njihovih biološki aktivnih komponenata sa lekovitim, najčešće anti-kancerogenim dejstvima, antioksidativnim, antiviralnim, antimikrobnim, zatim sa mogućnošću snižavanja krvnog pritiska i holesterola (Griensven, 2000). Rezultati ukazuju na to da bazidiomicete, njihovi vodeni i alkoholni ekstrakti, predstavljaju dobre antioksidante sa mogućnošću vezivanja slobodnih radikala (Jayakumar i sar., 2006; Tseng i sar., 2008; Turlo i sar., 2010). Više gljive imaju i sposobnost da akumuliraju materije iz supstrata na kojem se gaje. Zato su izuzetno pogodne za korišćenje u bioremedijaciji (za degradaciju toksičnih organskih jedinjenja), ali i usvajanje korisnih mikronutrijenata (deficitarnih u namirnicama biljnog porekla) neophodnih za ljudski organizam (Kalač, 2001; Vetter, 2004; Svoboda i sar., 2006).

Hemijski element selen je esencijalni mikronutrijent za sisare, ptice i bakterije, antioksidant, neophodan za pravilan rad hormona i imunog sistema (Reilly, 2006). Ulazi u sastav mnogobrojnih proteina sisara (glutation peroksidaza kod čoveka), a koristi se i u prevenciji tumora, tiroidnih, kardiovaskularnih oboljenja i parkinsonove bolesti (Hatfield, 2003). Ugrađuje se u kosu, krv, srce, pluća, a napušta organizam putem urina, nešto manje i putem kože kao i putem disajnih organa (Dumont i sar., 2006; Suzuki, 2005).

Preporučena RDA vrednost je 55 µg/dan selen a za odraslog zdravog čoveka (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000). Prema navedenim rezultatima istraživanja, svet se suočava sa potencijalnom opasnošću od pojave oboljenja izazvanim nedovoljnim unosom selen a. Nedostatak selen a može dovesti do niza poremećaja u organizmu, kao što su mišićna slabost, obstruktivna miokardiopatija i tumor (Hatfield, 2003). Višegodišnjom ishranom obogaćenom selenom u vidu selenskog kvasca i/ili selenometionina, dokazana je značajna korelacija između koncentracije selen a u mišićima, crvenim krvnim zrnima, krvnoj plazmi, vlasima kose i noktima (Gao i sar., 2011; Govasmark, 2010). Zadovoljenje dnevnih potreba za selenom postiže se unošenjem cerealija, ribljeg mesa i sl. (USDA,2012).

Generalno, koncentracija selen a u namirnici direktno zavisi od sadržaja proteina. Ispitivanja rađena na miševima ukazuju na to da se selen u vidu selenometionina i selenom obogaćenog kvasca bolje usvaja i duže zadržava u organizmu u poređenju sa neorganskim solima selen a. Neorganska forma selen a se brže ekskretuje iz organizma i toksičnija je u poređenju sa selenometioninom (Thomson, 1998). Selenometionin, kao aminokiselina, najčešće se javlja u belom luku, brokoliju, crnom luku i efektivniji je u hemoprevenciji tumora u odnosu na druge ispitivane suplemente što je dokazano u *in vivo* ispitivanjima na miševima (Li i sar., 2004).

Neke jestive gljive usvajaju selen i mogu se koristiti kao bioindikatori zagađenja zemljišta selenom i teškim metalima. One uglavnom sadrže niskomolekularne komponente selen a, kao što su selenit i aminokiseline selenocistein i selenometionin u kojima je sumpor zamenjen sa selenom (Falandysz,2008). Sadržaj selen a u suvoj masi gljiva se kreće između 0.57 i 19.46 mg/kg, zavisno od vrste, godine i mesta nalaženja (Borovička i Randa, 2007). Forma selen a koja je korišćena u dosadašnjim ispitivanjima akumulacije selen a u gljivama je neorganska so, selenit, koji gljiva uspešno apsorbuje iz supstrata (20-30%) i biotransformiše u organski oblik, selenoproteine (50-70%) (Zhao i sar., 2008; Stajić i sar.,2006).

Potrebno je ispitati mogućnost primene i drugih potencijalnih izvora selen a, organskih jedinjenja sa selenskim kvascem kao najzanimljivijim izvorom selen a u

vidu selenometionina. Potencijalna upotreba novih organskih jedinjenja selena ima niz prednosti u odnosu na neorganski. Pre svega, dugo izlaganje neorganskim solima može dovesti do trajnih oboljenja kod čoveka (Hathcock, 2004). Selenski kvasac i druga organo jedinjenja selena su potencijalni bezbedan izvor koji se može koristiti u dobijanju novog dijetetskog suplementa na bazi gljiva. Gljive imaju različit kapacitet usvajanja selena, što zavisi od vrste medijuma na kojem je gljiva odgajana, od vrste gljive kao i od oblika i koncentracije u kom je selen dodat u supstrat (Kalač, 2009). Gljive roda *Pleurotus*, imaju izrazitu nutritivnu vrednost, spadaju u gljive koje su popularne i lake za industrijsko gajenje te se na njima najjednostavnije može pratiti akumulacija i transformacija selena.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Više gljive - carstvo Fungi

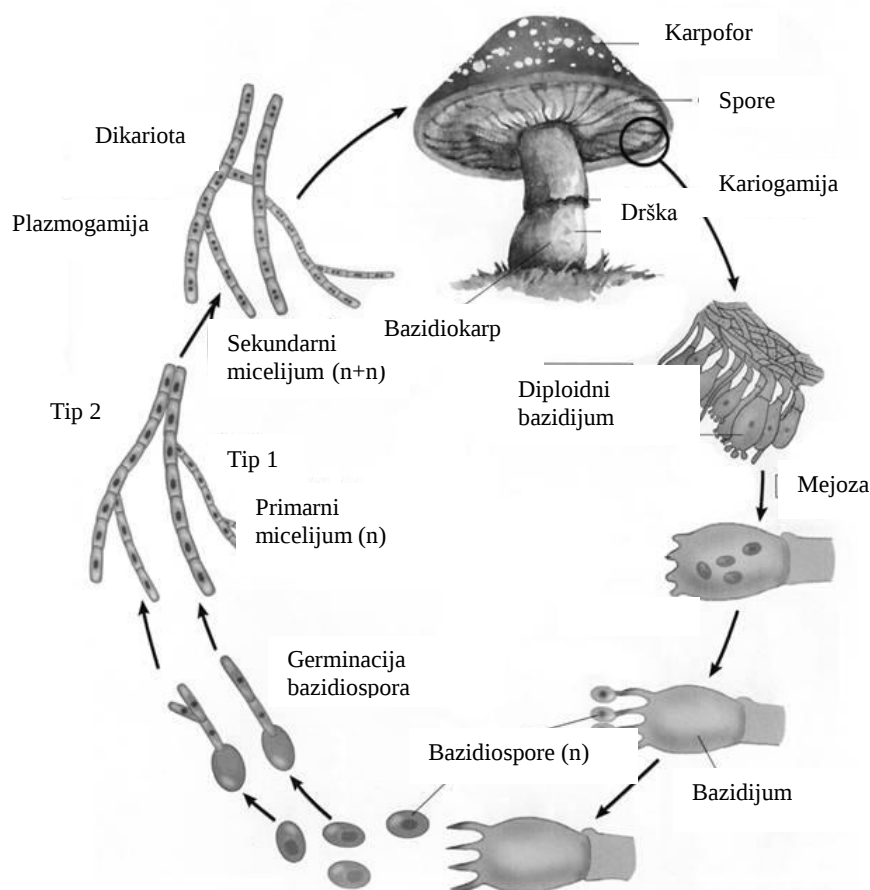
Gljive (carstvo Fungi) su raznovrsna grupa eukariota koja obuhvata veliki broj organizama međusobno različitih po građi i veličini. Uglavnom se pod gljivama podrazumevaju vrste sa filamentoznim hifama, ali u ovu grupu spadaju i kvasci, jednoćelijske gljive. Po građi, gljive se dele na niže - Syphomycota čije hife nisu septirane i više gljive - Septomycota čije hife su septirane, a u pitanju su hetetortrofni organizmi koji ne vrše fotosintezu. Mnoge su saprofiti, a neke su fakultativni paraziti biljaka i životinja, dok neke gljive formiraju simbiotsku vezu sa drugim organizmima, kao što su alge i lišajevi. Telo gljive sastoji se iz podzemnog vegetativnog dela (micelijuma) koga čini splet hifa i nadzemnog plodonosnog tela koji se sastoji iz šešira i drške. Filamentozne gljive nastaju ili iz fragmenata hifa ili sporulacijom u povoljnim uslovima (Stojanović i Nikšić, 2003). Hife gljiva rastu vrlo brzo, prorastaju supstrat formirajući vegetativni micelijum i apsorbujući nutrijente celom površinom. Ćelijski zid se sastoji od 80-90% polisaharida, ostatak su uglavnom lipidi i proteini. Uglavnom su polisaharidi sačinjeni od hitina, linearnog polimera n-acetilglukozamina povezanog β -1,4 vezama, jakog i fleksibilnog materijala (Kurtzman, 1997). Hife viših gljiva su septirane i ćelijske organele su tipične eukariotske - mitohondrije, ribozomi i vezikule. Takođe, imaju vakuole sa rezervnim glikogenom, lipidima i polimerima metafosfata (Moore, 1998). Nukleus je uglavnom nešto drugačiji u odnosu na druge eukariote. Iako su hife i spore gljiva normalno haploidne, osim prelaznih diploidnih stanja tokom seksualnog ciklusa, neke micelije mogu biti genetski heterogene i u tom slučaju, svaka hifa sadrži nukleus koji može da zaostane u različitim septama micelijuma ili mogu da se mešaju pa čak i da kombinuju genetski materijal u procesu sličnom mejozi. Gljive se uglavnom razmnožavaju sporama koje klijaju kada su uslovi u okruženju odgovarajući. Varijacije u izgledu plodonosnog tela i spora je specifičnost koja se koristi u identifikaciji gljiva (Vadim, 2006). Oko 100 000 vrsta gljiva podeljeno je u četiri

velike klase, prema tome gde i kako su generisane seksualne spore (Waiters i sar.,2001).

U klasu *Basidiomycetes*, za koje je karakteristično da stvaraju bazidiospore na bazidijama spadaju:

- a) lističavke, red *Agaricales*, himenofor im je u obliku listića obično radijalno raspoređenih sa donje strane šesira.
- b) rupičavke, red *Polyporales* kod kojih je himenofor u obliku tankih cevčica u kojima su smešteni bazidi.

Deo pečurke koji se koristi kao hrana je plodonosno telo koje se razvija iz hifa (Slika1). Drška je mesnati organ sastavljen od gusto isprepletanih paralelno slepljenih hifa, koje joj daju čvrstu građu. Dok je gljiva mlada, obod gljive je spojen sa drškom tankom opnom-velumom. Sazrevanjem velum prestaje da se uvećava i počinje da se cepa. Njegovi ostaci se zadržavaju na dršci u vidu prstenova. Šešir je mesnato tkivo izgrađeno od hifa, ali one nisu paralelno poredane. Boja, veličina i oblik se razlikuju od vrste do vrste. Sa donje strane šesira nalazi se himenijum u obliku listića ili rupica, koji služe za obrazovanje bazidija na kojima se nalaze spore. Himenijum-centralni spoljni sloj lamela je sporonosni sloj izgrađen od malih flašičastih ćelija bazidija. Sa vrha bazidija izrastaju 2-4 drščice-sterigme, na kojima se javljaju spore koje su u početku male i bezbojne, a kasnije najčešće postaju ružičaste do mrke boje. Spora ostaje na sterigmi dok ne sazri, a zatim se odvaja. Zrele spore su obično nepravilnog elipsoidnog oblika. Kad bazidiospora dospe na tlo pogodno za razvoj, isključujući fragmenti micelije postaju sve deblji, hife se isprepliću i nastaju takozvane anastomoze. Iz tako isprepletanih micelija preko stadijuma zrna, nastaje odrasla pečurka (karpofor) na kojoj se formiraju nove spore (Stojanović i Nikšić, 2003).



Slika 1. Životni ciklus bazidiomiceta.

<http://www.realmagick.com/basidiomycota-life-cycle/>

2.2. Industrijske gljive

Jestive gljive se gaje kao delikatesne namirnice, ali i u medicinske svrhe jer se njihove komponente koriste kao antitumorni i imunostimulatorni agensi (Stamets, 2000). Od gljiva iz razdela Basidiomycetes, 38% ukupne svetske proizvodnje čini proizvodnja *Agaricus bisporus*, zatim *Pleurotus ostreatus* 25%, *Volvariella volvacea* 16% i *Lentinus edodes* 10% svetske proizvodnje (Tabela 1). Proizvodnja gljiva je usmerena najvećim delom na lignikolne gljive koje rastu na celuloznom materijalu. Svetska proizvodnja najtraženijih gljiva *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea* i *Pleurotus spp.*, zatim *Auricularia spp* i

Flamulina velutipes čini oko 2.2 miliona tona (Erjavec i sar., 2001). Od toga je oko 5% ukupne proizvodnje na Tajvanu (Cahng i Hayes, 1978; Bano i Rajarathnam, 1988).

Tabela 1. Prikaz rasta proizvodnje jestivih gljiva (Chang, 1999, 2006; Delcaire, 1978; UN APCAEM)

Godina	Ukupna proizvodnja (x 1000 tona)	Kineska proizvodnja (x 1000 tona)	Učešće Kine u svetskoj proizvodnji (%)
1983.	1.453,0	174.5	12.0
1990.	3.763,0	1.083,0	28.8
1994.	4.909,3	2.640,0	53.8
1997.	6.158,4	3.918,0	63.6
2002.	12.250,0	8.650,0	70.6

Istorija kultivacije gljiva je veoma duga. Preko 2500 godina, gljive su gajene u Kini i na Dalekom istoku. U komercijalne svrhe, gajenje šampinjona je počelo u XVI veku u Parizu. Proizvodnja gljiva je značajno porasla u proteklih 50 godina. Trenutno, oko 20-30 komercijalnih sojeva se gaji u preko 60 zemalja širom sveta. Danas su Kina, U.S.A., Holandija, Poljska, Španija najveći proizvođači gljiva, naročito šampinjona. Oko 11.797 tona svežih gljiva i 4.099 tona konzervisanih gljiva uvezeno je širom sveta iz U.S.A., Francuske, Irske, Rusije tokom 2001-2002. godine. Lako se uzgajaju na kompostu koji se nakon plodonošenja prodaje kao đubrivo sa visokim sadržajem azota i drugih minerala (Erjavec i sar., 2001).

Hemijski sastav supstrata direktno utiče na hemijski sastav plodonosnog tela gljiva koje se na njemu razvijaju (Zadrazil, 1980; Neidleman i Laskin, 1995). Sadržaj proteina i amino kiselina je skoro duplo veći u gajenim nego u gljivama iz prirode. Generalno, suva masa plodonosnog tela gljive sadrži oko 39–88% ugljenih hidrata, 17–46% proteina, 2–9% masti i u ostatku pepeo i minerale (Ouzouni i sar. 2009). Dodatkom suplemenata u supstrat za rast gljiva može se poboljšati hemijski sastav plodonosnog tela, što je dokazano na gljivi *Pleurotus sp.* koja može da raste na

materijalima različitog sastava (Muthangya i sar., 2013). Takođe je dokazano udvostručenje koncentracije proteina u gljivama gajenim na semenu pamuka i slami (Gregori, 2007). *Pleurotus ostreatus* ima proteinski sastav sličan mleku i mesu. Sadržaj suve materije u gljivama vrlo je nizak, obično se kreće između 20-35% (Ouzouni i sar., 2009). Nizak sadržaj suve materije i masti rezultuje smanjenom energetsom vrednošću gljiva. Distribucija proteina u plodonosnom telu zavisi i od starosti gljive. Vetter i Rimoczi, 1993. su došli do zaključka da je najveći sadržaj ukupnih proteina kod gajene gljive *Pleurotus ostreatus* kada je prečnik šešira od 5–8cm. Koncentracija proteina je niža kod starijih gljiva. Smatra se da proteini pečuraka ipak imaju veći nutritivni značaj u odnosu na bilo koju biljnu vrstu (Stojanović i Nikšić, 2003). Sadržaj slobodnih amino kiselina u pečurkama je nizak i iznosi svega oko 1% suve materije, ali su značajne jer učestvuju u formiranju arome gljive. Glukoza, manitol i trehaloza su najčešći monosaharidi. Sadržaj manitola koji aktivno učestvuje u rastu i formiranju plodonosnog tela znatno varira u gljivama. Od vitamina, gljive sadrže dosta riboflavina, niacina i ergokalciferola (Kalač, 2009).

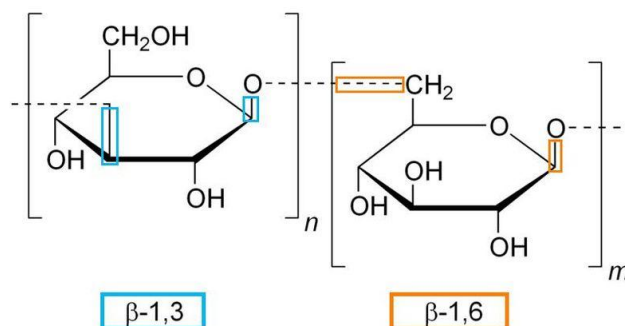
2.3. Gljive kao funkcionalna hrana

Sedamdesetih i osamdesetih godina prošlog veka, tri antitumorna agensa polisaharidne prirode izolovana su iz gljiva *Lentinus edodes*, *Schizophyllum commune* i *Coriolus versicolor*, što je od velikog značaja (Rop i sar., 2009). Ove gljive su poznate već hiljadama godina, a danas je poznato da njihove različite komponente pokazuju značajnu biološku i farmakološku aktivnost (Kalač, 2009). Bioaktivne komponente u gljivama mogu se podeliti u dve velike grupe- sekundarni metaboliti (masne kiseline, terpenoidi, polifenoli, seskviterpeni, alkaloidi, laktoni, steroli, nukleotidni analozi i vitamini) i gliko-proteini, proteini i visokomolekularni polisaharidi uključujući i proteoglikane (Kim i sar., 2009). Smatra se da su fenolna jedinjenja najefektniji antioksidansi u gljivama, dok je prema rezultatima istraživanja uloga tokoferola i likopena limitirana (Kalač, 2009). Polisaharidi, naročito β -glukani najpoznatija su bioaktivna jedinjenja, poseduju antitumornu i imunomodulatorsku aktivnost i već su našli primenu u kliničkim tretmanima. Smatra se da su polisaharidi

inhibitori rasta tumora (Rop i sar., 2009). Mehanizam antitumorne aktivnosti polisaharida, većine gljiva još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavka je da povećavaju ili izazivaju imunološke reakcije ćelije kroz aktiviranje sistema komplementa. Najveći broj medicinski značajnih gljiva pripada klasi Basidiomycetes: *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Cordyceps sinensis*, *Cordyceps sobolifera*, *Poria cocos*, *Tremella fulciformis*, *Auricularia auricula*, *Hericium erinaceus*, *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa* i *Flammulina velutipes* (Griensven, 2000). Članak o gljivi *Flammulina velutipes*, objavljen u časopisu 'Cancer Research' (1969), jedan je od prvih naučnih dokumenata u zapadnoj literaturi koji je izneo činjenicu da su jestive gljive efektne u suzbijanju tumora.

Biološki aktivni polisaharidi gljiva su najčešće linearni i razgranati glukani sa različitim tipovima glikozidnih veza, ali su neki od njih i heteropolisaharidi i sadrže glukuronsku kiselinu, ksilozu, galaktozu, manozu, arabinozu i ribozu (Wasser, 2002). Polisaharidi gljiva sa antitumornom aktivnošću veoma se razlikuju po svom hemijskom sastavu i konfiguraciji, kao i po fizičkim svojstvima. Antitumorna aktivnost je posledica prisustva različitih polimera glukana (Ooi i Lui, 1999). Razlika u biološkoj aktivnosti potiče od hidrofилnosti, veličine molekula, grananja i forme. Među bojnim biološki aktivnim glukanim gljiva, kako sa α - tako i β - glikozidnim vezama, najizraženija biološka aktivnost se odnosi na glukane ćelijskog zida gljiva (Mizuno i sar., 1995). Komercijalni značaj polisaharida gljiva najviše se ogleda sa stanovišta funkcionalne hrane (Synytsya i sar., 2009). Različitost glukana se povećava supstitucijom molekula šećera u bočnim lancima. Iako je moguć veliki broj kombinacija, u prirodi je zastupljeno svega nekoliko polimera glukoze. Njihova raznovrsnost se ogleda u različitosti veza glukopiranoznih jedinica rezultujući konformacijama α - ili β - anomera. Gljive sintetišu polimere β -glukan; β -1,3-D-glukane, β -1,4-D-glukane i β -1,6-D-glukane (Slika 2). Najčešće su to polimeri na čijem glavnom lancu dominiraju β -1,3; -1,4 ili oba tipa veze na koji se nadovezuju bočni lanci u kojima dominira β -1,6 glikozidna veza. Zavisno od porekla glukana, molekulске mase glukana se kreću od 5 do 2000 kDa (Synytsya i sar., 2009). Glukani bazidiomiceta rastvorni u vodi imaju dugotrajniji efekat na imuni sistem

sisara i bolje su prihvaćeni. Proteo-glukani su nerastvorni nakon delimične hidrolize i formiraju gel, tako da se za njih može reći da su delimično rastvorljivi molekuli.



Slika 2. Osnovna struktura β -glukana sa kombinacijom veza 1,3 i 1,6.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-glucan>

U ćelijskom zidu gljiva β -glukani se mogu naći u kompleksu sa hitinom. Glukani su razlog za korišćenje gljiva kao aditiva u proizvodnji namirnica i farmaceutskih preparata. Neke vrste bukovače (*Pleurotus* spp.) sadrže jedan od najpoznatijih izvora β -glukana koji se zove pleuran (Tabela 2). Najpoznatiji glukan gljive *L.edodes* je lentinan koji je po svom sastavu β -1,3 - glukan sa bočnim β -1,6 grananjem (Rop i sar., 2009). Delovanje β -glukana nije u potpunosti poznato, ali se pretpostavlja da se biološka aktivnost odnosi na njihovu interakciju sa specifičnim β -glukopiranoznim receptorima prisutnim na ćelijama imunog sistema – leukocitima, dentritičkim ćelijama, NK ćelijama prirodnim ubicama, makrofagama i drugim nakon čega se indukuje odgovarajuća reakcija (Ross i sar., 1987; Mueller i sar., 2000). Proučavanjem dejstva β -glukana na imuni sistem, došlo se do saznanja da β -1,3-glukan sa strukturom jednostrukog heliksa i hidrofilnim grupama ima najbolji efekat kod zaštite imunog sistema (Rop i sar., 2009). Najveća biološka aktivnost utvrđena je kod glukana sa stepenom grananja 0.2 do 0.33 (Bohn i BeMiller, 1995).

Tabela 2. Prosečan sadržaj β -glukana i procenat vodorastvornih i ne rastvornih frakcija gljiva *Lentinus edodes* i *Pleurotus spp.* (Manzi i Pizzoferrato, 2000)

Naziv gljive	Sadržaj ukupnih β -glukana (mg/100mg s.m.)	β -glukani rastvorni u vodi (mg/100mg)	β -glukani ne rastvorni u vodi (mg/100mg)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	38	37.8	62.2
<i>Pleurotus eryngii</i>	38	16.8	83.2
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	53	18.7	81.3
<i>Lentinus edodes</i>	22	46.1	53.9

s.m. – suva materija gljive

Molekulska masa β -glukana je takođe važan faktor za interakciju sa receptorima koji se nalaze na površini ćelija imunog sistema. Enzimi digestivnog trakta delimično inaktiviraju β -glukane intenzivnim oksidativnim delovanjem, ali veliki deo nepromenjenih molekula ipak zadržava svoju biološku aktivnost (Nono i sar., 1991; Rice i sar., 2005).

Pleuran i lentinan su trenutno β -glukani sa najširokom primenom usled pozitivnog efekta na intestinalni trakt. Pleuran redukuje broj konjugovanih diena u intestinumu, jetri i eritrocitima sa minimalnom aktivnošću antioksidativnih enzima. Takođe, dobro je poznat uticaj pleurana na redukciju lošeg holesterola u krvi (Bobek i sar., 1997). Oba imaju snažan inhibitorni efekat na produkciju nekih mikotoksina (Reverberi i sar., 2005; Rop i sar., 2009).

Proteini u gljivama sa biološkom aktivnošću mogu se upotrebiti u biotehnološkim procesima za sintezu novih lekova i uključuju lignocelulozne enzime, lektine, proteaze i proteaza inhibitore. Velika prednost proteina iz gljiva je njihova jedinstvenost jer se znatno razlikuju od biljnih, životinjskih i mikrobnih proteina. Ovi proteini su stabilni u širokom pH opsegu i imaju sigurnu primenu kod čoveka zbog dugogodišnje pozitivne prakse i dokazanog delovanja na ljude (Ngai i Ng, 2005). Dokazano je da proteini izolovani iz gljiva imaju antimikrobnu, antifungalnu i imunomodulatornu aktivnost, a koriste se i kao insekticidi (Erjavec i

sar., 2012). Najviše se zna o lignocelulitičkim enzimima koji uključuju lakazu, peroksidazu i druge oksidaze, celulaze i razne glikozidaze. Dva biotin-vezujuća proteina izolovana su iz gljive *Pleurotus cornucopiae*, sa izraženijom aktivnošću u odnosu na sve druge izvore (Duckova i sar., 1997). Sposobnost lignokolnih gljiva da rastu na drvenom materijalu potiče od sistema enzima koje poseduju i koji im omogućuje degradaciju i mineralizaciju biljne biomase – lignina, celuloze i hemiceluloze (Stojanović i Nikšić, 2003). Poslednjih godina se ulaže veliki napor u otkrivanje mogućnosti iskorišćenja ovih enzima. Velika prednost je mogućnost gajenja gljiva na čvrstom supstratu koji predstavlja industrijski otpad, otpad iz prirode i koristi se za rast i dobijanje enzima i bioaktivnih jedinjenja iz gljiva. U industriji hrane primenjuju se različiti enzimi mikroorganizama te se i proteinaze gljiva mogu koristiti kod proizvodnje sira i zgrušavanja mleka, lipaze se koriste za lipidnu modifikaciju i imaju primenu u pekarskoj industriji, lakaze se koriste u stabilizaciji voćnih sokova i vina uklanjanjem fenola koji uzrokuju dekolizaciju i gubitak arome proizvoda (Erjavec i sar., 2012).

2.4. Opšte karakteristike gljiva roda *Pleurotus*

Carstvo:	Fungi
Razdeo:	Basidiomycota
Klasa:	Agaricomycetes
Red:	Agaricales
Porodica:	Pleurotaceae
Rod:	<i>Pleurotus</i>

Rod *Pleurotus* uključuje preko 50 jestivih i medicinskih vrsta gljiva (Kim i sar., 2009) rasprostranjenih u raznim predelima širom sveta. Neke vrste se industrijski gaje i imaju veliki ekonomski značaj (*P. ostreatus*, *P. cornucopiae*, *P. eryngii*). Njihovo plodonosno telo je bogato ugljenim hidratima (28 - 50% suve mase gljive), jestivim vlaknima (3-50% suve mase), proteinima (10 - 30% suve mase) sa 25-35% esencijalnih amino kiselina računato na suhu masu i visokim sadržajem alanina,

glutaminskom kiselinom i glutaminom, vitaminima (C, A, B, D), mineralima (K, P, Mg, Na, Fe, Zn) i lipidima (3-5% suve mase). Odnos ovih komponenata je karakteristika svake vrste (Gunde-Cimerman i Cimerman, 1995; Stamets, 2000). U svetu su poznate pod nazivom "Oyster mushroom"- ostrigara zbog toga što šušir izgledom podseća na školjku. Vrste roda *Pleurotus* se popularno nazivaju bukovače jer se najčešće mogu naći kao saprofiti na bukovom drvetu i imaju mogućnost razgradnje drvene mase jer poseduju lignocelulitičke enzime. Lako se gaje bez većih finansijskih ulaganja. Nekad se javljaju kao paraziti i široko su rasprostranjene u raznim klimatskim područjima (Block i sar., 1958). *Pleurotus eryngii* se javlja u suptropskim predelima i stepama. Široko je rasprostranjena u predelu Južne Evrope, Centralne Azije i Severne Afrike. *Pleurotus sajor-caju* je tipičan za Himalaje. *Pleurotus flabellatus* je bela bukovača nađena u Indiji. *Pleurotus abalone* je tipična za Kinu (Neidleman i Laskin, 1995). Gljive roda *Pleurotus* imaju izuzetan komercijalni značaj, zajedno sa gljivama *L. edodes* i *A. bisporus*. Medicinska svojstva gljive *P.ostreatus* podrazumevaju antioksidativnu aktivnost, imunomodulatorni efekat, antitumornu aktivnost, antiviralni i antiinflamatorni potencijal kao i mogućnost smanjenja holesterola u krvi (Papasparydi i sar., 2010). One su potencijalni izvor lovastatina koji je zaslužan za navedena svojstva. *P. tuberregnum* se koristi u dermatologiji i prevenciji srčanih oboljenja, dijabetesa, visokog krvnog pritiska (Synytsya i sar., 2009; Stamets, 2000). Neke vrste bukovače imaju obojena plodonosna tela, boje žute (*Pleurotus cornucopiae*), ružičaste (*Pleurotus salmoneostramineus*), bele (*Pleurotus florida*). Iako je do danas objavljeno više radova o medicinskom značaju ovih gljiva, malo je informacija o fiziološkom efektu bukovača različitih boja. Dokazana su izražena antioksidativna svojstva obojenih bukovača, a najizraženija su kod žute bukovače (vezivanje slobodnih radikala, redukujuća aktivnost i sposobnost heliranja). Antioksidativno delovanje je dovedeno u vezu sa sadržajem fenolnih jedinjenja (Kozarski i sar.,2012). Nasuprot ovome, tamno siva i ružičasta bukovača bile su efektnije u inhibiranju HT-29 ćelija u poređenju sa žutom bukovačom (Kim i sar., 2009) čime se potvrđuje značaj obojenih bukovača u inhibiranju kolonalnog tumora i vezivanju slobodnih radikala.

Navodi se da *Pleurotus* vrsta sadrži oko 0.22-0.5 mg/100mg β -glukana računato na suhu masu gljive (Rop i sar., 2009). Razgranati molekuli β -glukani iz *P. tuber-regium* gljive i njihovi sulfati pokazuju relativno izraženu antitumornu aktivnost *in vivo* i *in vitro*, naročito na hepatoćelijske linije humanog tumora jetre. Takođe, glukani ove gljive pokazuju antiviralnu aktivnost na herpes simpleks virus (Zhang i sar., 2004). Vodorastvorni α -(1,6)-glukani dobijeni iz plodonosnog tela gljive *P. florida* imaju izraženu aktivaciju makrofaga (Ront i sar., 2005). Plodonosno telo gljiva *P. eryngii* i *P. ostreatus* sadrže razgranate β -1,3-1,6-glukane i linearne α -1,3-glukane kao glavne komponente ćelijskog zida. Primenom vodene i ekstrakcije u alkalnim rastvaračima dolazi do značajnog razdvajanja ovih frakcija. Neke od frakcija mogu se uspešno koristiti kao prebiotici (Synytsya i sar., 2009). *Pleurotus* vrste proizvode različite vrste lektina, glikoproteine koji mogu da aglutiniraju ćelije ili da precipitiraju glikokonjugate. Najviše su zastupljeni u šeširu plodonosnog tela, neki u micelijumu i igraju glavnu ulogu u razvoju gljive. Lektini su heterogena grupa proteina sa širokim spektrom molekulskih masa, ugljohidratnog sadržaja i amino kiselina. Neke vrste mogu imati više različitih lektina u sebi (Wang i sar., 2000). Vrste roda *Pleurotus* su poznat izvor dijetetskih vlakana koji predstavljaju skup nesvarljivih ugljenih hidrata sa dominantnim hitinom, hemicelulozom, mananom i glukonom (Rop i sar., 2009). Karboksimetilovani derivati pleurana izazivaju imunomodulatorni efekat uz stimulaciju aktivnosti fagocita (Paulik i sar., 1996). Razlika u hemijskom sastavu i bioaktivnosti jedinjenja u gljivi *Pleurotus* gajenoj na čvrstoj podlozi i submerzno potiče od razlike u stepenu razvijenosti gljive i faze životnog ciklusa bazidiomicete. Micelijum je vegetativna faza dok je plodonosno telo reproduktivna (Papasparydi i sar., 2010). Inhibitori proteaza gljiva se mogu koristiti kao ligandi u hromatografskim analizama za izolaciju i ispitivanje proteinaza različitih vrsta. Enzimi bazidiomiceta se mogu koristiti i za izolaciju enzima koji povećavaju svarljivost stočne hrane (Erjavec i sar., 2012).

2.4.1. *Pleurotus cornucopiae*

Pleurotus cornucopiae subsp. *citrinopileatus* (Singer) O. Hilber, 1993. je žuta bukovača je vrlo slična gljivi *P. citrinopileatus*. Singer, 1986. godine navodi da *P. cornucopiae* var. *cornucopiae* ima svetlo braon šešir. Petersen i Hughes (1993) navode da je kultura *P. citrinopileatus* iz Kine seksualno kompatibilna sa *P. cornucopiae* iz Evrope. *P. cornucopiae* je karakteristična za Evropu. Ovo je jedna od najčešće gajenih gljiva, preporučena od strane FAO u zemljama u razvoju, sa visokim sadržajem proteina, aminokiselina, dijetetskih vlakana, vitamina i polisaharida. *P. cornucopiae* ima preventivni efekat na oboljenja kao što su koronarna srčana,), hiperglikemijska, i druga (Fan-Yun i sar., 2010; Stamets, 2000



Slika 3. *Pleurotus cornucopiae*

2.4.2. *Pleurotus salmoneo-stramineus*

P. salmoneo-stramineus Vasil (Stamets, 2000) obuhvata kompleks intenzivno crvenih bukovača karakterističnih za pan-tropska klimatska područja. Ova gljiva brzo fruktifikuje i u stanju je da vrlo brzo proraste nepasterizovan stajnjak, čak pre kompetitora. Raste na različitom materijalu, ima toleranciju na visoke temperature. Iako je izraženo crvene boje, mogu se javiti albino klasteri. Njihova crvena boja je privremena, nekada se gubi sa starošću gljive (Redhead, 1993). Primordija je svetlo crvena, prelazi u ružičastu sa razvojem plodonosnog tela, do cimet-ružičaste boje i dobija boju slame kada je prerasla. Međutim, boja ne zavisi samo od starosti i soja gljive, takođe zavisi i od temperature okruženja. Najbolji supstrat za rast je čvrsto drvo uključujući palme, bambus i drugo. Micelijum je na početku sličan onom kod zlatne bukovače, miris je intenzivan. Nakon dužeg skladištenja, gljiva dobija miris rečne ribe. Nakon sušenja, gljiva ima prijatniju aromu. *P. salmoneostramineus* je vrlo privlačna tržištu zbog primamljive ružičaste boje (James i sar., 2004).

Smatra se da je nutritivni sastav ove vrste sličan onom kod *P. pulmonarius* koja raste na pšeničnoj slami bez ili sa dodatkom pamučnog praha, rezultujući u sadržaju proteina između 30 i 36%. Medicinska svojstva ružičaste bukovače nisu do sada poznata (Stamets, 2000).



Slika 4.. *Pleurotus salmoneostramineus*

2.4.3. *Pleurotus ostreatus*

Prototip bukovače, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Kummer, 1871. je dugo bio omiljena gljiva mikologa. Ove gljive rastu na različitom supstratu, dobro odolevaju temperaturnim varijacijama (Vicente i sar., 2006). *Pleurotus ostreatus* predstavlja kompleks brojnih varijeteta i sojeva. Šešir je bele, sivo-žute do sivo-brončane boje. Boja varira u zavisnosti od soja, svetlosti i temperature (Kim i sar., 2009). Šešir je pravilnog oblika ili izgleda školjke sa tankom drškom u nastavku. Aroma gljive je slatkasta, bogata i prijatna i podseća na badem. Gljiva proizvodi lovastatin, enzim A reduktazu, lek odobren od strane FDA 1987.godine za snižavanje nivoa holesterola u krvi (Alarcon i Aguila, 2006). Više lovastatina ima u šeširu nego u dršci gljive. *In vivo* ispitivanjima na miševima obolelih od Sarkoma 180, nakon mesec dana, 60% tumora je inhibirano sa 20% dnevne ishrane bukovačom (Ying, 1987). *P. ostreatus* poboljšava rad bubrega, jetre i reguliše gastrointestinalne poremećaje. Međutim, neretko se javlja alergija na spore koja je praćena temperaturom, glavoboljom, kijavicom, kašljem (Stamets, 2000; ENV/JM 2013).



Slika 5. *Pleurotus ostreatus*

2.5. Selen u gljivama

Poznato je da pečurke iz prirode mogu da akumuliraju visoke koncentracije metala ili metaloida i koriste se kao indikatori zagađenja okoline ili agensi za bioremedijaciju (Kalač, 2001; Vetter, 2004). Micelijum gljiva može da akumulira sve vrste elemenata uključujući i teške metale i u plodonosnom telu dostiže mnogo veće koncentracije nego što je slučaj u supstratu na kom se razvijaju. Preko komponenata ćelijskog zida, gljive imaju mogućnost vezivanja metala za funkcionalne grupe (fosfatne, amino, karboksilne) čime se elementi brzo prenose kroz ćelijsku membranu i cirkulišu kroz ceo micelijum (Campos i sar., 2009). Usvajanje i prisustvo teških metala u plodonosnom telu gljive zavisi od faktora okruženja i genetskih karakteristika vrste (Svoboda i sar., 2006). Supstrat određuje mobilnost i dostupnost metala, i u zavisnosti od toga određuje nutritivni sastav gljive koja raste na toj podlozi. Iako mnogi procesi nisu poznati, zna se da su biološki i ekološki faktori oni od kojih akumulacija metala prvenstveno zavisi (Kalač, 2009).

Izučavanje mogućnosti akumulacije i transformacije seleno u bazidiomicetama aktuelna je tema istraživanja, međutim varijacije u rezultatima ukazuju na to da čak i naizgled jednostavne kvantitativne ili kvalitativne analize zahtevaju vrlo specijalizovanu opremu i iskustvo (Dumont i sar., 2006). U biološkom materijalu, tokom sušenja i skladištenja, selen se ne menja, međutim postoji mogućnost isparavanja nekih jedinjenja, pa je analize potrebno raditi u toku samog rasta gljive u cilju praćenja metabolizma (Falandysz, 2008). Najveći broj do sada analiziranih vrsta gljiva ima prirodno nizak sadržaj seleno u plodonosnom telu ($<1 \mu\text{g Se/g}$ suvoj masi). Prosečan sadržaj seleno u bukovači koja raste u prirodi je $0\text{--}1.1 \mu\text{g Se/g}$. Plodonosno telo nekih gljiva je bogato selenom, ali se postavlja pitanje mogućnosti njihovog iskorišćenja u ishrani. Gljiva *Albatrellus pes-caprae* sa oko $200 \mu\text{g Se/g}$ suve mase je jedna od najbogatijih selenom (Stijve i sar., 1998). Do sada objavljeni rezultati istraživanja ukazuju na to da je selen u plodonosnom telu bazidiomiceta najvećim delom u obliku selenocisteina, selenometionina, selenometilselenocisteina, selenita i drugih neidentifikovanih jedinjenja (Falandysz, 2008). Takođe je utvrđeno da je slobodan selenometionin nestabilan na

temperaturama preko 85°C, dok je onaj vezan za proteine stabilan (Huerta i sar., 2006).

Prvi rezultati istraživanja mogućnosti akumulacije selen u višim gljivama počela su devedesetih godina. Do sada su rađena istraživanja na velikom broju jestivih i medicinskih gljiva (*Ganoderma lucidum*, *Pleurotus sp.*, *Lentinus edodes*, *Agaricus bisporus*, *Hericium erinaceum*). Analizom nakon proteolitičke digestije uzorka otkriveno je da oko 24% selen micelijuma čine molekuli preko 10 kDa, a manjih od 1 kDa ima i preko 60%, zbog čega se pretpostavlja da se selen najvećim delom nalazi u obliku niskomolekularnih proteina (Dabbour i Takruri, 2002). Takođe, u gljivama su detektovani i selenoaminošećeri što ukazuje na to da se selen velikim delom vezuje i za polisaharide. Prema tome, dodatno prisustvo selen u polisaharidima povećava i njihovu nutritivnu vrednost.

Gljiva *Agaricus bisporus* je gajena na supstratu sa dodatim selenom u vidu selenita i posebno u vidu kvasca obogaćenog selenom istih koncentracija 10 µgSe/g komposta. Rezultati su ukazali na bolju usvojivost selen iz organskog izvora, tj., iz kvasca (Dernovics i sar., 2002). Radionuklid fluorescentnom tehnikom na istoj vrsti gljive je dokazano da je apsorpcija selen u plodnosno telo gljive u direktnoj korelaciji sa koncentracijom selen u kompostu (Racz i sar., 2000; Pipponen i sar., 1984; Spolar i sar., 1999). Pozitivni rezultati gajenja gljive na supstratu sa selenom dokazani su i na primeru gljive *G. lucidum*, gajene na supstratu sa dodatkom neorganske soli odakle je usvojeno oko 20-30% selen u plodnosno telo (Zhao i sar., 2004). Od ukupno usvojenog selen, selenoproteina je bilo oko 56-61%, selenopolisaharida 11-18%, frakcija nukleinske kiseline 0.067-0.22% i drugih selenokomponentata 13.8-20%). U gljivi *G. lucidum* Se-Met je činio svega 8.2-18.3% od ukupno usvojenog selen u proteinima. Molekulska masa selenoproteina nije bila veća od 16 kDa. Rezultati ukazuju na to da niska koncentracija selen u supstratu (<100 µg/g) podstiče sintezu proteina i aminokiselina dok više koncentracije imaju obrnuto dejstvo. Takođe, jedinjenja selen su uglavnom bila rastvorna u vodenim i alkalnim rastvorima (Zhao i sar., 2008; Ming i sar., 2007). Huerta sa saradnicima je 2006. godine objavila da se oko 47-91% selen u gljivama *Macrolepiota procera*, *Lepista luscina* i *Boletus luridus* nalazi u vidu vodorastvornih jedinjenja malih

molekula, pri čemu je selenometionin glavni slobodni konstituent u ekstraktu gljiva. Gajenjem gljive *Pleurotus florida* na slami sa visokim sadržajem selena još jednom je potvrđena mogućnost usvajanja selena gde je ovako odgajana gljiva imala oko osamsto puta više selena u plodonosnom telu u poređenju sa kontrolnom gljivom (Bhatia i sar., 2013). Gljiva *P. ostreatus* gajena na zrnima kafe obogaćenim natrijum selenitom je usvojila najviše selena dodatkom 51 μg soli/g supstrata. Najveća koncentracija je pronađena u prvom fruktifikacionom talasu (Da Silva i sar., 2012). U vodenom ekstraktu gljive *Lentinus edodes* selen je nađen u obliku makromolekula iz kojih se oslobađa naknadnim enzimskim tretmanima (Ogra i sar., 2004). Ekstrakti sa povećanim sadržajem selena dobijeni iz micelijuma gljive *L. edodes* potvrđuju povećanu antioksidativnost, redukujuću aktivnost, mogućnost vezivanja DPPH radikala, što je posledica povećane koncentracije fenola i organskih seleno jedinjenja (Turlo i sar., 2010).

2.6. Fizičko-hemijska svojstva selena



Hemijski element selen (Se) izolovao je i identifikovao Berzelijus 1817. godine. Selen je polumetal, pripada VI grupi periodnog sistema elemenata i ima četiri valentna stanja (0, II, IV, VI). Poznato je šest prirodnih izotopa selena, u najvećoj meri ^{80}Se (50%) i ^{78}Se (23.5%). Hemijska svojstva selena su slična sumporu (Reilly, 2006). Po svojoj toksičnosti, ali i važnoj biološkoj funkciji poznat je već preko 40 godina. Relativna atomska masa selena je 78.96, temperatura topljenja 217°C , a temperatura ključanja oko 685°C i može dovesti do zagađenja atmosfere u slučaju sprovođenja industrijskih proizvodnih procesa koji podrazumevaju termički tretman selena ili njegovih jedinjenja (Crystal, 1973). Postoji nekoliko alotropskih formi selena, a tri najčešće su amorfna forma selena koja je tamno crvene boje i praškasta, kristalna forma selena koja je tamno crvena i najstabilnija kristalna forma selena metalno-crne boje (CCME, 2007). Selen je stabilan i nerastvoran element. U slučaju prevođenja

lako usvojivih jedinjenja selena u elementarni oblik, selen postaje nedostupan za biljke. Selen je mikronutrijent zastupljen u raznim namirnicama kao i u obliku dijetetskog suplementa. Neophodan je za pravilnu funkciju organizma, prisutan je u selenoproteinima važnim za reprodukciju, pravilnu funkciju tiroidne žlezde, sintezu DNK i zaštitu od oksidativnog oštećenja ćelija (Sunde, 2012). Selen postoji u neorganskoj i organskoj formi i obe se mogu uspešno koristiti u ishrani. U tkivu sisara većim delom egzistira u formi selenoaminokiselina koje grade selenoproteine. Iz tog razloga skeletni mišići sadrže 26-46% ukupnog selena (Terry i Diamond, 2012). Selenocistein i selenit redukuju se do selenida i prevode u selenofosfate koji učestvuju u biosintezi selenoproteina (Davis, 2012).

2.7. Selen u litosferi

Selen se u organizam može uneti kroz lanac ishrane zemljište-biljka-životinja-čovjek. To znači da je zapravo najvažniji sadržaj selena u zemljištu i da od toga zavisi dalji unos selena u organizam sisara. Apsorpcija selena u biljke zavisi od geoloških, geografskih i drugih faktora: kiselosti zemljišta, redoks potencijala, količine organskih materija u zemljištu, prisustva kompetitivnih jedinjenja poput sulfata, mikrobiološke aktivnosti, sastava zemljišta, temperature, navodnjavanja i drugih faktora (Rayman, 2008). Selen je najzastupljeniji u stenama, vulkanskom materijalu, morskom talogu i glečerskom nanosu u formi elementarnog selena (0), selenita (+4), selenata (+6), selenida (-2) i organskih jedinjenja (Nakamaru i sar., 2005). Biljke najlakše usvajaju selen u obliku selenata i selenita. Usvajanje selena može biti redukovano prisustvom organskih materija u zemljištu, ferohidroksida i minerala gline koji mogu da apsorbuju selen. Čak i zemljište bogato selenom može da dá biljku sa niskim sadržajem selena ako nije u formi koju biljka može da usvoji (Saritha i Kummar, 2001; Seby i sar., 1997). Koncentracija selena uglavnom raste sa dubinom zemljišta i bliznom mora (Mayland i sar., 1989). Vertikalna distribucija selena u jezernim vodama, u pozitivnoj korelaciji je sa rastom algi. Takođe se navodi i prisustvo selena u otpadnim i vodama za navodnjavanje. U rečnim vodama selen se može naći u koncentracijama većim od 0.200 mg/kg (Diaz i

sar., 1996). Veći sadržaj selena javlja se u alkalnim vodama u vulkanskoj oblasti zbog korelacije sadržaja selena u vodi i u stenama i zemljištu (Tan i sar., 2002). Podaci iz 90-tih godina ukazuju na to da se koncentracija selena u vodama kreće oko 0.350 mg/l u Belgiji, 1.1-3.3 mg/L u Engleskoj, 0.440 mg/L u Izraelu, 0.120 mg/L u Nemačkoj, 0.120 mg/l u Holandiji, 0.200 mg/L u Nju Jorku. Podaci iz 1990. godine ukazuju na sadržaj selena u zemljištu Srbije ispod proseka, oko 0.2 mg/kg (Čuvarđić, 2003), a u Hrvatskoj 0.02 - 0.048 mg/kg (Klepec i sar., 1998). Predeli sa dosta atmosferskih padavina su usled ispiranja zemljišta obično sa niskim sadržajem selena (0,1-2 mg/kg). Sušni i polusušni predeli imaju visok sadržaj selena u zemljištu, i do 1200 mg/kg (Fan-Yun i sar., 2010). Biljke koje rastu na takvom zemljištu uglavnom su bogate selenom pa njihovo korišćenje može dovesti do trovanja prekomernim unosom selena. Nizak sadržaj selena u rečnim vodama ukazuje na bezbednost i nemogućnost bilo kakvog rizika od trovanja selenom konzumiranjem ribe (Diaz i sar., 1996).

2.8. Selen u ishrani

Povećani interes za selenom kao mikronutrijentom javio se publikacijom rezultata do kojih je došao Rayman, 2008. godine. Rezultati su ukazali na moguću hemoprevenciju povećanim unosom selena. Predložena RDA vrednost (Tabela 3) odraslog zdravog čoveka je 55 µg Se/dan (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000).

Tabela 3. Preporučeni dnevni unos selena (RDA) -Food and Nutrition Board, 2000.

Starost	Muškarci i žene	Trudnice	Dojilje
<i>Novorođenče do 6 meseci starosti</i>	15 µg		
<i>7meseci-3godine</i>	20 µg		
<i>4-8 godina</i>	30 µg		
<i>9-13 godina</i>	40 µg		
<i>Stariji od 14 godina</i>	55 µg	60 µg	70 µg

Granica tolerancije za odraslog čoveka je 400 µg/dan. Autori Behne i saradnici (2010) su pratili zdravstveno stanje pacijenata koji žive na teritoriji osiromašenoj selenom. Ishranom obogaćenom selenom, u vidu selenskog kvasca i/ili selenometionina, u periodu od više godina dokazana je značajna korelacija između koncentracije selena u mišićima i krvi, crvenim krvnim zrnima, krvnoj plazmi, vlasima kose i noktima.

U današnje vreme, dobro opremljene laboratorije i precizna oprema omogućuju detaljnu analizu hemijskog sastava hrane, što omogućava pregled sastava namirnica i uključuje selen. Najvažniji izvor selena jesu meso (67.8%), cerealijske namirnice (22.6%), riba bogata proteinima u odnosu na nizak sadržaj u voću i povrću (0.3-9.3%) (Tabela 4). Zahvaljujući dostupnim informacijama o selenu u namirnicama, moguća je korekcija deficita u ishrani. Najčešće su vršena ispitivanja u USA, Finskoj, Novom Zelandu i Kini. Istraživanja su naročito od interesa u zemljama gde je postojala opasnost od trovanja usled selenozisa (trovanja prekomernim unosom selena) ili pojave Kešanske bolesti usled nedovoljnog unosa ovog mikronutrijenta (Reilly, 2006). U oblastima Kine u kojima se javlja Kešansko oboljenje, unos selena je svega oko 7 µg /dan. U drugim delovima Kine, unos je znatno niži u odnosu na Koreju (58 µg /dan), Holandiju (72 µg /dan), Sloveniju (87 µg /dan), Hrvatsku (27.3 µg /dan), Kanadu (150 µg /dan), Grčku (39 µg /dan) (Gao i sar., 2011). SCF (2000) izveštava da je prosečan unos selena kod odraslih u Evropi, ne-vegetarijanaca 24-110 µg/dan.

Istraživanja rađena u Hrvatskoj ukazuju na veliku različitost u unosu selena kod ispitanika starosti 18-30 godina i ispitanika starosti 41-53 godina. Kod starijih ispitanika, primećena je slabija biološka usvojivost selena, mada najveći broj autora potvrđuju ovu tvrdnju kod ispitanika starosti iznad 60 godina (Klepčević i sar., 1998).

Takođe, primećena je razlika u unosu selena između ženskih i muških ispitanika. Muškarci su imali veći nivo selena u organizmu, pretpostavlja se zbog skoro duplo većeg unosa mesa u odnosu na žene. Rezultati istraživanja takođe ukazuju na veliku različitost u unosu selena kod dece koja žive u različitim delovima Evrope (Morris i Levander, 1970) i koja su različite starosti sa velikim porastom

unosa selena kod mlađe dece, u odnosu na prosečno preporučeni dnevni unos po kg telesne mase (EFSA, 2010). Zemlje sa najvećim vrednostima su Nemačka i Finska.

Tabela 4. Sadržaj selena u odabranim namirnicama (USDA, 2012)

Namirnica	µg	% *
Brazilski orah (6–8 oraha)	544	777
Tuna, 3 komada	92	131
Sardina u ulju, 3 komada	45	64
Šunka, 3 komada	42	60
Rakovi u konzervi, 3 parčeta	40	57
Makaroni kuvani, 1 čaša	37	53
Junetina, 3 komada	33	47
Ćureće meso, 3 komada	31	44
Pržena jetra govečeta, 3 parčeta	28	40
Pileća prsa, 3 parčeta	22	31
Cottage sir, 1% mlečne masti, 1 šolja	20	29
Integralni pirinač, 1 šolja	19	27
Tvrdo kuvano jaje, 1 veliko	15	21
Musli, 1 činija	15	21
Pasulj, 1 šolja	13	19
Spanać, 1 šolja	11	16
Mleko, 1% masti, 1 šolja	8	11
Jogurt, nisko masni, 1 šolja	8	11
Sočivo, 1 šolja	6	9
Beli hleb, 1 parče	6	9
Banane, 1 šolja	2	3
Krompir, 1 krompir	1	1
Breskva, 1 šolja	1	1
Sirova šargarepa, 1 šolja	0	0
Zelena salata, 1 šolja	0	0

*Dnevni unos

Rezultati su dobijeni istraživanjima na deci sa sličnom dijetetikom - cerealijske, povrće, sveže meso, mleko i kretali su se između 1.2 µg/kg-2.0 µg/kg na dan (10-godišnje dete) i 4.1 µg/kg-6.5 µg/kg na dan (1-godišnje dete).

Jedan od potencijalnih izvora selena u ishrani jesu animalni proizvodi sa povećanim sadržajem selena (Tabela 5). No, da bi se dobio ovakav proizvod potrebno je da se najpre odgaji biljka sa selenom koja zatim služi za ishranu životinja što je dugotrajan i skup proces (EFSA, 2010).

Tabela 5. Prosečan unos selena u Srbiji unošenjem namirnica animalnog porekla
(Pavlović i sar., 2013.)

Vrsta proizvoda	Koncentracija selena	Opseg	Dnevni unos proizvoda	Dnevni unos selena, µg
Mleko	12.1 µg/L	<5-16	0.49 L ¹	5.9
Svinjetina	112.7 µg/kg*	79-189	83.1 g ²	9.4
Junetina	95.7 µg/kg*	44-163	17.8 g ²	1.7
Piletina	121.7 µg/kg*	89-145	65.7 g ²	8.0
Jaja	186.1 µg/kg*	138-247	36 g	6.7

1- Računato na mleko i mlečne proizvode; 2- Računato na svežu, zamrznutu i prerađenu namirnicu; * Računato na svežu masu

Prema navedenim rezultatima istraživanja, svet se suočava sa potencijalnom opasnošću od pojave oboljenja izazvanim nedovoljnim unosom selena. Selen zauzima mesto sumpora u selenometioninu, selenocisteinu zbog fizičko-hemijske sličnosti ova dva hemijska elementa (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000). Ovakve selenoproteine životinje i ljudi lako mogu da usvajaju. Postoji značajna razlika u usvojivosti i zadržavanju selena u organizmu unosom selena iz selenometionina, selenita ili selenata. Apsorpcija selena u vidu selenoaminokiseline je preko 95%, kao i selena iz neorganske forme. Selenometionin se apsorbuje aktivnim transportnim sistemom kao i metionin, dok se neorganski selen usvaja pasivnim procesom (Suzuki, 2005). Neorganski selen se apsorbuje brzo, ali se brzo i

izlučuje iz organizma, nasuprot selenometioninu koji se zadržava u organizmu. Međutim, poredeći aktivnost glutathion peroksidaze unosom selen u neorganskom i organskom obliku, zapaženo je da se aktivnost glutathion peroksidaze ne menja. Takođe, koncentracija selenoproteina P ostaje nepromenjena. Jedina prednost unosa selen u vidu aminokiseline je bezbedan proizvod i dugo zadržavanje u organizmu (Thomson, 1998).

Iako se u brazilskom orahu često nalazi velika količina selen (0–512 µg/g), on može da sadrži i dosta radijuma i barijuma. Stoga je konzumiranjem oraha u cilju zadovoljavanja dnevnih potreba za selenom, moguć unos visoke koncentracije ova dva elementa (Rayman, 2008). Sadržaj selen u namirnicama koje su prerađene zavisi velikim delom od tretmana obrade, Veliki deo selen (40-80%) može se izgubiti u vidu isparljivog selen tokom termičke obrade (Morris i Levander, 1970). Takođe je vrlo važno koji se deo biljke ili gljive koristi u ishrani zbog različite raspodele selen u njima (Latifah i sar., 1996; Thomet i sar., 1999).

2.9. Biološka uloga selen

Selen je esencijalni mikronutrijent, važan sastavni deo enzima glutathion peroksidaze koji kao antioksidans štiti ćeliju od oksidativnog oštećenja (Levander i Burk, 1994; Tapiero i sar., 2003). Interesovanje za selenom znatno je poraslo od momenta otkrića značaja ovog mikronutrijenta u prevenciji oboljenja kao što su tumor, kardiovaskularna oboljenja, ciroza jetre, dijabetes, zaštita ćelija od delovanja slobodnih radikala, redoks regulacija, smanjenje steriliteta kod muškaraca i regulacija funkcije štitne žlezde (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000). Selen stimuliše metabolizam glukoze i reguliše glikolizu, sintezu masnih kiselina i pentoznofosfatni put (Zeng i Combos, 2008).

Prvi otkriven poremećaj nedovoljnog unosa selen i vitamina E u organizam sisara jeste nekroza jetre koja je dokazana na laboratorijskim životinjama - svinjama i miševima. Sistem selen i vitamina E štiti lipofilne membrane i rastvorne frakcije od reaktivnih slobodnih radikala (Arthur i sar., 1993). Kod čoveka, nedostatak selen se uglavnom dovodi u vezu sa kardiomiopatskom Kešanskom bolešću koja je

učestala kod stanovnika Kine. Usledilo je otkriće da je selen sastavni deo glutathion peroksidaze koja je delimično odgovorna za prateće posledice nedostatka selena u organizmu. Kasnije je otkrivena uloga selena u očuvanju pravilne funkcije tiroidne žlezde, naročito kao aktivnog centra enzima jodotironin dejodinaze koji prevodi inaktivan T4 u T3 aktivni hormon (Hathcock, 2004; Alaejos i sar., 2000). Novi selenoenzim, tioredoksin reduktaza, katalizuje redukciju insulina u prisustvu tioredoksina. Selenoprotein P je uključen u proteinski transport i značajan je u suzbijanju delovanja slobodnih radikala. Selenoprotein W je izolovan iz mišićne mase pacova, ali njegova funkcija je nepoznata (Tapiero i sar., 2003). Nedovoljan unos selena dovodi do poremećaja u organizmu uz pojavu oboljenja, naročito kod populacije sa oslabljenim imunitetom, dodatno izložene stresu.

2.9.1. Selenoproteini

Biološka funkcija selena uglavnom se dovodi u vezu sa selenoproteinima koji su uključeni u mnoge puteve, npr. redoks regulaciju i odgovor na oksidativni stres, regulaciju aktivnosti štitne žlezde i druge. Niz podataka ukazuje na regulaciju inflamatornih procesa aktivnošću glutathion peroksidaze i selenoproteina S. (Meplan i Hesketh, 2012; Thomson, 1998; Zeng i sar., 2013). Samo 25 selenoproteinskih gena identifikovani su u ljudskom genomu, ali funkcije mnogih do danas nisu poznate. Selenoproteini čija funkcija je poznata svrstavaju se u pet grupa glutathion peroksidaza (ćelijska ili klasična, ekstracelularna ili plazmidna, fosfolipidna hidroperoksid glutathion peroksidaza, gastrointestinalna i olfaktorna glutathion peroksidaza), selenoprotein P sa više formi, selenoprotein W, jodotironin dejodinaza, tioredoksin reduktaza, selenoprotein spermalne mitohondrije i drugi (Himeno i sar., 1996). Od trenutka otkrivanja, glutathion peroksidaza je korišćena za proveru statusa selena u ishrani stanovništva širom planete (Thomson, 1998). Plazma glutathion peroksidaza, selenoprotein P, jodotironin dejodinaze tip I (DI-I) i tioredoksin reduktaze (TR) okarakterisani su u organizmima životinja i ljudi. Za većinu selenoproteina utvrđeno je da imaju antioksidativnu funkciju. Povećan rizik od oboljenja u vezi je sa deficitom selena, a može da se dovede i u vezu sa

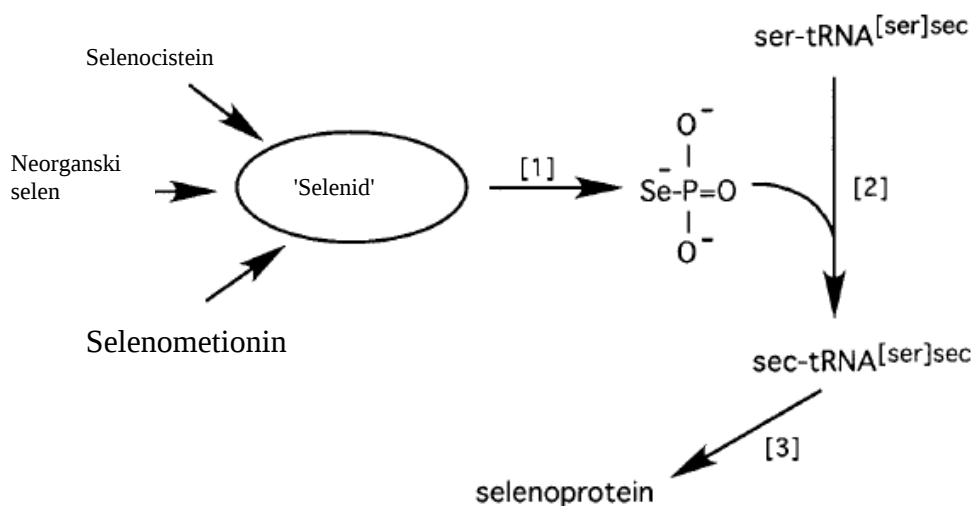
povećanim oksidativnim stresom i promenama u redoks potencijalu. Grupa I (GPx grupa) je najzastupljenija i uključuje protein sa SeCys lociranim na N-terminalnom kraju relativno kratkog lanca, 80-250 aminokiselinskih ostataka. Druga grupa (TR grupa) je karakteristična za prisustvo SeCys u C-terminalnim sekvencama, sastoji se od tri dejodinazna izozima, selenoproteina R, selenoproteina N, selenoproteina S2 i 15 kDa selenoproteina. Sinteza svih selenoproteina zavisi od dnevnog unosa selen (Meplan i Hesketh, 2012).

2.9.2. Biosinteza selenoproteina kod eukariota

Mikroorganizmi su vrlo pogodni za proučavanje metabolizma selen i sumpora. Interakcije uključuju konkurenciju između sumpora i selen, povezanost metabolizma metionina i cisteina i njihovih selenoaminokiselina, oksido-redukcijske puteve i nastajanje dimetil-selenida (Slika 6).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na visok nivo, pre svega selenometionina kao selenoaminokiseline u eukariotama. Biosinteza selenoproteina kod eukariota još uvek nije potpuno jasna, ali se pretpostavlja da je dosta slična sintezi kod prokariota, sa izvesnim razlikama. Sinteza selenoproteina je kotranslacioni put, sa SeCys UGA kodonom. UGA kodon odgovoran za inserciju SeCys je do ovog momenta bio poznat kao stop kodon. Zna se da je ovako dualna priroda kodona neuobičajena. AUG kodon takodje kodira inserciju metionina na unutrašnje pozicije u proteinu (Grunder-Culemann i sar., 2001). Prepoznavanje UGA kao selenoprotein kodona zavisi od sekundarne strukture iRNK (Birringer i sar., 2002), npr., veze zvane SECIS (insertujuća sekvencija za SeCys). Pravilna translacija zahteva proteine koji prepoznaju SECIS, kod eukariota zvane SBP-2 (protein za vezivanje SECIS). SBP-2 se ponaša kao elongacioni faktor u vezivanju tRNK [Ser]Sec i usmeravanju ka A-poziciji ribozoma (Berry i sar., 2001; Hesketh and Villette, 2002). Prvi korak u sintezi jeste aminoacilacija amniokiseline serina enzimom serin sintetazom u cilju proizvodnje tRNK [Ser]Sec (Leinfelder i sar., 1990). Konverzija se vrši aktivnošću piridoksal fosfat zavisnog enzima SeCys sintetaze koja menja tRNK [Ser]Sec u Sec-tRNKSec pomoću intermedijarne komponente aminoakrilil-tRNKSec. Ovaj

intermedijator služi kao akceptor za aktiviranje selena. Donor u ovoj reakciji za prokariote i eukariote je monoselenofosfat koji se sintetishe iz selena u svojoj redukovanoj formi selenida. Selenid se pridružuje aminoakril intermedijatu pod uticajem selenofosfatne sintetaze. Reakcija uključuje hidrolizu ATP u prisustvu magnezijumovih jona (Reilly, 2006).

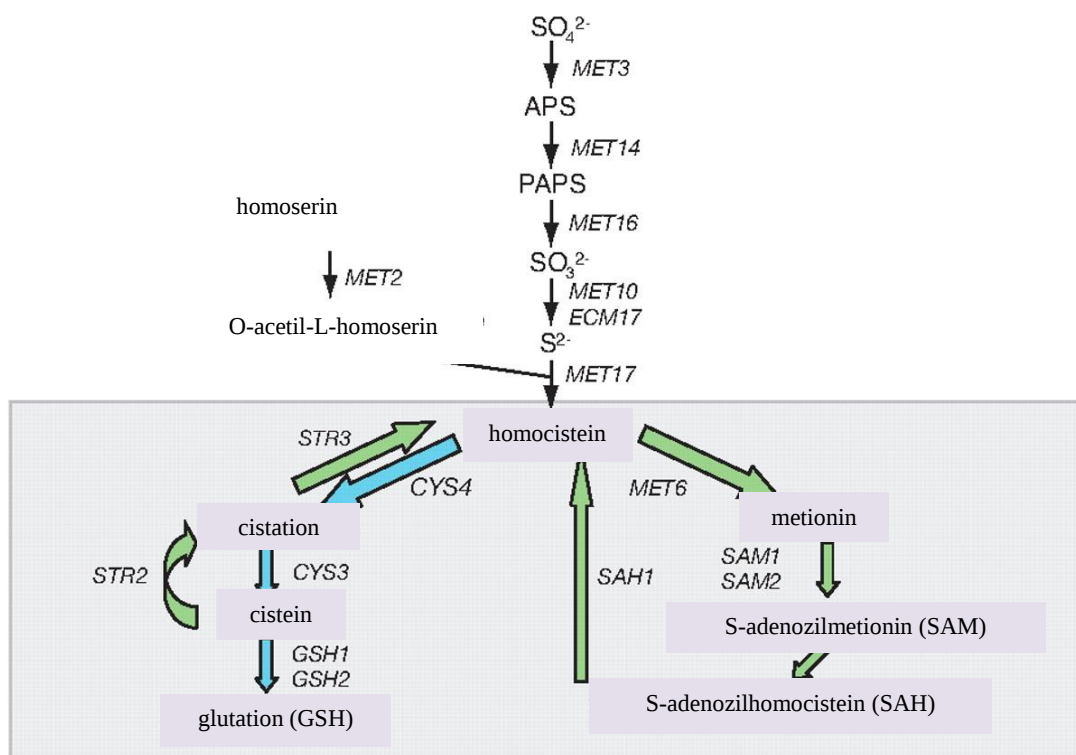


Slika 6. Sinteza selenoproteina (Morris i Levander, 1970).

Međutim, Birringer i saradnici (2002) ukazuju na to da kod kvasca nije detektovan mehanizam koji omogućuje specifičnu inkorporaciju SeCys u proteine. Kompletan genom kvasca ne sadrži insertujuće sekvence potrebne za biosintezu selenoproteina. Generalno, metabolizam nižih gljiva i viših biljaka ne pravi razliku između sumpora i selena i mehanizam predložen za druge eukartote nesumnjivo nije prisutan kod njih.

Dijagram metabolizma sumpora u gljivama prikazan je na slici 7. Homocistein se nalazi na poziciji između dve grane puta. GSH grana se odnosi na biosintezu cisteina i GSH, a *Sam* grana se odnosi na biosintezu metionina i S-adenozilmetionina. Nekoliko metabolita se javlja periodično, a to su cistation, S-adenozilhomocistein i glutation (Tu i sar., 2007). Brojne studije poredile su metionin i selenometionin kao supstrat za enzime. Pre nego što udje u proces transmetilacije,

metionin se aktivira u reakciji sa ATP-om pri čemu daje S-adenozil metionin (Bremer and Natori, 1960). Se-adenozil metionin brže prenosi metil grupu. Sumpor u aminokiselinama se supstituiše sa selenom dajući selenometionin i selenocistein. Iz jetre pacova izolovana je cistation- β -sintetaza i cistation- γ -liaza. Ova dva enzima inkubacijom sa selenohomocisteinom i serinom katalizuju stvaranje selenocistationa, α -ketobutarata i amonijaka. Stoga, put sinteze selenoaminokiselina sličan je sintezi aminokiselina sa sumporom, ali nije identičan.

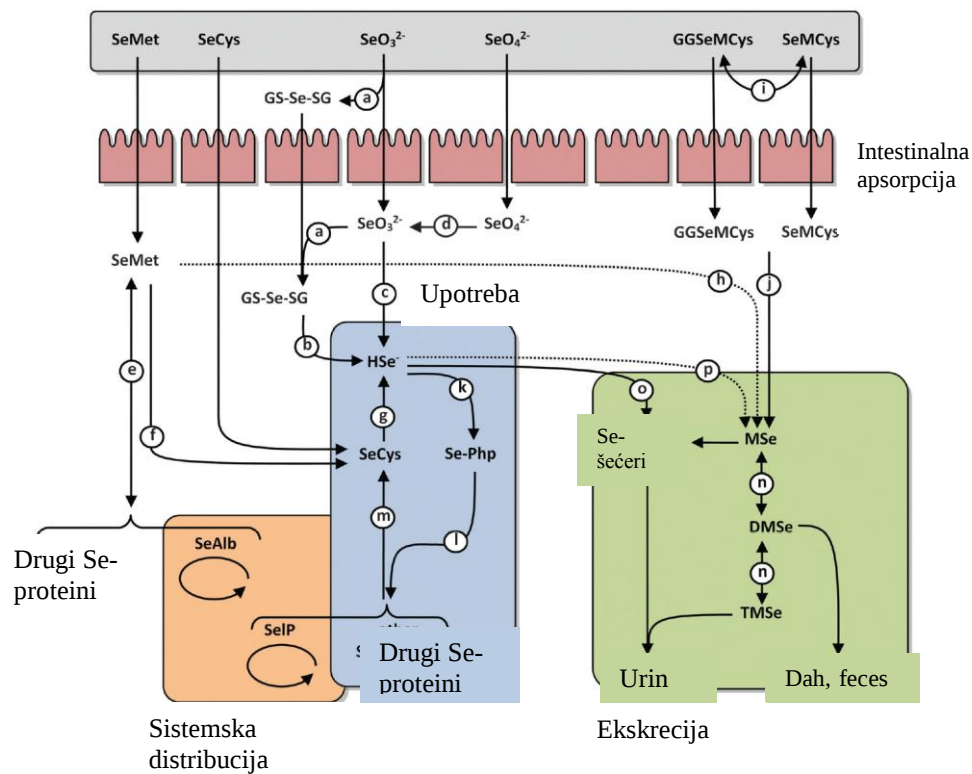


Slika 7. Metabolizam sumpora u gljivama (Tu i sar., 2007)

Selenohomocistein može nastati *in vivo* metabolizmom selenometionina, koji se kao primarni oblik nalazi u biljkama. Verovatno nastaje i reakcijom metionina sa selenoalkil ili selenoaril grupom koja je katalizovana L-metionin- γ -liazom (Esaki i sar., 1979).

2.9.3. Metabolizam selena kod sisara

Selen se apsorbira preko gastrointestinalnog sistema u različitim oblicima. Raspodjela u organizmu zavisi od oblika u kome se nalazi i količine elementa koji je unet (Reilly, 2006). Biosinteza selenoproteina zavisi od dostupnog oblika selena (Slika 8).



Slika 8. Metabolizam selena kod sisara (Roman i sar., 2014).

Svi selenoproteini sisara sadrže selen u formi aminokiseline selenocisteina (SeCys), koja je dekodirana UGA kodonom. Do sada nije poznato da li selen dolazi na mesto sumpora pre ili nakon inkorporiranja u selenoprotein. Poznato je da selenoaminokiseline (selenocistein i selenometionin) sadrže selen na mestu sumpora. Za čoveka je jedino L oblik SeMet efikasan (EFSA, 2009). U selenoproteinima selenocistein se nalazi na aktivnom mestu enzima, koji reverzibilno menja redoks stanje tokom katalize. Do sada su rezultati proučavanja metabolizma selena

uglavnom zasnovani na *in vitro* testovima i redje *in vivo*. Sinteza ovih proteina uključuje aminokiseline koje sadrže sumpor i elementarni selen, koji se spajaju preko intermedijera, selenofosfata, u selenocistein. Postoje dve forme tRNK[Ser]SeCys, koje su esencijalne za sintezu svih selenoproteina, izoforme učesnici sinteze SeCys i adotori molekula koji prepoznaju UGA kodone u iRNK selenoproteina. U procesu inkorporiranja selen u selenoproteine, univerzalna tRNK za selenocistein-tRNKSeCys se dovodi u vezu sa L-serinom, a zatim se prevodi sintetazom u selenocistein. tRNKSeCys prepoznaje specifičan UGA kodon u iRNK da bi insertovala selenocistein u primarnu strukturu selenoproteina (Rayman, 2008; Roman i sar., 2014).

Različita organska i neorganska jedinjenja su izvor selen u ishrani i deo su sinteze zajedničkog intermedijera koji se zatim uključuje u sintezu SeCys-tRNK. Iako se selenid javlja kao zajednički intermedijer za sva jedinjenja selen, on ne mora da postoji u slobodnoj formi. Iz tog razloga, intermedijer može biti i neki ekvivalent selenidu (Suzuki, 2005).

a. Transformacija neorganskih jedinjenja u selenid

Selenit se odmah prevodi u selenid aktivnošću GSH, za razliku od selenata koji se ne prevodi direktno. Seleno jone u solima i njihovu transformaciju prate bikarbonati i fosfati zbog sličnosti. Selenit direktno uzimaju cvena krvna zrnca bez ekskrecije u urin, dok se selenat koji uzimaju hepatociti, kroz transportni sistem za fosfate delimično ekskretuje u urin. Seleno soli transformisane u selenid ulaze u krvotok i u formi selen a vezanog za albumin transportuju do jetre. Iz ovoga se može zaključiti da se neorganske soli drugačije prenose do jetre i sintetišu u selenoproteine i GPx (Suzuki, 2005).

b. Transformacija organskih jedinjenja u selenid

Za razliku od neorganskih soli, organska jedinjenja se prevode u selenid kroz sofisticiranije puteve. Organska jedinjenja mogu da se oksiduju do selenita i selenata.

Selenometionin unešen hranom može se kao i metionin skladištiti nepromenjen ili razgraditi pomoću selenocistein β -liaze čime se dobija slobodan selen. Slobodan selen se obično bez učešća enzima redukuje u selenid koji se može izlučiti urinom ili pomoću selenofosfat sintetaze pretvoriti u selenofosfat (Grooper i sar., 2009).

Takodje, veruje se da je drugi put prevodjenja selenometionina u selenocistein, trans-selenovani put:

SeMet → Se-adenozilSeMet → Se-adenozilselenohomocistein → Se-homocistein → Se-cistation → SeCys

Štitna žlezda, mozak, crvena krvna zrnca, slezina, nokti i kosa sadrže dosta selena (Dumonet i sar., 2006). Srce, bubrezi, pluća, jetra, gušterača i mišići sadrže takodje visoke količine selena u obliku glutathiona. Jetra je glavno mesto za taloženje redukovanog glutathiona. Selen se iz organizma izlučuje fecesom i urinom, 50-60% (Roman i sar., 2014). Glavni urinarni metaboliti selena su metil-seleno-N-acetil-D-galaktozamin, metilselenol, dimetilselenid i trimetilselenid, a fecesa neapsorbovani selen (Chasteen i Bentley, 2002). Selen se takodje izlučuje kroz kožu i pluća zbog čega se trovanje može registrovati zadahom na beli luk (Suzuki, 2005). U 19. veku, u istraživanjima radjenim na životinjama, neprijatan miris na beli luk kod selenozisa pripisivao se selenidu ili teluridu. Tek dosta kasnije, utvrđeno je da ovaj miris dolazi od dimetilselenida (Chasteen, 2003).

2.9.4. Selenoprotein P

Selenoprotein P (Sel-P) je glavni selenoprotein krvne plazme. Njegova koncentracija u plazmi čoveka je oko 5 $\mu\text{g/mL}$, a vreme poluživota Sel-P je relativno kratko, 3–4 h (Burk i Hill, 1994). Sel-P se vezuje za ćelije vaskularnog endotela, u različitim tkivima kao što su arterijske endotelne ćelije i hepatične sinusoidne endotelne ćelije. Selenoprotein P-iRNK detektovana je u jetri sisara, bubrezima srcu i plućima (Roman i sar., 2014). Sel-P je jedini detektovan kod sisara sa Se-Cys

ostacima i nivo selena manje utiče na aktivnost ovih proteina nego GSH-Px1. Utvrđeno je da sadrže ugljene hidrate (Gromadzinska i sar., 2008). Smatra se da Sel-P služi kao antioksidans i služi za transport selena putem krvi od jetre u druga tkiva i drugih selenoproteina. Zato se smatra skladištem selena (Meplan i Hesketh, 2012).

2.9.5. Selenoprotein W i R

Selenoprotein W ima malu molekulsku masu selenoproteina (87 aminokiselina) sa jednim Se-Cys ostatkom i postoji u 4 oblika (Burk i Hill, 1994). Jedna izoforma GSH vezana je za specifičan ostatak cisteina, ukazujući na to da Sel-W možda ima redoks funkciju. Usled hemijske sličnosti sumpora i selena, selen je ekstremno efikasan katalizator reakcija između sumpora i kiseonika (Hawkes i Alkan, 2010). Sel-W je skeletni, kardio mišićni i moždani protein. Nedovoljan unos selena dovodi do oboljenja koje rezultira kalcifikacijom skeletnih i srčanih mišića, kod ljudi se dovodi u vezu sa pojavom Kešanskog oboljenja (Yeh et al, 1995). Sel-R ima Se-Cys na C-terminalnom kraju i još uvek nepoznatu funkciju u organizmu (Tapiero i sar., 2003).

2.9.6. Selen u funkciji glutathion peroksidaze

Nedovoljan unos selena, uključujući i druge antioksidanse kao što su vitamin C i E može da rezultira povećanim nivoom reaktivnih kiseonikovih vrsta, ROS/oksidativnog stresa (Zeng i Combs, 2008). Dokazano je da su ROS važni signalizirajući molekuli jer u malim količinama indukuju apoptozu i nekrozu ćelija. U većim koncentracijama ROS oštećuje organele, delimično mitohondrije, što može da rezultuje gubitkom energije, akumulacijom citotoksičnih medijatora i smrti ćelije. Efektivnim uklanjanjem svih slobodnih radikala postiže se integritet membrane, sprečavanje pojave tumora, starenja organizma i nastanka degenerativnih oboljenja (Zeng i sar., 2013). Izgleda da bi antioksidativni mehanizam selena rezultirao povećanjem aktivnosti fosfolipidne hidroperoksid-glutathion peroksidaze, u smislu

zaštite membrane od peroksidacije i inhibicijom aktivnosti fosfolipaze (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000). Zaštita ćelije zavisi od kompleksa antioksidativnih faktora koji uključuju molekule male mase (npr. glutation i tioredoksin) kao i proteinske antioksidanse (npr. selenoproteine). GPx i selenoproteini na taj način igraju ulogu u usporavanju ćelijskih oštećenja i starenja (Tapiero i sar., 2003). Glutation, tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutamata, nalazi se u većini ćelija i važan je antioksidans u organizmu čoveka. Selenocistein predstavlja deo aktivnog centra glutation peroksidaznog enzima, GSH-Px čija aktivnost zavisi od sadržaja selena u jetri (Levander i Burk, 1994). GSH-Px igra važnu ulogu u ćeliji, redukuje hidrogen peroksidazu i lipidnu hidroperoksidazu u citosolu i matriksu mitohondrija. Zbog takođe visokog i pozitivnog delovanja vitamina E na glutation peroksidazu, često se u korelaciju dovode vitamin E i selen. Danas je uloga GSH-Px dobro poznata: Selen je uključen u dve putanje lipo-oksigenaze, u organskom antioksidativnom sistemu zajedno sa katalazom, superoksid dismutazom, vitaminima E, C i karoteinoidima čija je osnovna funkcija da eliminišu slobodne radikale koji dolaze od vodonik peroksida, organskog hidroperoksida, superoksida i hidroksilnih radikala (Attia i sar., 2012). To je najvažniji selenoprotein kod sisara.

2.9.7. Selen u funkciji štitne žlezde

Koncentracija selena u tiroidnoj žlezdi veća je nego u drugim organima, značajna je kao i jod i igra važnu ulogu u sintezi tiroidnih hormona i metabolizmu. No, visoka korelacija između funkcije tiroidne žlezde i selena dokazana je samo kod žena (Derumeaux i sar., 2003; Rasmussen i sar., 2011). Žene koje boluju od Hašimoto tiroitidisa imaju predispoziciju da razviju tiroidnu disfunkciju i hipotiroidizam nakon rađanja. Autori koji su radili ispitivanje na trudnicama došli su do zaključka da suplementacija od 200 µg dnevno u vidu selenometionina predstavlja strategiju koja obećava tretman u lečenju ove bolesti, naročito u redukovanju tiroitidisa (Reid i sar., 2010). Različiti pacijenti su različito reagovali u pokušaju lečenja bolesti suplementacijom selena. Potrebna su dodatna ispitivanja koja bi otkrila da li se selen može koristiti u lečenju ili samo u prevenciji oboljenja

tiroidne žlezde. Štitna žlezda otpušta male količine biološki aktivnog hormona, trijodotironina (T3) i velike količine inaktivnog oblika hormona, tiroksina (T4). Tiroksin (T4), glavni hormon, proizvod tiroidne žlezde prevodi se u aktivniji hormon trijodotironin (T3) pomoću tipa I i II jodotironin dejodinaze (ID-I; ID-II) (Levander i Burk, 1994). Navedena dva enzima smatraju se aktivirajućim enzimima. Nedostatak selena čak i u prisustvu dovoljne količine joda u ishrani smanjuje konverziju T4 u T3. Iako je aktivnost ID-II zavisna od selena, ova dejodinaza nije selenoprotein (Arthur i sar., 1994).

2.9.8. Selen u hemoprevenciji

Karcinogeneza je višestepeni proces koji uključuje inicijaciju tumora, promociju i progresiju, proliferaciju i degradaciju ekstracelularnog matriksa (Nakamaru i sar., 2005; Saritha i Kummar, 2001). Dokazano je da jedinjenja selena mogu da inhibiraju tumor smanjujući ćelijsku proliferaciju ili povećavajući apoptozu. Hemopreventivno dejstvo je dokazano kod velikog broja seleno komponenata. Radovi ukazuju na to da preizloženost HeLa ćelija tumora grlića materice kod žena mikromolekularnim koncentracijama selenita rezultuje u smanjenom vezivanju za čvrsti matriks zavisno od koncentracije selena (Yan i Frenkel, 1992). Dolazi do redukcije fibroinektin receptorske aktivnosti na površini ćelije, inhibirajući vezivanje ćelija tumora za ekstracelularni matriks. Ovi efekti uključuju aktivnost metaloproteinaze i serin proteaze, proteolitičke enzime. Serin proteaza, urokinazni tip aktivatora plazminogena (uPA) može da konvertuje plazminogen u plazmin, koji može da degradira ekstracelularni matriks proteinaze (Forget i sar., 1999). Veliki broj radova govori o hemopreventivnom efektu selena (Oldfield, 2002; Rayman, 2008; Tapiero i sar., 2003; Thomson, 1998). Pokazano je i da monometilovani oblik selena igra ključnu ulogu u hemopreventivnom efektu ovog elementa (Ganther, 1999). Oba, selenit i metilselenol inhibiraju invazije tumorskih ćelija (Zeng i Combos, 2008).

U većini publikacija navodi se da su pacijenti oboleli od tumora imali niži nivo Se u organizmu u odnosu na zdrave ispitanike (Tapiero i sar., 2003). Navedeni

rezultati ukazuju na nerazjašnjeno pitanje - da li je nizak sadržaj selena kod obolelih ljudi posledica ili uzrok pojave tumora. Nizak sadržaj selena ne dovodi do pojave tumora, ali smanjuje mogućnost da se organizam izbori sa stresom uzrokovanim tumorom (Chu i sar., 1984). Uloga selena u prevenciji tumora nije do kraja razjašnjena i ne može se izvesti siguran zaključak. Moguće je da rezultati variraju u zavisnosti od tipa tumora i pacijenta. Iako neka istraživanja ne podržavaju teoriju da selen smanjuje rizik od pojave tumora, dokazano je da sa povećanim unosom selena dolazi do smanjenja karcinoma kod nekih pacijenata (Clark, 1985). Moguće je da efekat selena u smanjenju karcinoma takođe zavisi i od ispitanika, tj., od dijetetike, navika, pola, starosti. Svaki uticaj selena u ovom smeru može biti maskiran nekim od navedenih faktora. (Alaejos i sar., 2000).

Suplementacijom selena ne može da se smanji pojava melanoma kože, ali ima protektivnu ulogu od tumora prostate, pluća i kolorektalnog tumora i značajno umanjuje smrtnost izazvanu ovim vrstama tumora (Greenlee, 2012). Nizak unos mikronutrijenta, selena, jedan je od uzročnika pojave kolorektalnog tumora, pod pretpostavkom da selen kroz selenoproteine igra glavnu ulogu u mogućnosti odgovora kolonálnih epitelnih ćelija na mikrobne i oksidativne izazove i da nizak nivo selena dovodi do povećanog rizika od pojave oboljenja (Meplan i Hesketh, 2012). Selen inhibira tumor usporavanjem metabolizma karcinoma ili antioksidativnim delovanjem i stimulacijom imunog sistema (Navarro-Alarcon i sar., 1998). Selen igra bitnu protektivnu ulogu kroz niz biohemijskih reakcija kao kofaktor glutation peroksidaze. Sva ova otkrića dovode do zaključka da je zapravo nizak sadržaj selena kod obolelih posledica, a ne uzrok pojave bolesti, najvećim delom kod gastrointestinalnog tumora, gde je nizak nivo selena u plazmi u vezi sa njegovim nedovoljnim unosom (Simonoff i sar., 1992). U nekoliko istraživanja dokazano je da je nizak nivo selena u serumu ili krvnoj plazmi prouzrokovan raznim tipovima tumora-pankreas, creva, gastrointestinalnog sistema, pluća, grudi, respiratornog, hematološkog ili ginekološkog (Backovic i sar., 1998; Kabuto i sar., 1994). Predloženo je nekoliko mehanizama hemoprevencije selenom, pre svega modulacijom oštećenja ćelija, antioksidativnim delovanjem, stimulacijom imunog

sistema, inhibicijom aktivnosti hepatičkih enzima ili aktivacijom enzima za detoksikaciju (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000).

2.9.9. Selen u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja

Istraživanja su rađena *in vivo* na pacovima u cilju utvrđivanja efektivnosti vitamina E i selen na funkciju jetre, srca i aorte obavljeno je istraživanje na pacovima, a pokazalo je da unos selen i vitamina E u koncentraciji 1µg/100g u trajanju od 6 meseci dovodi do smanjenja degenerativnih promena na srcu, jetri i aorti sa regeneracijom ćelija. Vitamin E i selen značajno smanjuju nivo lošeg holesterola, keratin kinaze u serumu pri unosu visokokalorične hrane. Dokazana je i efektivnost vitamina E i selen u redukciji oštećenja izazvanih hepatitisom kod pacova tretiranih glukokortikoidnim hormonima (Attia i sar.,2012). Chen i Tappel (1993), otkrili su da kombinacija unosa vitamina E, selen i karotenoida dovodi do smanjenja oksidativnih oštećenja srca, bubrega i pluća. S obzirom na to da selenoproteini pomažu u prevenciji oksidativne peroksidacije lipida i usporavaju starenje, veruje se da suplementacija selenom može da redukuje rizik od pojave kardiovaskularnih oboljenja i smrti. Postoje suprotna mišljenja o uticaju selen u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Neki smatraju da postoji inverzna korelacija u sadržaju selen i rizika od hipertenzije ili koronarnih srčanih oboljenja. Nižim sadržajem selen povećava se rizik od pojave srčanih oboljenja. Međutim, kod onih koji imaju srčana oboljenja, a već unose selen hranom, ne preporučuje se dodatni unos dijetetskih suplemenata jer se izaziva kontra efekat (Xun i sar., 2010; Bleys i sar., 2008).

2.9.10. Selen u zaštiti od infektivnih oboljenja

Lošom ishranom i niskim unosom selen u organizam, dolazi do pada imuniteta i do povećane osetljivosti na patogene viruse. Rezultati skorašnjeg istraživanja potvrđuju da loša ishrana može zaista da ima efekat na razviće viralnih patogena. Tako, soj koksaki virusa, B3 (CVB3/0) postaje virulentan u odsustvu

vitamina E i selen kod životinja (Beck, 1999). Ova promena kod virusa objašnjava se specifičnim mutacijama samog virusa, kada jednom virus mutira čak i sisari sa regularnom ishranom postaju neotporni na virus. Prvo interesovanje za ovu problematiku počelo je proučavanjem Kešanske bolesti. Ova bolest je edemična kardiomiopatija, prvi put opisana u Kini 1930. godine (Ge i sar., 1983). Kešansko oboljenje se ispoljava kroz miokarditis, zapaljenski proces lokalizovan u zidu miokarda. Ova bolest je otkrivena u regionima Kine sa niskim sadržajem selen i jedino kod obolelih, zbog niskog unosa selen u organizam. Deca i žene su najrizičnija grupa. Unos selen suplementima može da redukuje Kešansku bolest i da deluje preventivno. Međutim, nije samo nedostatak selen uzrok pojave ove bolesti. Takođe, nisu svi pacijenti sa nedovoljnim unosom selen oboleli od Kešanske bolesti. Na miševima je dokazano da normalan koksaki virus B3 (CVB3/0) postaje virulentan ili zbog deficita selen ili vitamina E (Beck, 1999). Iako su životinje sa deficitom u ishrani imunosupresirane, primećen je i uticaj selen na virus. Kada se jednom pojavi mutacija i miševi sa normalnom ishranom postanu ranjivi. Pretpostavlja se da je isti mehanizam koji izaziva oksidativni stres uzrok pojave genetskih promena. Oba, vitamin E i selen su antioksidansi. Zaključeno je da je ishrana pacijenta važna ne samo sa stanovišta pacijenta već i sa stanovišta virulentnosti (Oldfield, 2002).

2.10. Toksičnost selen

Selen je hemijski element koji ima dualnu prirodu. Neophodan je u malim količinama, ali u većim količinama je toksičan (Tabela 6). Selenozis, trovanje selenom se kod ljudi detektuje promenama na kosi, osipom, mučninom i dijarejom, promenama na noktima, jetri, koži, nervnom sistemu i zubima (Hathcock, 2004). Akutno trovanje selenom može da izazove gastrointestinalne i neurološke simptome, akutna respiratorna oboljenja, miokarditis, gubitak kose, atrofiju mišića, otkazivanje rada bubrega, kardiovaskularne smetnje, a u retkim slučajevima i smrt (Sunde i Diamond, 2012; Food and Nutrition Board, 2000). S obzirom na to da se u zemljištu obično nalazi vrlo nizak sadržaj selen, gotovo je nemoguće da se trovanja dogode

unosom hrane, već najčešće dolaskom u kontakt sa selenom putem dijetetskih suplemenata ili hemikalija. Kada dnevni unos selen prevazilazi mogućnosti organizma da ga izbací, dolazi do trovanja pri kojima se hronični simptomi ispoljavaju u vidu iritacije respiratornog sistema, metalnog ukusa u ustima, pulmonarne edemije i karakterističnog mirisa na beli luk u zadahu koji potiče od dimetilselenida (Navarro-Alarcon i Lopez-Martinez, 2000).

Tabela 6. Maksimalno dozvoljen dnevni unos selená
(Food and Nutrition Board, 2000)

Godine	Muškarci i žene	Trudnice	Dojilje
Novorođenče do 6 meseci starosti	45 µg		
7–12 meseci	60 µg		
1–3 godine	90 µg		
4–8 godina	150 µg		
9–13 godina	280 µg		
14–18 godina	400 µg	400 µg	400 µg
19+ godina	400 µg	400 µg	400 µg

2.11. Suplementi na bazi selená

Komercijalno dostupni preparati sadrže selen u neorganskoj formi, u obliku soli selenata ili selenita i u organskoj formi tipa selenometionina, selenometilselenocisteina i selenom obogaćenog kvasca (Infante i sar., 2006). Unos selená suplementima je potreban u delovima sveta gde je registrovan nizak sadržaj selená u zemljištu. Ovaj nedostatak se može nadoknaditi obogaćivanjem neke vrste biljnog materijala ili gljiva, dodatkom selená u supstrat preko koga će ga biljka/gljiva usvojiti. Druga mogućnost je uzimanje selená direktno preko mikronutrijenata koji sadrže selen. U Americi, približno 40% populacije unosi mikronutrijente različitim

suplementima (Rayman, 2008). Nekoliko faktora utiče na usvojivost. To su interakcija sa drugim suplementima, dnevni unos suplemenata, doza i unos u kombinaciji sa hranom i pićem, od sadržaja već postojećeg selen u organizmu, vrsta sisara, starosti, pola, načina života (Aaejos i sar., 2000). Selen je dostupan u vidu multivitaminskih/multimineralnih suplemenata i kao poseban suplement, uglavnom u formi selenometionina ili selenom obogaćenog kvasca, odgajanom na medijumu sa dodatkom selen u formi selenita i selenata (Infante i sar., 2006).

2.11.1. Kvasac obogaćen selenom

Kvasac obogaćen selenom je najpoznatiji dijetetski suplement sa selenom i koristi se kao dodatak ishrani već dugi niz godina. Prvi poznati suplementi na bazi pekarskog kvasca potiču iz sedamdesetih godina prošlog veka. Ovo je jedini tip suplementa na bazi selen koji se pokazao kao efikasan u hemoprevenciji tumora (Infante i sar., 2006). Poznato je da je dostupnost mikronutrijenata znatno veća ako su organski vezani za bioligande (Vrvić i Matić, 2006). Međutim i dalje postoji analitički problem oko otkrivanja preraspodele selen u kompleksima, detekcije i distribucije koje i dalje nisu dovoljno razjašnjene. Finalni proizvod selenskog kvasca sadrži visoke koncentracije selenoproteina, selenocisteina i selenometionina. Selenski kvasac je testiran na toksičnost i dokazano je da je pogodan za direktnu upotrebu, sa znatno većom usvojivošću u odnosu na neorganske soli i znatno manjom toksičnošću.

Na našem tržištu se može naći dosta dijetetskih suplemenata na bazi selen, kao što su Sel-Plex®, Selenium, Selenium E, Chrom Selenium, Zinc Selenium i domaći proizvod selenskog kvasca, Oligogal®-Selen (Vrvić i sar., 1988). Sel-Plex® (Alltech, USA) je proizveden od kvasca *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3060 i ima odobrenje EU regulisano (EC) No 1831/2003 kao nutritivni aditiv (suplementi sa mikronutrijentima). Sel-Plex® ima odobrenje USA i FAD kao siguran izvor selen za ishranu sisara i pernatih životinja. O bezbednosti samog proizvoda, potvrđuju i dalja EFSA istraživanja (EFSA, 2006). EFSA je u *in vivo* ispitivanjima u preko 30 eksperimenata na životinjama, a zatim na deci kao konzumentima animalnih

namirnica donela zaključak o efikasnosti i bezbednosti proizvoda. Proizvod je namenjen animalnoj ishrani, za poboljšanje kvaliteta i nutritivne vrednosti stočne hrane. U kvascu se selen nalazi u koncentraciji od 2000-2400 mgSe/kg od čega je 97-99% organski selen, u formi selenometionina (63%) i niskomolekularnih selenojedinjenja (34-36%). Sel-Plex® se sastoji od osušenih i inaktivisanih kvašćevih ćelija *Saccharomyces cerevisiae*. Smatra se da je ova vrsta netoksična i genetski nemodifikovana. U toku porasta, sumpor se zamenjuje selenom dok maksimum ne izazove poptunu smrt kulture. Finalni produkt je svetlo do tamno braon boje, praškast sa aromom kvasca, rastvorljiv u vodenim i organskim rastvaračima gustine 0.74 g/L. FEEDAP Panel grupa (EFSA, 2006) zaključila je da je Sel-Plex® bezbedan za ciljnu grupu- životinje, ljude konzumente animalne hrane sa selenom i nije štetan za prirodu. FEEDAP Panel grupa (EFSA, 2008) navodi da suplementacija sa preparatom Sel-Plex® ne može da redukuje lipidnu oksidaciju mesa ili da poboljša boju produkta u poređenju sa neorganskim jedinjenjem kao i to da suplementacija selenom u vidu neorganskog ili organskog jedinjenja nema efekta na vezivanje vode u mesu. Iz rezultata istraživanja vršenih na deci, konzumentima animalnih proizvoda sa selenom, zaključuje se da se upotrebom oko 0.2 mgSe/kg stočne hrane sa dodatkom selenskog kvasca dobija bezbedan proizvod za decu starosti 1-3 godine (EFSA, 2010).

2.12. Neorganske soli selena

Pri zagrevanju, selen gradi kristalni dioksid (selendioksid). Rastvaranjem u vodi, SeO_2 gradi selenastu kiselinu H_2SeO_3 . Njihove soli seleniti dobijaju se rastvaranjem SeO_2 u rastvorima alkalija.



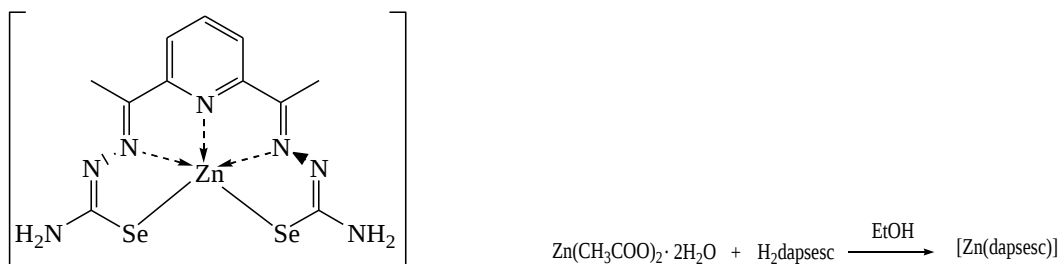
Bezbojni kristalni trioksid, SeO_3 , energično apsorbuje vodu prelazeći u selenovu kiselinu H_2SeO_4 , čije soli su selenati.



U stenama, selen se kombinuje sa kiseonikom i formira nekoliko sličnih jedinjenja a to su soli natrijumselenit Na_2SeO_3 i natrijumselenat Na_2SeO_4 . Kao što je ranije navođeno, neroganske soli selen su jedinjenja po otrovnosti slična jedinjenjima arsena (Rajković, 2002).

2.13. Selenosemikarbazonski kompleksi

Kompleks selen sa Zn (II) je polidentatni kompleks, dobijen refluktovanjem etanolne suspenzije liganda sa $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (molski odnosi 1:1). Sistem liganada koji su korišćeni za pripremu selenosemikarbazon kompleksa, bili su selenosamikarbazoni od: alifatičnih acikličnih i cikličnih ketona, aromatičnih aldehida, diacetilmonoksima, ketokiselina i diketona. Ukazano je da je kompleks neelektrolit i da je ligand koordinovan u dianjonskom obliku kao pentadentat i preko SeNNNSe seta donorskih atoma, gradeći pri tome četiri petočlana helatna prstena.



Slika 9. Kompleks $[\text{Zn}(\text{dapsesc})]$

U radu Todorović i sar. (2007) prvi put je ispitivan uticaj kompleksa $[\text{Zn}(\text{dapsesc})]$ na rast gljiva. Primijenjeno je istovremeno praćenje uticaja liganda na rast gljive, da bi se utvrdilo da li, i na koji način, utiče Zn iz kompleksa. Inače se zna malo o biološkoj aktivnosti karbazona. Ispitivana je biološka aktivnost kompleksa pomoću šrimp testa, koji je u dobroj korelaciji sa citotoksičnom aktivnošću. Pokazano je da je kompleks aktivniji od liganda, verovatno kao posledica nejonske prirode kompleksa, što možda olakšava difuziju kroz biološku membranu.

3. CILJEVI

Iz pregleda literature se vidi da su gljive funkcionalna hrana, izvor lekovitih komponenata i važan činilac pravilne ishrane. Kako sadrže bioaktivne komponente, dodatno selenom obogaćene gljive potencijalno je moguće koristiti u svežem i sušenom stanju ili kao dijetetski supplement. Imajući u vidu rezultate mnogih istraživanja koji ukazuju na to da gljive sadrže relativno visok procenat proteina i pri tom mogu da akumuliraju relativno visoke koncentracije selena u micelijum i plodonosno telo, postavljeni su sledeći ciljevi rada:

1. Praćenje rasta micelijuma različitih vrsta jestivih industrijski i medicinski važnih gljiva (pečuraka) *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes* i *Ganoderma lucidum* na laboratorijskim hranljivim podlogama i industrijskom proizvodnom supstratu obogaćenom neorganskim jedinjenjem selena u odnosu na kontrolni uzorak bez dodatka.

2. Praćenje rasta micelijuma različitih vrsta jestivih industrijski i medicinski važnih gljiva (pečuraka) *Pleurotus spp.*, *Lentinula edodes*, i *Ganoderma lucidum* na laboratorijskim hranljivim podlogama i industrijskom proizvodnom supstratu obogaćenom organskim jedinjenjem selena u odnosu na kontrolni uzorak bez dodatka.

3. Proučavanje usvajanja i transformacije selena u plodonosnom telu modela gljive *Pleurotus spp.* Zbog boljeg razumevanja metabolizma usvajanja selena. Određen je ukupan sadržaj neorganskog selena u plodonosnom telu gljive i ekstraktima (ICP-OES), a hemijski sastav plodonosnog tela i ekstrakata korišćenjem spektrofotometrijskih metoda. Aminokiselinski sastav proteina sa akcentom na selenoaminokiseline određen je HPLC tehnikom, kao i monosaharidni sastav ekstrakata polisaharida. Dodatno je urađena analiza polisaharidnih frakcija na FT-IR uređaju i vodorastvornih proteina na SDS-PAGE elektroforezi.

4. Proučavanje kultivacije i definisanje najboljeg načina za što efikasnije obogaćivanje gljiva selenskim kvascem, kako bi se njihovim korišćenjem korigovao nedostatak u ljudskoj ishrani. Praćen je rast gljive *Pleurotus ostreatus* na supstratu sa dodatkom različitih koncentracija selen. Analizirana su plodonosna tela dobijena u različitim fazama plodonošenja. Na modelu gljive *Agaricus bisporus*, dodavanjem selen u različitim fazama kultivacije, definisan je najbolji momenat suplementacije proizvodnog supstrata selenom za dobijanje obogaćenih gljiva.

Ispitano je antifungalno delovanje preparata selenskog kvasca.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Određivanje brzine rasta micelije

Praćen je uticaj selenskih jedinjenja na micelijarni rast komercijalnih sojeva gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Pleurotus ostreatus*. Korišćeni su sojevi iz kolekcije Katedre za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Ispitivan je uticaj natrijum selenita koncentracije 1-100 µg/mL, kompleksa Zn[(dapsesc)] koncentracije 1-50 µg/mL i selenskog kvasca-komercijalnog preparata Sel-Plex[®] (Alltech Inc., Lexington, USA) koncentracije 1-100 µg/mL. Proučavani izolati su gajeni u petri kutijama (Ø 90mm) na sladnom agaru i inkubirani u mraku na temperaturi od 25 °C. Sladni agar bez i sa ispitivanim hemijskim jedinjenjima sterilisan je u autoklavu na temperaturi od 121 °C u trajanju od 15 minuta. Inokulum je postavljen u centar petri kutije. Inkubacioni period trajao je do potpunog prorastanja micelijuma u petri kutiji. Meren je rast micelijuma svaki drugi dan i prosečna stopa rasta izražena je u mm/dan. Konačna prosečna stopa rasta svakog soja na podlozi sa i bez dodatog selena dobijena je kao srednja vrednost porasta micelijuma u toku svih dana kultivacije. Rezultati su izraženi kao procentualni porast micelijuma u odnosu na kontrolu (Serafin Muñoz i sar., 2007; Tham i sar., 1999). Sva merenja su rađena u tri ponavljanja (n=3) i rezultat je prikazan grafički kao srednja vrednost ± standardna devijacija

4.2. Industrijski postupak gajenja gljiva

Inokulum za industrijski supstrat pripremljen je na vlažnoj pšenici koja je sterilisana na 121°C u trajanju od 2h. Industrijski supstrat za gajenje bukovače, pripremljen je na bazi slame (29%), bukove piljevine (24%), bukove šuške (42%) i gipsa (5%). U vodu za vlaženje supstrata (60%) dodata su jedinjenja sa selenom: 100 mg/kg natrijum selenita, 100 mg/kg selenskog kvasca i 50mg/kg kompleksnog jedinjenja [Zn(dapsesc)] izraženo kao koncentracija selena na suvu masu supstrata. Ispitivana je mogućnost akumulacije i transformacije selena iz selenita, selenskog

kvasca i kompleksnog jedinjenja u odabranom modelu - plodonosnom telu gljive *P. ostreatus* P70 odgajene pod laboratorijskim uslovima sa ciljem da se nađe najpogodnije jedinjenje kao izvor selena. Sterilisan supstrat je inokulisan prethodno pripremljenim inokulumom na zrnima žita (2-3% težine vlažnog supstrata) u tri ponavljanja. Praćena je brzina i kvalitet rasta gljiva. Prorasli micelijum nakon 20 dana inkubiranja u mraku bez dodatnog vlaženja i ventilacije na temperaturi od 25°C, podvrgnut je fruktifikaciji pri kontrolisanim parametrima okruženja. Temperatura prostorije kretala se oko 20°C, vlažnost vazduha 85 do 90%, uz ventilaciju i osvetljenje prostorije u trajanju od 8-12h. Kod ostalih ispitivanih sojeva (*P. ostreatus* P80, *P. salmoneastreus* i *P. cornucopiae*) koji su odgajani u gajilištu „Mycorex Mushroom Limited” (Larnak, Cyprus), praćena je samo mogućnost usvajanja selena iz selenskog kvasca kao najpogodnijeg izvora selena. Gljive su proizvedene prema standardnoj proizvođačkoj praksi prilagođenoj uslovima gajilišta. Plodonosna tela su sušena u struji toplog vazduha i kao takva služila su za dalju analizu (Stojanović i Nikšić, 2000; Tuzen 2003).

4.3. Određivanje sadržaja ukupnog selena u plodonosnom telu gljiva, polisaharidnim i proteinskim ekstraktima

Za kiselinsku digestiju 0.3g osušenog i fino usitnjenog uzorka korišćen je zatvoren sistem mikrotalasne pećnice „Milestone Ethos”. Uzorci su digestovani u teflonskim sudovima uz dodatak 6mL HNO₃ (65%) i 2mL H₂O₂ (30%). Digestija je u sistemu mikrotalasne pećnice podešena na sledeće uslove: 100°C u trajanju od 10 minuta, 7 minuta na 200°C i još 8 minuta na 200°C. Snaga mikrotalasa bila je do 500W u svakoj fazi. Za pripremu reagenasa, standarda i uzoraka korišćena je dejonizovana voda i hemikalije AAS čistoće. Nakon digestije, sadržaj je prebačen u normal sud i dopunjen do zapremine od 25mL dejonizovanom vodom. Blank je pripremljen na isti način kao i uzorak (Falandysz i sar., 2008; Mena i sar., 2009). Ukupan sadržaj selena u digestivnim uzorcima meren je na optičkom emisionom spektrometru sa indukovano spregnutom plazmom, ICP-OES (Thermo Scientific ICAP 6500 DUO). Dobijene vrednosti su izražene u µg/g suve mase uzorka.

Očitane vrednosti za selenom obogaćene uzorke gljiva poredene su sa očitanim vrednostima za kontrolne uzorke bez dodatog selen (Huerta i sar., 2006; Thomet i sar., 1999). Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je standard Se^{+4} (Merck). Sva merenja su rađena u tri ponavljanja ($n=3$) i rezultat je prikazan tabelarno kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

4.4. Priprema polisaharidnih ekstrakata

Za dobijanje polisaharidnog ekstrakta iz plodonosnog tela gljiva korišćen je postupak ekstrakcije vrelom vodom (Kozarski i sar., 2011) i alkalne ekstrakcije uz alkoholnu precipitaciju (Klaus i sar., 2011). Fino samleveni prah suve gljive (10g) tretiran je etanolom (96%) uz mešanje. Nakon 24h, materijal je filtriran i talog je osušen pod vakuumom, a zatim ekstrahovan u MiliQ vodi na 121°C u trajanju od 45 minuta. Ekstrakt je ohlađen i centrifugiran na 9000g u toku 20 minuta (Eppendorf, 5810 R). Supernatant je skoncentrisan do zapremine od 10% zagrevanjem na 100°C uz konstantno mešanje, a zatim su polisaharidi taloženi u dvostrukoj zapremini 96% etanola na 4°C preko noći. Nakon centrifugiranja na 9000g, 20 minuta, talog je ispran 70% etanolom i osušen u vakuumu. Na taj način dobijen je neprečišćeni vodeni ekstrakt polisaharida. Zaostali talog nakon vrele vodene ekstrakcije, korišćen je za dobijanje neprečišćenog alkalnog ekstrakta polisaharida. U talog je dodat 1M NaOH, a zatim je ekstrakcija vršena u autoklavu na 121°C u toku 45 minuta. Dobijeni ekstrakt je neutralisan sirćetnom kiselinom do pH 7.0 i centrifugiran na 9000g, 10 minuta. Supernatant je dekantovan i podvrgnut alkoholnoj precipitaciji kao što je ranije opisano. Dobijeni talog je ispran 70% alkoholom, osušen pod vakuumom nakon čega je dobijen neprečišćeni alkalni ekstrakt polisaharida.

4.5. Ekstrakcija proteina iz gljiva

Proteini rastvorni u vodi su iz plodonosnog tela ekstrahovani prema uputstvu koje su dali Gergerly i saradnici (2006), a u kom se poredi više metoda za ekstrakciju i analizu proteinskog sastava gljiva. Ovom procedurom ekstrakcije proteina u Tris

puferu i acetonskom precipitacijom dobija se visok prinos kako visokomolekularnih tako i niskomolekularnih frakcija proteina. Fino sprasenoj osušenoj gljivi (0.25g) dodat je 30mM Tris-HCl pufera (25mL, pH 7.5). Uzorak je ekstrahovan u puferu 24h na sobnoj temperturi uz konstantno mešanje. Ekstrakt je zatim centrifugiran (5000g, 20 min.) i supernatantu je dodat aceton do finalne koncentracije od 80% (v/v) što se pokazalo kao optimalno za izdvajanje proteina raznih molekulskih masa. Proteini su precipitirani 24h na 5°C. Niskom temperaturom sprečava se degradacija proteina. Proteinski talog je sakupljen i osušen u atmosferi azota, a zatim rastvoren u 30mM Tris-HCl (pH 7.5) za određivanje ukupnog sadržaja selena na uređaju ICP-OES. Na ovaj način su dobijeni sirovi vođeni ekstrakti proteina.

4.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u plodonosnom telu gljiva i polisaharidnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih fenola određen je korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa (Ismail i sar., 2004). Svakom vodenom ekstraktu cele gljive i njihovim polisaharidnim ekstraktima (0.1mL, 1mg/mL) dodato je 0.75mL Folin-Ciocalteu reagensa razblaženog deset puta dejonizovanom vodom. Nakon vorteksiranja i 5 minuta inkubiranja, mešavini je dodato 0.75 mL 6% (w/v) Na₂CO₃ uz blago mešanje. Nakon inkubiranja uzoraka u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi u mraku, apsorbanca je očitana na spektrofotometru (Halo DB-20 UV/Vis Double Beam Spectrophotometer) na 725nm (Wojdylo i sar., 2007; Klaus i sar.,2011). Za konstruisanje standardne krive korišćena je galna kiselina koncentracije 15–250mg/mL i sadržaj ukupnih fenola je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/g suve mase ekstakta gljive ili polisaharida. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja (n=3) i rezultat je prikazan kao srednja vrednost ± standardna devijacija.

4.7. Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u gljivama i polisaharidnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u celim gljivama i polisaharidnim ekstraktima određen je kolorimetrijski fenol-sumpornom metodom (DuBois i sar.,

1956). Svakom vodenom ekstraktu cele gljive i njihovim polisaharidnim ekstraktima (1 mL, 0.25 mg/mL) dodato je po je 1mL 5% fenolnog rastvora i 5mL koncentrovane sumporne kiseline. Nakon 10 minuta na sobnoj temperaturi i naknadnog zagrevanja od 20 minuta na 30°C, očitana je apsorbanca na UV-VIS spektrofotometru na talasnoj dužini od 490nm.

Za konstruisanje standardne krive korišćena je D-glukoza koncentracije 0.025-0.125mg/mL i rezultat je izražen kao ekvivalent D-glukoze u mg/g suve mase gljive. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja (n=3) i rezultat je prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

4.8. Određivanje sadržaja β -glukana u polisaharidnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih glukana i α -glukana određen je u neprečišćenim vrelinim vodenim i alkalnim ekstraktima polisaharida korišćenjem enzimskog kita Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure, K-YBGL 07/11 (Megazyme Int., Ireland). Komponente kita su egzo-1,3- β -glukanaza, β -glukozidaza, amiloglukozidaza, invertaza, reagens za određivanje glukoze (GOPOD-glukozo oksidaza, peroksidaza, 4-aminoantipirin) i standardni rastvor glukoze. Za određivanje ukupnih glukana, uzorci su hidrolizovani u koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini na 100°C u trajanju od 2 sata. Nakon neutralizacije sa 2M KOH, uzorcima je dodata egzo-1,3- β -glukanaza i β -glukozidaza u Na(CH₃COO) puferu (pH 5.0) uz nastavak hidrolize na 40°C u trajanju od 1h. Nakon 20 minuta na 40°C posle dodavanja glukozo-oksidaze, rezultati su očitani na spektrofotometru na 510nm. Sadržaj α -glukana određen je enzimskom hidrolizom pomoću amiloglukozidaze i invertaze na 40°C u trajanju od 30 minuta. Sadržaj β -glukana dobijen je kao razlika sadržaja ukupnih i α -glukana. Rezultat je izražen kao mg/g suve mase ekstrakta. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja (n=3) i rezultat je prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija

4.9. Određivanje sadržaja proteina

Koncentracija proteina u ekstraktima polisaharida određena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Bradfordova metoda je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina. Zasniva se na promeni crvene boje Commassie Brilliant Blue G-250 u stabilnu plavu boju koja se postiže vezivanjem za protein i formiranjem kompleksa preko interakcija koje uključuju dva tipa veze. U ekstrakte (100 μ L, 20 mg/mL) dodato je 5mL Bradfordovog reagensa. Nakon 15 minuta, apsorbanca je očitana na UV-VIS spektrofotometru na 595nm. Kao standard korišćen je ekvivalent albumina iz goveđeg seruma, BSA (0.1-2.0 mg/mL) i rezultat je izražen kao ekvivalent BSA u mg/g suve mase ekstrakta polisaharida. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja (n=3) i rezultat je prikazan kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija

4.10. Određivanje sadržaja lipida

Uzorci gljiva ekstrahovani su hloroformom. Sprašeno plodonosno telo gljive (2-3g) osušeno je do konstantne mase u prethodno izmerenoj čauri za ekstrakciju. Sadržaj lipida u plodonosnom telu gljiva određen je prema AOAC, 1995. Osušena čaura sa uzorkom je postavljena u eksikator Soxhlet-aparata i eksikator je spojen sa tikvicom za ekstrakciju, predhodno osušenom i izmerenom sa tačnošću ± 0.001 mg. U eksikator je sipano oko 50mL hloroforma (Poch). Zatim je tikvica sa ekstragensom postavljena na grejno telo i eksikator je povezan sa hladnjakom. Ekstrakcija je trajala oko 6h, sa brzinom ekstrakcije oko 5-6 kapi/s. Posle završene ekstrakcije, hloroform je otparen, a tikvica sa ostatkom je osušena u vakuum sušnici do konstantne mase i ohlađena u eksikatoru za merenje (Ouzouni i sar.,2009). Za svaki uzorak je rađena ekstrakcija u tri ponavljanja i rezultat je predstavljen tabelarno kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

Količina sirove masti izražava se u procentima i izračunava prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ sirovih lipida} = (M_2 - M_1) \times 100/S$$

M_1 -masa praznog balona u g

M_2 -masa balona sa uzorkom u g

S-masa odmerenog uzorka pre ekstrakcije u g

4.11. Tečna hromatografija polisaharidnih ekstrakata gljiva

Polisaharidni ekstrakti (5mg) hidrolizovani su sa trifluorosirćetnom kiselinom (TFA, 2M), 4mL na 120°C u trajanju od 2 sata, nakon čega su upareni do suva pod sniženim pritiskom i rastvoreni u 5mL MQ vode. Uzorci su pripremljeni u zatvorenim staklenim ampulama. Pre analize, urađena je derivatizacija uzoraka (60μL) u NaOH (15μL, 1.5M) i metanolnom rastvoru 1-fenil-3-metil-5-pirazolona, PMP (75μL, 0.5M) proizvođača Alfa Aesar GmbH. Uzorci su inkubirani na 70°C, 2h i zatim neutralisani pomoću HCl (0.5M). Analiza monosaharidnog sastava je rađena po postupku Malinowska i saradnici (2009). Da bi se uklonio PMP, 0.5mL hloroforma je dodato u hidrolizate i vršena je ekstrakcija intenzivnim mešanjem u dva ponavljanja u trajanju od jednog minuta. Nakon ekstrakcije, vodena faza je sačuvana i uzorci su analizirani u tri ponavljanja.

Sadržaj monosaharida je računat na osnovu kalibracione krive. Mešavina monosaharida koncentracije 62.5-250 nmol/mL korišćena je za pravljenje kalibracione krive. Monosaharidni kit (Supelco, USA) korišćen je kao mešavina standarda: D-ksiloza, D-riboza, D-arabinoza, D-manoza, D-fukoza, D-galaktoza, D-ramnoza, D-glukoza, D-glukozamin, D-galaktozamin. Za validaciju metode i računanja gubitka monosaharida tokom hidrolize, standardi su pripremljeni kao i uzorci.

Monosaharidni sastav je određen korišćenjem HPLC sistema proizvođača Shimadzu (Japan) sa LC-10 Atvp pumpom, SCL-10 Avp kontrolerom, UV SPD-10 Avp UV detektorom i RF-10AxL fluorescentnim detektorom. Uzorci su propušteni

kroz Luna C18 (2) kolonu dimenzije 250x4,6mm, 5 µm veličine pora proizvođača Phenomenex Inc., (Torrance, CA, USA) sa brzinom protoka od 1.0 mL/min i UV detekcijom na 245 nm. Kao mobilna faza korišćen je 0.1M fosfatni pufer (pH 7.0) sa 10% (pufer A) i 25% acetonitrila (pufer B). Linerani gradijent od 5%-100% pufera B u trajanju od 60 minuta korišćen je za razdvajanje monosaharida. Injekciona zapremina bila je 20 µL, a temperatura kolone 25°C.

4.12. FT-IR spektroskopija polisaharidnih ekstrakata gljiva

FT-IR spektri suvih uzoraka ekstrakata polisaharida snimani su metodom presovanja susptance u KBr pastili (Klaus i sar., 2011; Kozarski i sar., 2011). IR spektri snimani su na Nicolet Fourier transform infrared (FTIR) spectrometru (Shimadzu) u oblasti talasnih dužina 4000-400 cm⁻¹.

4.13. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)

4.13.1. Izolacija proteina

Fino sprašena osušena gljiva (10g) ekstrahovana je u 300mL destilovane vode uz mešanje na magnetnoj mešalici, tokom noći. Nakon filtriranja, polako i uz mešanje u supernatant je dodavan (NH₄)₂SO₄ do 90% zasićenja. Precipitacija proteina vršena je na 4°C tokom noći. Precipitat je prikupljen nakon centrifugiranja (10000g, 15min, 4°C) i izvršena je dijaliza u 50mM Tris-HCl (pH 7.2) u tri ponavljanja kako bi se uklonili mali molekuli (Zhao i sar., 2004; Lau i sar., 2012). Semipermeabilna membrana ZelluTrans/Roth® 6.0 je bila nepropustljiva za molekule čija je molekulska masa veća od 8-10 kDa. Posle završenog procesa dijalize rastvor je centrifugiran 10 minuta na 7000 g. Dobijen talog je rastvoren u 1mL 0.05M Tris pufera, pH 7.2 i rastvor je čuvan na -20 °C do upotrebe. Koncentracija proteina određivana je metodom po Bradfordu. Za pravljenje standardne krive korišćen je goveđi serum albumin (BSA) od koga su napravljeni rastvori koncentracija 5 mg/mL

- 0,625 µg/mL. Uzorci proteina svedeni su na koncentraciju od 2mg/mL (Bradford, 1976).

4.13.2. SDS-PAGE

Skrining proteinskog profila urađen je za sve ispitivane sojeve gljive *Pleurotus*, sa i bez dodatog selena. Raspored proteinskih bendova u njima analiziran je SDS-PAGE metodom po Laemmli-ju (1970). Uzorci za SDS-PAGE su centrifugirani (6500g, 20 min, 20°C), dodat im je pufer (60mM Tris-HCl, pH6.8; 10% glicerol; 2% SDS (w/v), 0.5% bromfenolplavo (w/v), 5% β-merkaptetoanol) i zagrevani su u ključalom vodenom kupatilu 5 minuta na 95°C. Ovaj tip elektroforeze vršen je na 4% koncentrišućem i 10% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu u puferu sledećeg sastava – 0,025M Tris, 10% SDS i 0,2M glicin, pH8 na oko 200V u trajanju od 45 minuta. Nakon završene elektroforeze gelovi su fiksirani u rastvoru koji se sastojao od 40% etanola, 10% glacijalne kiseline i 0.01% (w/v) Commassie Brilliant Blue R250 i vršena je detekcija traka bojenjem tokom noći. Standard za detekciju širokog opsega molekulskih masa proteina, Thermo scientific Page Ruler Unstained Protein Ladder 10-200 kDa, korišćen je za određivanje molekulskih masa proteina. Vertikalna mini gel elektroforeza (BioRad) korišćena je za elektroforezu. Denzitometrija u cilju određivanja molekulske mase proteinskih frakcija, vršena je u programu Denzitometrija Sigma Gel Jandel Corporation, verzija 1.0 (Zhao i sar., 2004; Houshdar Tehrani i sar., 2012).

4.14. Određivanje aminokiselinskog sastava gljiva

Aminokiselinski sastav plodonosnog tela gljiva određen je HPLC metodom (Turlo i sar., 2010). U 20mg uzorka dodato je 2mL 6M HCl i zatim je obavljena hidroliza u zatvorenim staklenim ampulama na 110°C u trajanju od 24h. Za detekciju selenometionina i metionina primenjen je postupak bazne hidrolize sa 5M NaOH (3mL u 20 mg uzorka) na 110°C u trajanju od 16h. Nakon hidrolize uzorci su neutralisani do pH 7.0, razblaženi 12x MiliQ vodom i filtrirani kroz filter otvora

0.45 μ m. Analiza je rađena na Shimadzu NEXERA UHPLC sistemu sa LC-30AD pumpama, SIL-30AC autosemplerom, diodnim detektorom SPD-M20A i CBM-20A kontrolerom. Derivatizacija uzoraka vršena je u autosempleru korišćenjem o-ftalaldehidnog (OPA) reagensa (50 mg OPA, 50 μ L β -merkaptotanol, 0.5mL boratnog pufera pH 9.5 i 4.5mL metanola). Postupak OPA derivatizacije bio je sledeći: U uzorak (230 μ L) dodato je 100 μ L boratnog pufera. U smešu je dodato 50 μ L OPA reagensa. Zatim je dodato 25 μ L 0.75M HCl i svi sastojci su izmešani. Uzorak zapremine 20 μ L injektovan je u uređaj i analiziran. Korišćena je Supelcosil LC-18-DB kolona (5 μ m čestica, 25 cm x 4.6 mm) proizvođača Supelco sa gradijentom 25-100% faze B (metanol) u trajanju od 48 minuta. Faza A je bio 50mM Na(CH₃COO) pufer pH 7.2 sa dodatkom 0.1% CH₃CN. Brzina protoka bila je 1.1 mL/min, uz zagrevanje kolone na 32°C, referentna talasna dužina 338nm i propusni opseg od 20nm. Sve hemikalije su bile HPLC čistoće, voda i metanol od proizvođača POCH, OPA od proizvođača ALFA AESAR, a ostale hemikalije od proizvođača MERCK. Sadržaj aminokiselina je računat na osnovu kalibracione krive. Aminokiselinski standard koncentracije 0.0125-0.1 μ mol/mL korišćen je za pravljenje kalibracione krive. Standardni rastvor aminokiselina 1mL, 2.5 μ mol/mL proizvođača SIGMA je mešavina L-asparaginske kiseline, L-glutaminske kiseline, L-serina, L-histidina, L-glicina, L-triptofana, L-arginina, L-alanina, L-tirozina, L-metionina, L-valina, L-fenola, L-izoleucina, L-leucina, L-lizina, a određen je i L-selenometionin. Za validaciju metode i računanje gubitka aminokiselina tokom hidrolize, standardi su pripremljeni na isti način kao i uzorci. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja i rezultati su predstavljeni tabelarno kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija.

4.15. Ispitivanje antifungalnog delovanja preparata Sel-Plex[®]

Antifungalno delovanje kvasca ispitivano je na sojevima plesni *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆, *Trichoderma harzianum* P₁T₆, *Mycogone perniciosa* P₁M₂, *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆ i *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃ dobijenih od Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine (Beograd, Srbija),

prethodno izolovanih iz različitih gajilišta šampinjona i bukovače u Srbiji. U cilju pripreme inokuluma za test, sve kulture plesni su gajene na sladnom agaru (Biolab, Mađarska) i inkubirane 7 dana na 25°C i 20°C za *Verticillium fungiola* var. *fungiola*.

Antifungalna aktivnost selenskog kvasca određena je korišćenjem difuzionog testa sa bunarićima u 90x14mm Petri-kutijama koje su imale 10 mL sladnog agara. Nakon hlađenja agara do sobne temperature, komadići micelije (5×5 mm), inokulisani su na petri ploče. Nakon dva dana razvijanja micelije, bunarići su napravljeni u agaru na 1cm od ivice micelije korišćenjem kork-borera prečnika 9mm i u njih su dodate ispitivane koncentracije kvasca. Novi fungicid "Dezohem" (Hemos, Srbija) korišćen je kao pozitivna kontrola. Destilovana voda je korišćena kao negativna kontrola. Kvasci su rastvoreni u destilovanoj vodi u koncentracijama 0, 25, 50, 100 i 150 µg Se/mL i sterilisani 121°C, 15 min. Petri ploče su inkubirane na 25±2°C i 20±2°C za *Verticillium fungiola* var. *fungiola* 48 sati koliko je bilo potrebno da micelija preraste kontrolni bunarić i formira zonu inhibicije oko bunarića sa ispitivanim preparatom (Ngai et. al., 2005).

Da bi se odredila IC₅₀ vrednost za antifungalno delovanje, tri koncentracije selenskog kvasca (50, 100 i 200 µg Se/mL sladnog agara) su dodate odvojeno u petri kutije. Kvašćev rastvor je pripremljen mešanjem sa sladnim agarom. Nakon sterilizacije, agar je ohlađen na 45°C, promešan i izliven u Petri kutije (10mL). Na agar ohlađen do sobne temperature inokulisani su komadi micelije (5×5 mm). Sladni agar bez dodatog preparata Sel-Plex[®] služio je kao negativna kontrola. Nakon 72 h vizuelno su ocenjeni rezultati i zone inhibicije su računate merenjem prečnika micelijarne kolonije (mm). Merenje je vršeno u tri različita smera, u 3 ponavljanja i prikazana je srednja vrednost. Procenat inhibicije rasta plesni određen je merenjem redukcije rasta micelije i poređenjem sa rastom na negativnoj kontroli. Grafički prikaz procenta redukcije micelijarnog rasta prema log dozi antifungalnog delovanja selenskog kaska izraženoj kao selen, korišćen je da se odredi doza inhibicije od 50%, IC₅₀ (Ngai et. al., 2005; Cabral i Cabral, 1995).

4.16. Statistička analiza podataka

Svi podaci su predstavljeni kao srednja vrednost tri merenja $\pm$ standardna greška. Za poređenje hemijskog sastava različitih sojeva gljive *Pleurotus spp.* urađena je statistička obrada podataka u programu za analizu jednofaktorijalne varijanse (ANOVA), a zatim je korišćen Fisher-ov LSD test sa 5% verovatnoće kako bi se definisalo između kojih sojeva gljive *Pleurotus* postoji razlika u hemijskom sastavu. Studentov t test sa 5% verovatnoće korišćen je za poređenje hemijskog sastava između kontrolne i gljive obogaćene selenom jednog soja gljive *Pleurotus*. Linearna regresiona analiza korišćena je za računanje IC_{50} vrednosti inhibitornog delovanja selenskog kvasca na antagonističke gljive. Korelacioni koeficijent, r , određen je za različite delove plodonosnog tela gljive sa selenom. Za statističku analizu korišćen je program MS Excel (Microsoft Office 2007 Professional).

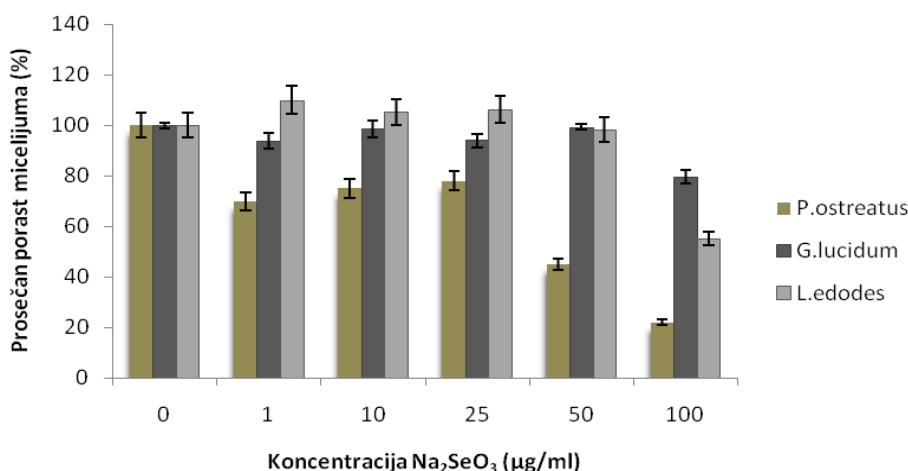
5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Određivanje brzine rasta micelije

Uticaj selen u obliku neorganskih soli na rast micelijuma gljiva i ranije je ispitivan (Tham i sar., 1999). U cilju nalaženja novog izvora ovog elementa koji će dobro uticati na prinos biomase i dobijanje vrednog dijetetskog suplementa, ispitivanja su nastavljena i korišćenjem organskih jedinjenja selen.

5.1.1. Uticaj natrijum selenita, (Na_2SeO_3) na rast micelijuma gljiva

Hemijsko jedinjenje natrijum selenit, Na_2SeO_3 pokazalo je različit uticaj na porast micelije ispitivanih sojeva gljiva pri dodatku različitih koncentracija u podlogu u odnosu na kontrolu (Slika 10).



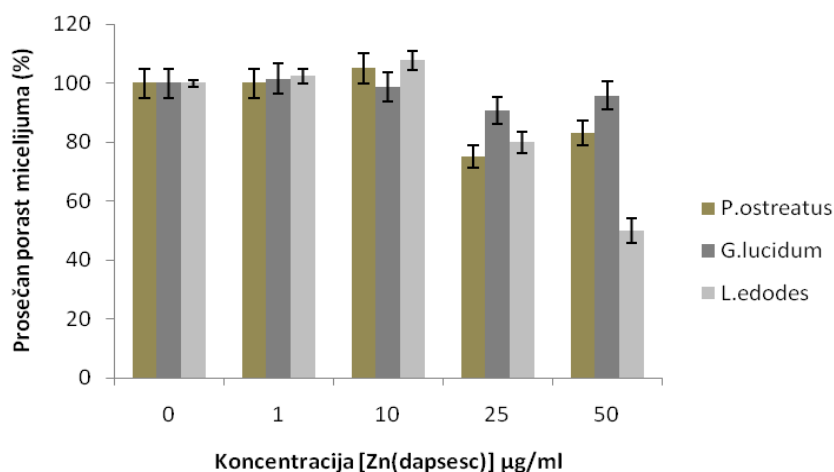
Slika 10. Grafički prikaz uticaja natrijum selenita na rast micelijuma gljiva (+/- st.dev)

Na_2SeO_3 u koncentracijama 1, 10 i 25 $\mu\text{g/mL}$ stimulisao je porast micelijuma gljive *L. edodes*. Veće koncentracije jedinjenja nisu inhibirale rast za 50% u odnosu na kontrolu. Sve koncentracije su inhibirale rast gljive *G. lucidum*, ali nijedna više od

27% u odnosu na kontrolu. Rast micelijuma gljive *P. ostreatus* bio je značajno inhibiran dodatkom selenita u sladni agar pri svim ispitivanim koncentracijama jedinjenja. Koncentracija preko 50 µg/mL selenita inhibirala je rast micelijuma ove gljive za više od 50%.

5.1.2. Uticaj kompleksa [Zn (dapsesc)] na rast micelijuma gljiva

Praćen je efekat kompleksnog jedinjenja sa selenom na rast micelijuma na sladnom agaru. Kompleks [Zn (dapsesc)] ispitivanih koncentracija 1, 10, 25 i 50 µg/mL nije značajno inhibirao porast micelijuma na agaru osim u slučaju gljive *L. edodes* (Slika 11).



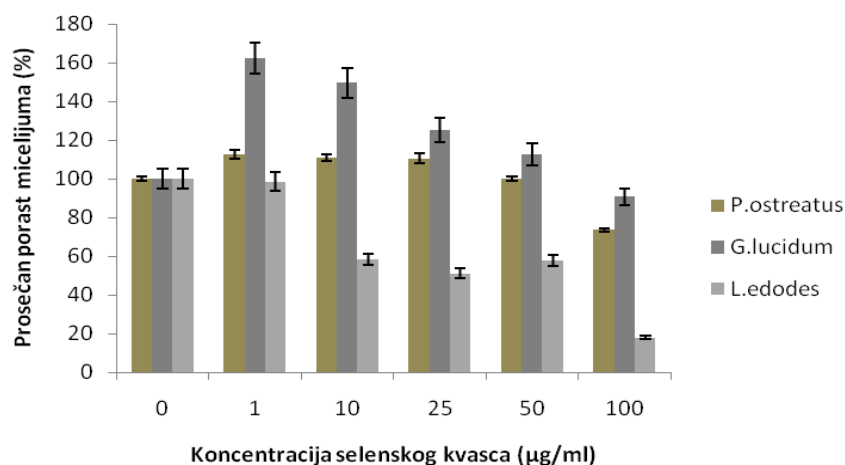
Slika 11. Grafički prikaz uticaja kompleksa [Zn (dapsesc)] na rast micelijuma gljiva (+/- st.dev)

Na dodatak kompleksnog jedinjenja najosetljivija gljiva bila je *L. edodes*, čiji rast je bio inhibiran za 50% u prisustvu 50 µg/mL kompleksa [Zn (dapsesc)]. *G. lucidum* je pokazala najveću otpornost na uticaj kompleksnog jedinjenja. U poređenju sa Na₂SeO₃ kao izvorom selena, *P. ostreatus* je bio mnogo otporniji prema kompleksnom jedinjenju. *G. lucidum* se ponašala gotovo isto u prisustvu oba seleno jedinjenja, dok je za *L. edodes* selenit bio bolji izvor selena.

U cilju poređenja rezultata, ispitivan je i uticaj liganda pojedinačno. Ligand je inhibirao porast micelijuma već pri nižim koncentracijama. Uočena je veća aktivnost kompleksa u odnosu na ligand, verovatno kao posledica nejonske prirode kompleksa, što verovatno olakšava njihovu difuziju kroz biološku membranu, čime se opravdavaju buduće studije o biološkom efektu kompleksa (Todorović i sar., 2007).

5.1.3. Uticaj selenskog kvasca na rast micelijuma gljiva

Kao i u slučaju dodatog kompleksa [Zn(dapsesc)], rast gljive shiitake bio je značajno inhibiran već pri dodatku selenskog kvasca u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$. Za razliku od shiitake, selenski kvasac je na gljivu *G. lucidum* pokazao stimulatивно delovanje, pri čemu ni najviše koncentracije nisu inhibirale rast ove gljive. Takođe, ni gljiva *P.ostreatus* nije bila značajno inhibirana pri dodatku većih koncentracija selena, svega za oko 20% u odnosu na kontrolu (Slika 12).



Slika 12. Grafički prikaz uticaja selenskog kvasca na rast micelijuma gljiva (+/- st.dev)

Pretpostavka je da kvasac, koji se inače dodaje u podlogu za rast gljiva, stimulatивно utiče i potpomaže rast micelijuma gljiva, a kao izvor azota i drugih mineralnih materija. Zato je ovaj način dodavanja selena izabran za dalja istraživanja jer se komercijalni preparat Sel-Plex[®] može koristiti kao bezbedan izvor selena.

Rast micelijuma meren je kao prečnik kolonije čiste kulture na agaru sa dodatkom različitih koncentracija jedinjenja sa selenom. Micelijum gljive *P. ostreatus* bio je najotporniji na selen iz selenskog kvasca. Jedino je najveća koncentracija jedinjenja od 100µg/mL inhibirala rast micelijuma i to za svega oko 20%. Manje koncentracije su stimulisale rast micelije. Neorganska so, natrijum selenit je delovala najtoksičnije na rast micelijuma bukovače. Snažno inhibitorno delovanje primećeno je već pri najmanjim koncentracijama. Kompleksno jedinjenje u manjim koncentracijama je takođe delovalo stimulatивно na rast micelijuma gljiva. Rast micelijuma gljive *G. lucidum* bio je stimulisan neorganskim jedinjenjem selena. Takođe, kompleks i selenski kvasac su dobro uticali na rast *G. lucidum*, a najveću stimulaciju pokazao je selenski kvasac. Za rast gljive *L. edodes*, najbolji izvor selena bio je natrijum selenit. Kompleksno jedinjenje, a naročito Sel-Plex[®] nisu bili zadovoljavajući izvor selena zbog velikog inhibitornog delovanja na rast micelijuma već pri nižim koncentracijama.

Zbog ovakvih rezultata preliminarnih testova, za dalje istraživanje kao model gljiva izabrana je bukovača, inače među najpopularnijim gljivama na našim prostorima, jednostavna za gajenje i sa dobrim odgovorom na dodatak organskih jedinjenja selena u podlogu za rast.

5.2. Usvajanje selena u plodonosna tela gljive *Pleurotus spp.*

Usvajanje i prisustvo metala u plodonosnom telu gljiva zavisi od ekoloških faktora, genetskih karakteristika svake vrste pojedinačno, starosti gljive, kao i oblika u kome se elementi nalaze u zemljištu. Od osobina supstrata zavise mobilnost i dostupnost metala. Istraživanja ukazuju na to da gljive koje su rasle u zagađenim krajevima ne bi trebalo uopšte da se koriste za ishranu (Svoboda i sar., 2000). Sastav supstrata je važan faktor, ali postoje velike razlike u usvojivosti metala za svaku vrstu individualno (Kalac i Svoboda, 2000). Najčešće detektovana vrednost za sadržaj selena u plodonosnom telu gljiva je < 2 mg/kg suve mase gljive (Kalac, 2010). U ranijim istraživanjima, korišćen je uglavnom selen u obliku selenita i selenata.

U ovom radu je ispitivana mogućnost akumulacije i transformacije selen iz selenita, selenskog kvasca i kompleksnog jedinjenja selenosemikarbazona u plodonosno telo gljive *P. ostreatus* P70. Kod drugih ispitivanih sojeva praćena je samo mogućnost usvajanja selen iz selenskog kvasca kao odabranog izvora selen.

Analitički instrumenti kao što su AAS, ICP-OES i ICP-MS, omogućili su detekciju veoma niskih koncentracija mikronutrijenata, uključujući i one bez do sada utvrđenog biološkog značaja. Instrument optički emisioni spektrometar sa indukovano spregnutom plazmom, ICP – OES, našao je široku promenu pre oko 25 godina za organske i neorganske analize. Tehnika koju ICP koristi za merenje uzoraka je optička emisiona spektrofotometrija (OES) tj., aparat radi na principu emisije svetlosti.

5.2.1. Usvajanje selen iz neorganskih soli u plodonosno telo gljive *Pleurotus ostreatus* P70

Forma i koncentracija dodatog selen u supstratu važan su faktor u proizvodnji selenom obogaćenih gljiva. Najpoželjniji izvor Se u dosadašnjim ispitivanjima je neorganska forma (Zhao i sar., 2008; Stajić i sar., 2006). Dobijeni rezultati ukazuju na to da ispitivani sojevi gljive *Pleurotus* imaju različite mogućnosti usvajanja selen iz medijuma gde je selen prisutan u obliku Na_2SeO_3 i u različitim koncentracijama. Rezultati dobijeni ICP-OES analizom ukazuju na to da je selen iz Na_2SeO_3 koncentracije 100 mg/kg efektno usvojen iz supstrata i akumuliran u plodonosna tela (Tabela 7). Uspešna akumulacija selen iz selenita u plodonosna tela gljiva *Ganoderma lucidum* i *Pleurotus florida* ranije je dokazana (Zhao i sar., 2004; Bhatia i sar., 2013). Micelija je normalno rasla i primordije soja *P. ostreatus* P70 su se pravilno formirale. Nije uočena razlika u morfologiji plodonosnog tela bez i sa dodatim selenom.

Tabela 7. Usvajanje selen iz neorganskih soli u plodonosno telo gljive
P. ostreatus P70

Koncentracija soli	Koncentracija selen u gljivi <i>P. ostreatus</i> P70 (µg/g suve mase) ^a		
	Plodonosno telo	Šešir	Drška
Deo gljive			
Kontrola	0.8±0.1	NA	NA
100 mg Se/kg	127.4±10.3	197.2±7.4	58.9±1.3

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

NA = Nije analizirano

P. ostreatus P70 je usvojila oko 120 µg Se/g suve mase. Gljive bez dodatog selen sadržale su oko 1 µg Se/g suve mase gljive. Prikazani rezultati odnose se na gljive iz prvog fruktifikacionog talasa. Plodonosna tela dobijena u drugom talasu imala su oko 50% manje Se od onih u prvom talasu (Da Silva i sar., 2012). Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da šešir usvaja selen u većoj koncentraciji nego drška (Falandysz, 2008; Thomet i sar., 1999), što ukazuje na nejednaku distribuciju selen u plodonosnom telu gljive tokom fruktifikacije.

5.2.2. Usvajanje selen iz kompleksnog jedinjenja [Zn (dapsesc)] u plodonosno telo gljive *Pleurotus ostreatus* P70

Malobrojne studije ukazuju na sličnu ili veću biološku aktivnost selenosemikarbazona u poređenju sa sumpornim analogom, dok su kiseonični analozi pokazali nižu aktivnost. Semikarbazoni i selenosemikarbazoni su izučavani sa stanovišta njihove antitumorne, antiviralne i antimikrobne prirode (Todorović i sar., 2007). Selen je iz organskog kompleksnog jedinjenja uspešno usvojen i akumuliran u plodonosna tela gljive. Sadržaj selen u obogaćenoj gljivi bio je prosečno 65 µg/g. U kontrolnim pečurkama, sadržaj selen u proseku je bio oko 0.4 µg/g suve mase. Nije primećena razlika u izgledu plodonosnih tela sa i bez dodatog selen (Tabela 8).

Tabela 8. Usvajanje selen iz [Zn (dapsesc)] u plodonosno telo gljive
P. ostreatus P70

Koncentracija kompleksa	Koncentracija selen u plodonosnom telu <i>P. ostreatus</i> P70 (µg/g suve mase) ^a
Kontrola	0.4 ± 0.1
50 mg Se/kg	65.0 ± 0.7

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

Poređenje uticaja neorganskog i organskog izvora Se izvedeno je dodavanjem poznatih koncentracija neorganske soli Na₂SeO₃, kao i organskog [Zn (dapsesc)] u supstrat za gajenje *Pleurotus ostreatus*. Poredeći dobijene rezultate iz ovog rada sa ranije publikovanim rezultatima, može se zaključiti da je organsko jedinjenje dobar izvor selen (Dernovics i sar., 2002). Da bi se selen iz neorganskih soli inkorporirao u proteine u obliku selenoproteina, potrebno je da se selenat i selenit redukuju do selenida. Sa druge strane, organsko kompleksno jedinjenje [Zn (dapsesc)] sadrži dva atoma selen i pretpostavlja se da je omogućen unos veće količine selen. S obzirom na dobijene rezultate, cilj ovog istraživanja je bio nalaženje novog izvora selen, po mogućstvu organskog netoksičnog i ispitivanje mogućnosti akumulacije selen u veći broj različitih sojeva gljiva.

5.2.3. Usvajanje selen u obliku selenskog kvasca u plodonosna tela gljive *Pleurotus spp.*

Dobijeni rezultati (Tabela 9) ukazuju na to da testirane vrste gljiva imaju različitu mogućnost apsorpcije selen dodatog u supstrat u formi selenskog kvasca. Micelija se normalno razvijala i do fruktifikacije je došlo između 23. i 28. dana od momenta inokulacije kod gljiva bez dodatka i sa dodatkom nižih koncentracija selen. Fruktifikacija je kasnila 3-5 dana kod uzoraka sa dodatim selenskim kvascem u koncentraciji višoj od 50mg/kg Se.

Tabela 9. Usvajanje selena iz selenskog kvasca u plodonosno telo gljive
P. ostreatus P70

Koncentracija preparata	Koncentracija selena u plodonosnom telu gljive ($\mu\text{g/g}$ suve mase) ^a			
Gljiva	PO P70	PO P80	PC	PS
Kontrola	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.5
100 mg Se/kg	133.1 ± 2.4	137.8 ± 2.3	122.1 ± 2.0	197.9 ± 8.4
PO= <i>Pleurotus ostreatus</i> ; PC= <i>Pleurotus cornucopiae</i> ; PS= <i>Pleurotus salmoneostramineus</i>				

^a Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija ($n = 3$).

Rezultati ranijih istraživanja (Racz i sar., 2000; Pipponen i sar., 1984; Spolar i sar., 1999) ukazuju na značajnu korelaciju između koncentracije selena u supstratu i u plodonosnom telu. Prosečan sadržaj selena u plodonosnom telu kontrolne gljive bio je između 0.12 i 0.68 $\mu\text{g/g}$ što je dosta niska vrednost i potvrđuje inicijalnu tvrdnju da su supstrat iz nezagađenih delova prirode i gljive koje rastu na njemu siromašne selenom. Najviša koncentracija (100 mg/kg Se) ispitivana na *P. ostreatus* P70, rezultirala je dobijanjem plodonosnog tela sa prosečnim sadržajem selena 133.12 $\mu\text{g/g}$ suve mase. Toksični efekat na porast gljive primećen je sa dodatkom organskog selena koncentracije 75 $\mu\text{g/g}$ Se. Uočena je značajna razlika u usvojivosti selena ($P < 0.05$) u odnosu na industrijski gajene gljive *P. cornucopiae* i *P. salmoneostramineus* (Mycorex, Cyprus), osim u odnosu na gljivu *P. ostreatus* P80. Ukupan sadržaj selena je bio najveći kod soja *P. salmoneostramineus*, zatim *P. ostreatus* P80, a najslabiju akumulaciju pokazao je *P. cornucopiae* koji je pokazao dobru mogućnost usvajanja selena, ali slabiju u odnosu na druge ispitivane sojeve. Kada su u supstrat dodavane niže koncentracije od 25 $\mu\text{g/g}$ selena, primećena je slična akumulacija kod sva tri ispitivana soja. Niže koncentracije selena u supstratu ($< 100 \mu\text{g/g}$) podstiču sintezu proteina i aminokiselina dok više koncentracije imaju suprotan efekat (Zhao i sar., 2008; Ming i sar., 2007). Iako rezultati ovog istraživanja pokazuju da gljiva uspešno usvaja selen iz selenita i kompleksa

selenosemikarbazona, korišćenje selenskog kvasca je potencijalni izvor Se kojem se daje prednost. Izloženost neorganskim jedinjenjima Se izaziva kratkoročne i dugoročne zdravstvene probleme kod čoveka (Sunde i Diamond, 2012; Food and Nutrition Board, 2000). Selenski kvasac je mnogo sigurniji izvor Se. Primenjuje se u ishrani životinja, a primenom u gajenju gljiva obezbeđuje željene koncentracije koje zadovoljavaju dnevne potrebe za selenom i predstavlja izvor azota neophodan za rast gljiva (Dernovics i sar., 2002). Dodatkom visokih koncentracija Sel-Plex[®] u supstrat, 70-100 mg/kg Se, selen usporava rast gljiva 3-5 dana, ali plodonosna tela usvajaju više selena, u proseku oko 100 µg/g za *Pleurotus spp.* računato na suhu masu uzorka.

Zanimljivo je da je sadržaj selena znatno veći u plodonosnom telu gljive *P. salmoneostramineus* nego u plodonosnim telima ostalih ispitivanih pečuraka, što se najverovatnije može tumačiti njegovom specifičnom strukturom u odnosu na ostale ispitivane vrste. Takođe, jedino između gajene gljive *P. ostreatus* sojeva P70 i P80 nije bilo statistički značajne razlike u usvojivosti selena iz selenskog kvasca, verovatno zbog toga što pripadaju istoj vrsti. Naučnim istraživanjem je utvrđeno da suplementi na bazi selena povećavaju antioksidativnu aktivnost i time sprečavaju proces lipidne peroksidacije (Akil i sar., 2011). Sadržaj selena u plodonosnom telu gljiva, pored relativno visokog sadržaja fenolnih komponenata, mogao bi biti odgovoran i za njegovo protektivno delovanje u procesu lipidne peroksidacije (Turlo i sar., 2010).

5.3. Nutritivni sastav gljiva sa selenom

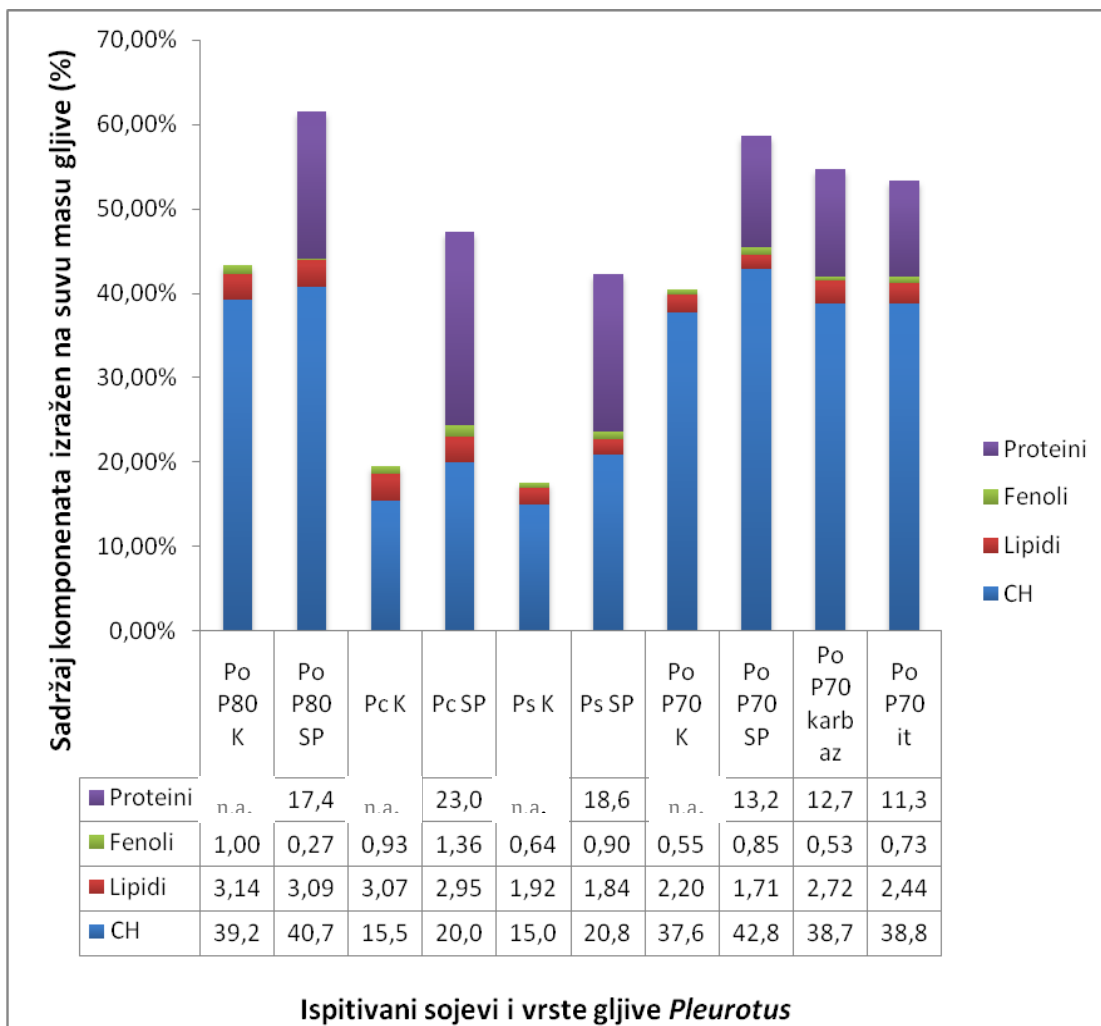
Sa nutritivnog aspekta, gljive su vrlo važne komponente u ljudskoj ishrani zbog visokog sadržaja proteina i niskog sadržaja masti (Agahar-Murugkar i Subbulakshmi, 2005). Gljive sadrže visokokvalitetne proteine, vitamine i minerale u poređenju sa voćem i povrćem (Satish i sar., 2006). Popularne su kao delikatesne namirnice najviše zbog svoje prijatne arome. Ispitivanjem je utvrđeno da suve gljive ili generalno gljive nakon termičkog tretmana menjaju odnos nutritivnih komponenata u plodonosnom telu (Ouzouni i sar., 2009). Nekoliko vrsta gljive *Pleurotus* imaju veoma važna medicinska svojstva (Chang, 1996; Hossain i sar.,

2003; Yoshioka i sar., 1985). Nutritivni sastav gljiva uslovljen je brojnim faktorima uključujući razlike među sojevima, sastavom proizvodnog supstrata, metodom kultivacije, fazom branja, delom plodonosnog tela gljive koji se analizira (Benjamin, 1995). Nekoliko kategorija antioksidanasa uključujući fenolna jedinjenja, vitamine, proteine, peptide i aminokiseline, koriste se kao sastojci u proizvodnji dijetetskih suplemenata, a ispituju se zbog potencijalne primene za preventivu oboljenja kao što su tumor i srčana oboljenja, ali i za jačanje imuniteta (Griensven, 2000). Pored drugih izvora antioksidanasa (lekovito bilje, voće, povrće i drugo) gljive takođe imaju značajnu ulogu. Antioksidativna aktivnost ekstrakta gljiva je povezana sa polisaharidnim sastavom kao i fenolnim jedinjenjima (Klaus i sar., 2011; Kozarski i sar., 2011). Vodeni ekstrakti gljiva sadrže mešavinu ovih komponenata uključujući i proteine malih molekulskih masa kao što su lektini koji takođe imaju biološku aktivnost (Wang i sar., 2000). Najvećim delom bioaktivni polisaharidi su β -(1,3) i (1,6)-glukani, mada je dokazano da i α -glukani imaju značajnu biološku aktivnost (Klaus i sar., 2013). Neki od biokativnih glukana su heteropolisaharidi, koji ako su vezani za proteine ili peptide formiraju proteoglukane (Bohn i Be Miller, 1995).

Rezultati ovog istraživanja su doprinos saznanju o mogućnosti akumulacije i transformacije usvojenog selena iz supstrata u obliku organskih i neorganskih jedinjenja selena. Ispitivan je hemijski sastav gljiva da bi se utvrdio uticaj selena na eventualne promene u hemijskom sastavu i da bi se pratile transformacije usvojenog selena u plodonosnom telu. Određen je ukupan sadržaj ugljenih hidrata, proteina, lipida i fenola i meren je ukupan sadržaj selena u proteinima i polisaharidima u kojima se akumulira najviše selena. Prilikom planiranja eksperimenata vrlo važnu ulogu je imala činjenica da nutritivni sastav gljiva direktno zavisi od vrste gljive i postupka gajenja (Diez i Alvarez, 2001; Bano i Rajarathnam, 1988). U eksperimentima su korišćena osušena plodonosna tela gljive. Sušenjem gljive dolazi do uklanjanja vode i promene u nutritivnom sastavu. Međutim, ovo može da bude posledica interakcija različitih komponenata, hemijskih reakcija i termičke degradacije kao i hemijskog vezivanja selena za različita jedinjenja. Analiziran je prinos svake komponente pojedinačno.

5.3.1. Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u gljivama

Određen je ukupan sadržaj ugljenih hidrata u plodonosnom telu gljiva bez i sa dodatim selenom. Pošlo se od pretpostavke da će selen uticati na promenu sadržaja ugljenih hidrata. Dobijeni rezultatu ukazuju na značajno povećan sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u svim gljivama sa dodatim selenom (Slika 13). Kod svih ispitivanih sojeva gljiva sadržaj ukupnih ugljenih hidrata se statistički značajno razlikovao od onog kod kontrolnog uzorka ($p < 0.05$). Gljive obogaćene selenom iz kvasca imale su i do 25% više ukupnih ugljenih hidrata. Pri posmatranju uticaja različitih jedinjenja selena na model gljivi *P. ostreatus* P70, utvrđeno je da prisustvo selena iz organskog jedinjenja utiče na povećanje sadržaja ugljenih hidrata više nego neorgansko jedinjenje (38.83%) ili kompleks (38.73%) kod kojih razlika u sadržaju ukupnih ugljenih hidrata između kontrolnog (37.66%) i obogaćenog uzorka nije statistički značajna. Jednofaktorijskim ANOVA testom dobijene su vrednosti koje ukazuju na statistički značajnu razliku u sadržaju ugljenih hidrata ($p < 0.05$) između svih sojeva bukovače sa dodatim selenom. Dobijeni rezultati su suprotni onim do kojih je došla Turlo sa saradnicima (2010), istraživanjima na micelijumu *L. edodes* sa selenom dodatim iz neorganske soli. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na znatno smanjenu rastvorljivost ugljenih hidrata kada je za njih vezan selen. Moguće je da na ovo imaju uticaj različite vrste gljiva, jedinjenja selena kao i razlike između vegetativnog i plodonosnog dela gljive. Dobijeni rezultati potvrđuju da se selen vezuje za ugljene hidrate. Dobijene vrednosti su u skladu sa ranije publikovanim sadržajem ugljenih hidrata u *Pleurotus spp.* 36.9-45.9% (Barros i sar., 2008; Kurtzman, 1997; Yang i sar., 2001; Khan i sar., 2008). Navedeni podaci ukazuju na to da između sojeva jedne vrste nema značajne razlike u sadržaju ukupnih ugljenih hidrata (Khan i sar., 2008).



PO=*Pleurotus ostreatus*; PC=*Pleurotus cornucopiae*; PS=*Pleurotus salmoneostramineus*

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac; Karbaz- [Zn(dapsesc)]; it-Natrijum selenit

n.a. – Nije analizirano; CH- Ugljeni hidrati

Slika 13. Nutritivni sastav plodonosnog tela gljive *Pleurotus* spp. sa i bez dodatog selena

5.3.2. Određivanje sadržaja vodorastvornih proteina u gljivama

Sadržaj proteina zavisi od vrste gljive, supstrata na kome se razvijaju i vremena sakupljanja, a kod suvih gljiva iznosi 19-39% u odnosu na suhu masu plodonosnog tela gljive (Miles i Chang, 1997; Chan, 1991). Gljive bi trebalo da se беру kada su iste starosti, kasnije se aktiviraju proteinaze pa se često prilikom ekstrakcije proteina dodaju inhibitori proteinaza. Svaka proteinska frakcija ima jedinstven aminokiselinski sastav što uslovljava njihova različita svojstva. Izolovanje i prečišćavanje nativnih proteina je pravi izazov, naročito kada je reč o membranski vezanim proteinima. Prva faza u kojoj može da se izvrši grubo frakcionisanje je ekstrakcija pomoću odgovarajućeg pufera. S obzirom na to da se dobija rastvor različitih proteina, dalje se primenjuje taloženje i rastvorni proteini prelaze u agregate koji su dovoljno veliki da se mogu dalje odvojiti centrifugiranjem. Taloženje proteina organskim rastvaračima (etanolom ili acetonom) zasniva se na smanjenju aktivnosti vode kojom je okružen molekul proteina. Kako je time dielektrična konstanta rastvora smanjena, povećavaju se elektrostatičke interakcije među polarnim delovima različitih molekula proteina, što dovodi do njihovog agregiranja i taloženja (Niketić, 2007). Ekstrakcija acetonom je prva metoda kojom se efikasno uklanjaju soli, šećeri i lipidi uz koncentrisanje proteina. Jedini problem je teška rastvorljivost dobijenog taloga kao i to što mnogi lipidi i fenoli visoke polarnosti zaostaju kao kontaminanti (Pavličević i sar., 2013).

Razlika u sadržaju proteina najpre je posledica razlika u vrsti, ali i u proizvodnom supstratu i uslovima gajenja gljive (Slika 13). Najvažniji korak u pripremi proteinskih ekstrakata je razaranje ćelijskog zida i oslobađanje proteina (Ausubel i sar., 1991). Ekstrakcija nekih uobičajeno prisutnih molekulskih jedinjenja u ćelijskom zidu gljive može biti blokirana (Bridge i sar., 2004). Proteini su takođe često vezani za ćelijski zid, membranu ili organele i predstavljaju citoskeletne proteine, te se tokom uobičajenog postupka ekstrakcije gube. To je još jedan razlog niskog sadržaja dobijenih proteina (Lau i sar., 2012). U supernatantu će se najvećim delom naći citoplazmatični proteini.

Osim proteina, ekstrakcijom se dobijaju i lipidi i delovi ćelijskog zida koji mogu da blokiraju proces pripreme otežavajući ekstrakciju proteina iz uzorka

(Dernovics, 2003). Jednofaktorijskim ANOVA testom utvrđeno je da postoji značajna razlika u proteinskom sadržaju između različitih sojeva sa dodatim selenom iz kvasca. Takođe je utvrđeno i da različita jedinjenja kod *P. ostreatus* P70 dovode do značajne razlike u sadržaju proteina ($P < 0.05$). Fisher-ovim LSD testom, dokazano je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju vodorastvornih proteina između *P. cornucopiae* SP (23%) i *P. ostreatus* P80 SP (17.4%), *P. ostreatus* P70 SP (13.24%). Jedino je kod gljive *P. ostreatus* P70 obogaćene selenom iz neorganske soli sadržaj proteina (11.32%) bio značajno niži u odnosu na kontrolu. Dokazano je da dodavanje nižih koncentracija selena utiče na povećanje koncentracije proteina u uzorku dok dodatak vrlo visokih koncentracija ima suprotan efekat.

Rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Barros i sar., 2008; Kurtzman, 1997; Yang i sar., 2001; Khan i sar., 2008 za sadržaj neprečišćenih proteina u gljivi od oko 11%, u *P. sajor-caju* (16.6-24 %), *P. ostreatus* (11-47.1 %), *P. highking* (21.9%), *P. florida* (12.5-20.6 %), *P. geestaranus* (19.0 %), *P. citrinopileatus* (16.7 %) i *P. cystidiosus* (15.4-17.7 %). Vrednosti su izražene u odnosu na suhu masu gljive.

5.3.3. Određivanje sadržaja lipida u gljivama

U lipidnim ekstraktima gljiva, ukupni lipidi uključuju nekoliko klasa jedinjenja: slobodne masne kiseline, trigliceridi, steroli, estri i fosfolipidi. Neke vrste imaju naročito veliki sadržaj ergosterola koji je prekursor vitamina D₂. Lipidni sadržaj u gljivama varira uglavnom između 2 i 6% izražen na suhu masu gljive (Ouzouni i sar., 2009). Ugljeni hidrati, proteini, urea i druga jedinjenja mogu da ometaju lipidnu ekstrakciju.

Sadržaj lipida je u kontrolnim gljivama bio između 1.92-3.42%, a u gljivama sa dodatim selenom 1.71-3.09% (Slika 13). Generalno, nije postojala statistički značajna razlika između uzoraka sa i bez povećanog sadržaja selena ($P < 0.05$). Kod svih ispitivanih sojeva, pri dodatku selena iz selenskog kvasca došlo je do smanjenja sadržaja lipida, međutim kod *P. ostreatus* P70 sa dodatkom selena iz kompleksa ili neorganske soli, sadržaj ukupnih lipida je bio veći u odnosu na kontrolne uzorke kao

što su Turlo i saradnici (2010) publikovali. Isti autori su proučavajući nutritivni sastav micelije *L. edodes* gljive sa dodatim selenom došli do zaključka da se dodatkom selena povećava sadržaj selena u lipidima i to u obliku Se⁺⁴.

Sadržaj lipida u *Pleurotus* vrstama je u opsegu 2.6-8% izraženo na suvu masu gljive (Khan i sar., 2008; Manzi i sar., 2004; Yang i sar., 2001). Lipidni sastav zavisi od soja i vrste gljive. Gljiva *P. ostreatus* P80 sa selenom se statistički značajno razlikovala od *P. cornucopiae* i *P. ostreatus* P70 od *P. salmoneostramineus* u sadržaju ukupnih lipida.

5.3.4. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u gljivama

Fenolna jedinjenja su zahvaljujući svojoj hemijskoj strukturi poznati kao antioksidativni agensi. U dosadašnjem istraživanju, utvrđeno je da gljive uglavnom sadrže između 0 i 2.5 % fenola izraženo na suvu masu (Wajdylo i sar., 2007, Klaus i sar., 2011; Kozarski i sar., 2011).

Ukupan sadržaj fenola u svim uzorcima gljiva sa dodatim selenom bio je znatno viši (30-40%) u odnosu na kontrolne uzorke gljiva ($p < 0.05$), osim u slučaju dodavanja kompleksa [Zn(dapsesc)] kod gljive *P. ostreatus* P70 (Slika 13). Povećan sadržaj fenola može da bude u vezi sa inhibicijom enzima polifenoloksidaze seleno-komponentama kao snažnim antioksidantima (Turlo i sar., 2010). Zbog toga se pretpostavlja da su gljive sa selenom snažniji antioksidanti u odnosu na gljive bez dodatog selena.

Rezultati prikazani na slici 4.4. ukazuju na to da *P. ostreatus* P80 ima najniži sadržaj fenolnih jedinjenja, 1.03 mg/g u kontrolnoj i 2.75 mg/g u obogaćenoj gljivi, dok žuta bukovača, *Pleurotus cornucopiae* ima najviši sadržaj fenola, 9.29 mg/g u kontrolnoj i 13.59 mg/g u obogaćenoj gljivi. Kod *P. ostreatus* P70 određen je sadržaj fenolnih jedinjenja u kontrolnom uzorku, ali i u plodonosnom telu gljiva sa dodatkom selena iz selenskog kvasca, kompleksa [Zn(dapsesc)] i natrijum selenita. Kompleksno jedinjenje je uticalo na smanjenje sadržaja fenola u plodonosnom telu gljive, ali ne značajno u odnosu na kontrolu, dok se selenski kvasac pokazao najbolje

u ovom slučaju i doprineo povećanom sadržaju fenola u odnosu na oba - kontrolni i uzorak obogaćen selenom iz neorganske soli.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen Folin-Ciocalteu metodom ne mora dati precizne podatke o količini ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima, zbog mogućeg prisustva interferirajućih jedinjenja, odnosno jedinjenja koja reaguju na isti način kao fenolna jedinjenja u ovoj reakciji (poput šećera, aromatičnih amina, vitamina C, organskih kiselina, Fe^{+2} , itd.) (Singelton i sar., 1999).

5.4. Hemijska karakterizacija polisaharidnih ekstrakata sa selenom

Na osnovu analiza sastava gljive *G.lucidum* obogaćene selenom iz selenita, dokazano je da gljiva prevodi usvojen selen u organsku formu inkorporirajući ga najvećim delom u proteine (56-61%) i polisaharide (11-20%). Takođe je dokazano da su jedinjenja proteina i polisaharida rastvorna u vodi i alkalnim rastvaračima glavna skladišta selena u višim gljivama (Zhao i sar., 2004). Da bi se pratila transformacija usvojenog selena u plodonosnom telu gljive, urađena je hemijska karakterizacija neprečišćenih vrelih vodenih i alkalnih ekstrakata polisaharida.

Određivan je ukupan sadržaj selena, ugljenih hidrata, β -glukana, proteina i fenola u polisaharidnim ekstraktima. Takođe je urađena strukturna analiza ekstrakata FT-IR spektroskopijom i određen je monosaharidni sastav HPLC metodom.

5.4.1. Prinos polisaharidnih ekstrakata

Na prinose svih ispitivanih ekstrakata polisaharida bez i sa selenom, značajno su uticali primenjeni procesi ekstrakcije i koncentracija selena u uzorku. Nakon obogaćivanja gljiva selenom, primećeno je značajno smanjenje prinosa polisaharidnih ekstrakata, kako vodenih tako i alkalnih (Tseng i sar., 2005). Smanjenje prinosa, najverovatnije je posledica vezivanja selena za polisaharide, čime se smanjuje njihov sadržaj (Turlo i sar., 2010). Kod svih ekstrakata, primećena je negativna korelacija između prinosa ekstrakata i sadržaja selena u uzorcima gljiva. Kod gljiva soja *P. ostreatus* P70 koje su obogaćene selenom iz neorganske soli, prinos ekstrakta bio je veći nego kod uzoraka sa selenom dodatim iz organskih

jedinjenja. Prinos polisaharida dobijenih vrelom alkalnom ekstrakcijom bio je viši u odnosu na prinos ekstrakta dobijenih vrelom vodenom ekstrakcijom. Pretpostavlja se da je razlog ovome to što je vreli alkalni tretman bio efektivniji u degradaciji ćelijskog zida i ekstrakciji nerastvornih komponenti koje su zaostale nakon izdvajanja u vodi rastvornih polisaharida. Vreli alkalni polisaharidni ekstrakti dobijeni su ekstrakcijom polisaharida iz taloga koji je zaostao nakon vrelе vodene ekstrakcije (Klaus i sar., 2011; Klaus i sar., 2013; Malinowska i sar., 2009).

5.4.2. Ukupan sadržaj selenа u ekstraktima polisaharida

Ispitivanjem sadržaja ukupnog selenа u vrelim vodenim polisaharidnim ekstraktima gljiva, uočeno je da se vrlo visok sadržaj selenа zadržava u polisaharidima (Tabela 10). S obzirom na to da su ovo neprečišćeni ekstrakti očekivan je visok sadržaj selenа u njima. Između svih selenom obogaćenih ekstrakata polisaharida, primećena je statistički značajna razlika u sadržaju selenа ($P < 0.05$). Kod uzorka *Pleurotus ostreatus* P70 koji je odgajen pod laboratorijskim uslovima, prikazan je sadržaj selenа u polisaharidima dobijenim korišćenjem selenita, [Zn(dapsesc)] kao i selenskog kvasca (Tabela 10). Polisaharid izolovan iz gljive *P. ostreatus* P70 obogaćene selenom iz kvasca, imao je najviši sadržaj selenа, 66,61 $\mu\text{g/g}$ što je preko 60 puta više nego u kontrolnom uzorku (oko 1 $\mu\text{g/g}$). Poredeći rezultate dobijene za polisaharide izolovane iz plodonosnog tela gljive obogaćene selenom iz neorganske soli (52.11 $\mu\text{g/g}$), može se zaključiti da je iz organskog izvora selen u većoj meri inkorporiran u polisaharid. Posmatrajući polisaharidne ekstrakte izolovane iz gljive obogaćene selenom iz kompleksnog jedinjenja [Zn(dapsesc)], zaključeno je da su polisaharidi vezali 29.96 $\mu\text{g/g}$ suve mase ekstrakta.

Poredeći rezultate dobijene za sojeve gljiva obogaćene selenom iz kvašćevog preparata, koncentracija selenа u obogaćenim uzorcima bila je značajno veća u odnosu na kontrolne uzorke. Između svih uzoraka, postojala je statistički značajna razlika u koncentraciji selenа ($P < 0.05$), ali je dokazana vrlo visoka korelacija ($r = 0.895$) u sadržaju usvojenog selenа kod celih gljiva i njihovih vodenih ekstrakata.

Tabela 10. Ukupan sadržaj selen u neprečišćenim vrelin vodenim polisaharidnim ekstraktima gljiva *Pleurotus spp.*

Rezultati su izraženi u µg Se/g suve mase.

	POP70 K	POP70 SeO ₃ ²⁻	POP70 Karbaz	POP70 SP	POP80 K	POP80 SP	PC K	PC SP	PS K	PS SP	r
Se µg/g	0.9±0.1	52.1±0.2 ^{A*}	29.9±2.6 ^B	66.6±1.1 ^C	0.3±0.3	102.1±1.5 ^D	0.5±0.1	51.8±0.5 ^E	0.8±0.1	155.6±4.1 ^F	0.895

Tabela 11. Ukupan sadržaj selen u neprečišćenim vrelin alkalnim polisaharidnim ekstraktima gljiva *Pleurotus spp.*

Rezultati su izraženi u µg Se/g suve mase.

	POP70 K	POP70 SeO ₃ ²⁻	POP70 Karbaz	POP70 SP	POP80 K	POP80 SP	PC K	PC SP	PS K	PS SP	r
Se µg/g	0.9±0.0	16.4±2.1 ^A	34.9±0.5 ^B	28.1±0.3 ^{DC}	0.3±0.1	30.1±0.1 ^{DE}	0.5±0.1	29.0±0.2 ^{DF}	0.7±0.0	40.7±0.4 ^D	0.725

PO=*Pleurotus ostreatus*; PC = *Pleurotus cornucopiae*; PS = *Pleurotus salmoneostramineus*

K-Kontrola; SeO₃²⁻-Natrijum selenit; Karbaz- [Zn(dapsesc)]; SP-Selenski kvasac

*Unutar istog reda, srednje vrednosti obeležene različitim slovima se statistički razlikuju, p<0.05, ANOVA, Fisher's LSD

r- Korelacioni koeficijent određen izmedju celih gljiva i vodenog/polisaharidnog ekstrakta sa selenom

Najviši sadržaj seleno nađen je u ekstraktu gljive *Pleurotus salmoneostramineus*, 155.56 µg/g sa selenom iz organskog jedinjenja. Najmanje seleno iz kvašćevog preparata bilo je vezano u ekstraktima gljive *P. cornucopiae*.

Ovi rezultati ukazuju na potencijalno iskorišćenje uzoraka sa vezanim selenom kao dijetetskih suplemenata. Selen iz proizvodnog supstrata je inkorporiran u polisaharide selenom obogaćenih gljiva. Prisustvo seleno može dovesti do značajnog povećanja aktivnosti bioaktivnih polisaharida (Shang i sar., 2009).

Statističkom analizom utvrđeno je postojanje značajno veće koncentracije seleno u vrelin vodenim nego u alkalnim polisaharidnim ekstraktima kod svih ispitivanih uzoraka ($P < 0.05$) i to najmanje duplo, što znači da se selen najvećim delom zadržava u komponentama rastvornim u vodi, a to je u skladu sa rezultatima do kojih je došao Zhao, L. sa saradnicima 2004. godine. ispitujući raspodelu organskog seleno u gljivi *G. lucidum*. U alkalnim polisaharidnim ekstraktima gljive *Pleurotus ostreatus* P70, najviši sadržaj seleno imao je ekstrakt dobijen iz gljive sa [Zn(dapsesc)], 34.98 µg/g, a najniži iz gljive obogaćene selenom iz neorganskog jedinjenja 16.37 µg/g. Poredeći rezultate dobijene za sojeve gljiva obogaćene selenom iz kvašćevog preparata, koncentracija seleno bila je značajno viša u odnosu na kontrolne uzorke, kao i u slučaju vrelin vodenih ekstrakata. Alkalni ekstrakt gljive *P. salmoneostramineus* imao je najvišu koncentraciju seleno, 40.67 µg/g i značajno se razlikovao u odnosu na sve ostale sojeve ($P < 0.05$). Između polisaharidnih ekstrakata drugih sojeva nije bilo značajne razlike u usvojivosti seleno, a sadržaj je bio oko 30 µg/g (Tabela 11). Takođe, kao i kod vodenog ekstrakta, potvrđena je pozitivna korelacija u sadržaju seleno cele gljive i alkalnog ekstrakta ($r = 0.725$). Dodavanje seleno u proizvodni supstrat generalno je rezultiralo proporcionalnim povećanjem sadržaja seleno u polisaharidima.

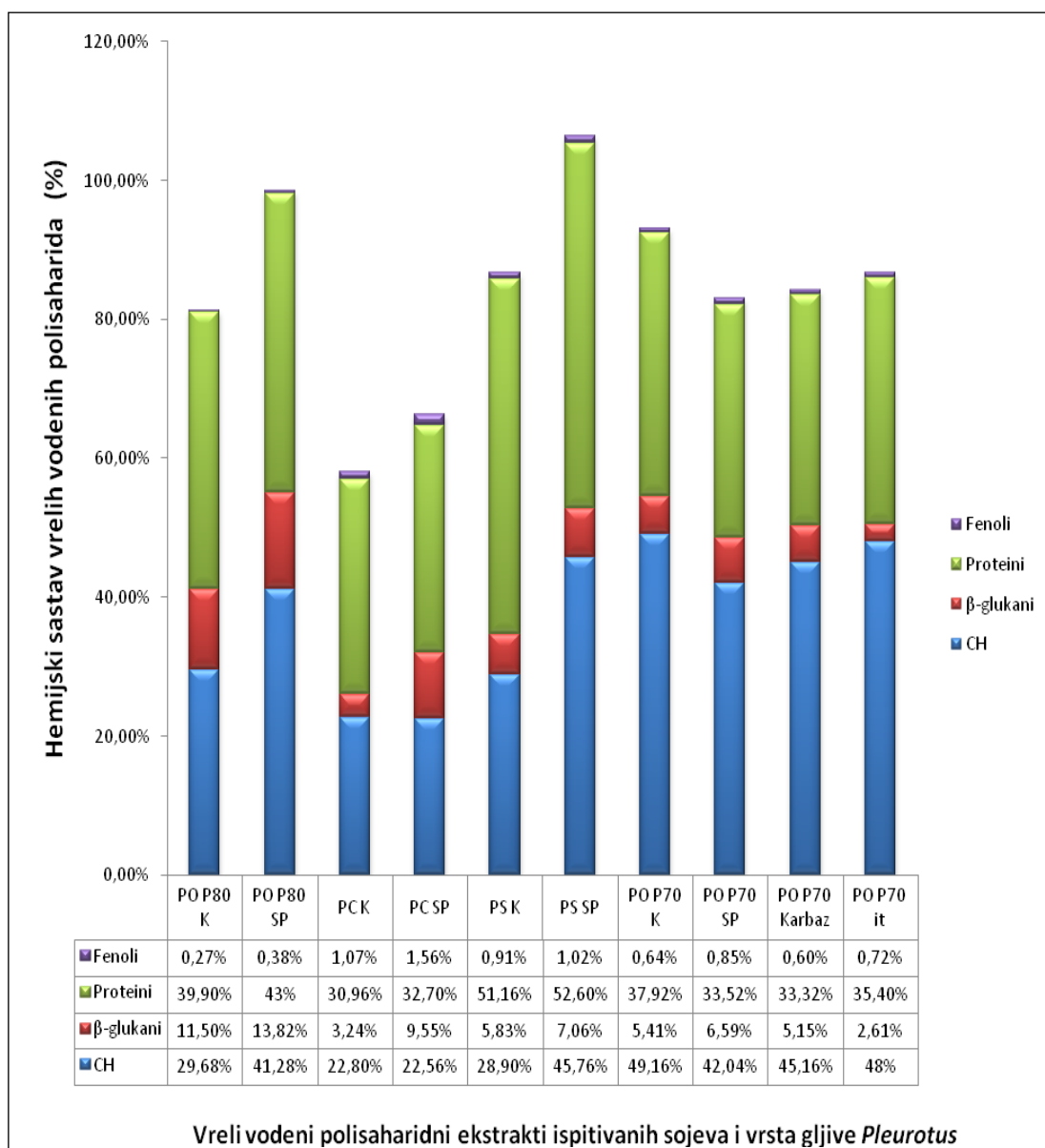
Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da se organski selen u obliku selenskog kvasca može koristiti efektivno za biosintezu selenom obogaćenih polisaharida. Pretpostavlja se da će ovakvi uzorci imati jače izražena antioksidativna svojstva (Malinowska i sar., 2009). Bazirano na preporučenoj dnevnoj dozi za odrasle ljude, unos od oko 300 mg vodenog polisaharidnog ekstrakta dnevno bio bi dovoljan da se zadovolje potrebe čoveka za selenom. Gljiva je usvojeni selen prevela

u organski oblik i veliki deo selen je inkorporiran u polisaharide, naročito rastvorne u vodi u kojima se nalazi dosta nečistoća. Da bi se dobila jasnija slika o transformaciji selen u plodonosnom telu ispitivanih gljiva, urađena je hemijska karakterizacija polisaharidnih ekstrakata.

5.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata znatno je varirao od vrste do vrste, sa porastom koncentracije selen. Koncentracija bioaktivnih jedinjenja zavisi od starosti plodonosnog tela gljive i uslova čuvanja (Minato i sar., 1999). Prisutan selen koji se vezuje za ugljene hidrate, uticao je na sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima kako vrelin vodenim tako i alkalnim. Koncentracija ugljenih hidrata u vrelin vodenim ekstraktima sa povećanom koncentracijom selen za *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus* i *P. ostreatus* P80 bila je redom 225.6, 457.6 i 412 mg/g (Slika 14). Razlika u odnosu na vreli vodeni ekstrakt iz kontrolne gljive nije bila značajna jedino kod *P. cornucopiae*, dok je kod *P. salmoneostramineus* i *P. ostreatus* P80 prinos ugljenih hidrata bio oko 1.5 put veći kod ekstrakta sa povećanim sadržajem selen. Upoređujući vrele vodene ekstrakte dobijene iz plodonosnog tela gljive *P. ostreatus* P70 sa selenom, odgajana uz dodatak selenskog kvasca, kompleksnog jedinjenja i selenita, uočava se slabiji prinos ugljenih hidrata u svim vrelin vodenim ekstraktima sa selenom u odnosu na kontrolne. S obzirom na to da su u pitanju neprečišćeni vreli vodeni ekstrakti, pretpostavlja se da su na prinos, pored prisutnog selen, uticale i druge prisutne komponente u ekstraktu, što zavisi od soja i vrste gljive.

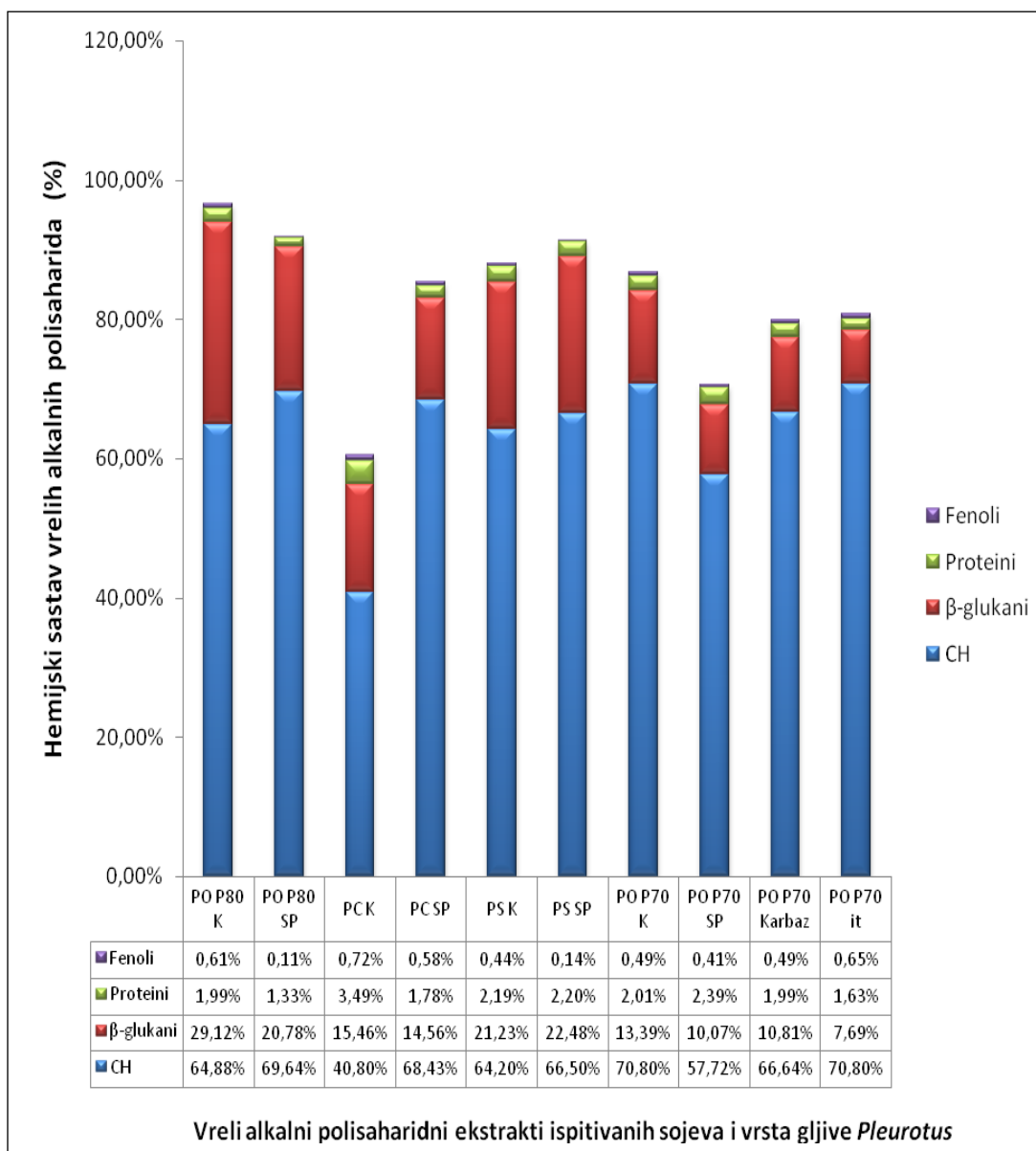
Takođe, kao u slučaju vrelog vodenog ekstrakta, u alkalnim ekstraktima gljiva sa povećanim sadržajem selen *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus* i *P. ostreatus* P80, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata bio je viši u odnosu na kontrolne ekstrakte - 684.3, 665 i 696.4 mg/g (Slika 15). Kod svih alkalnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* P70 obogaćenih selenom, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata, kao i kod vodenih ekstrakata, bio je niži u odnosu na kontrolu, osim kod korišćenog selenita.



PO=*Pleurotus ostreatus*; PC=*Pleurotus cornucopiae*; PS=*Pleurotus salmoneostramineus*

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac; Karbaz- [Zn(dapsesc)]; it-Natrijum selenit,
CH-Ugljeni hidrati

Slika 14. Hemijski sastav vrelih vodenih polisaharidnih ekstrakata gljiva *Pleurotus* spp. sa i bez dodatog selena



PO=*Pleurotus ostreatus*; PC=*Pleurotus cornucopiae*; PS=*Pleurotus*

salmoneostramineus

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac; Karbaz- [Zn(dapsesc)]; it-Natrijum selenit

CH-Ugljeni hidrati

Slika 15. Hemijski sastav vrelih alkalnih polisaharidnih ekstrakata gljiva *Pleurotus* spp. sa i bez dodatog selena

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima gljiva bio je u opsegu od 27.6-74.4 %, računato na suhu masu gljive (Kozarski i sar., 2011; Klaus i sar., 2011).

Malinowska i saradnici su 2009. godine zaključili da je prinos ekstracelularnih polisaharida pri submerznom gajenju micelije *L. edodes* znatno povećan sa dodatkom selenita u podlogu za submerzni rast. Već je pomenuto da se selen u malim količinama ponaša kao antioksidant, ali u većim koncentracijama postaje pro-oksidant. Moguće je da veća količina ovih polisaharida predstavlja vid odbrane od oksidativnih oštećenja (Chen i sar., 2006; Park i sar., 2002). Međutim, sadržaj intracelularnih polisaharida je bio redukovano. Takođe, moguć je uticaj seleno jedinjenja na enzime gljive (Turlo i sar., 2011). Iz tog razloga je potrebno proveriti antioksidativnu aktivnost ovako dobijenih polisaharida.

5.4.4. Određivanje sadržaja β -glukana u polisaharidnim ekstraktima

Korišćenjem kita za određivanje sadržaja β -glukana, utvrđeno je da je sadržaj β -glukana u vrelin vodenim ekstraktima kontrolnih gljiva bio 3.2-11.5% od 32.23-115.1mg/g suve mase ekstrakta, a u ekstraktima sa povećanom koncentracijom seleno 26.1-138.2 mg/g suve mase ekstrakta (Slika 14). Najviši sadržaj β -glukana uočen je kod gljive *P. ostreatus* P80. Kod svih vrelin vodenih ekstrakata sa povećanim sadržajem seleno, detektovan je značajno viši sadržaj β -glukana. Ovaj pozitivan uticaj na povećanu rastvorljivost β -glukana izuzetno je važan zbog biološke aktivnosti vodorastvornih β -glukana kako čistih tako i u kompleksu sa proteinima (Synytsia i sar., 2009). U slučaju soja *P. ostreatus* P70, kod vodenog ekstrakta sa selenom dobijenom iz gljive koja je rasla na supstratu sa neorganskim selenom i kompleksom, došlo je do statistički značajnog smanjenja u sadržaju β -glukana ($P < 0.05$). Iz navedenog se ponovo izvodi pretpostavka da vrsta jedinjenja seleno ima značajan uticaj na sadržaj glukana i da je prednost u korišćenju organskih jedinjenja seleno.

Koristeći istu metodu, određen je sadržaj β -glukana u vrelin alkalnim ekstraktima polisaharida (Slika 15). U svim uzorcima, osim u ekstraktima gljive

P.salmoneostramineus, sadržaj β -glukana bio je statistički značajno niži ($P < 0.05$) u odnosu na kontrolu. Sadržaj β -glukana u alkalnim ekstraktima kontrolnih gljiva bio je u opsegu 133.9-291.25 mg/g suve mase ekstrakta, a u ekstraktima sa povećanom koncentracijom selena od 100.7-224.8 mg/g suve mase ekstrakta. Kao i kod vrelih vodenih ekstrakata, natrijum selenit je prouzrokovao najniži prinos glukana u odnosu na organska jedinjenja selena kod soja *P. ostreatus* P70. Najviši sadržaj β -glukana nađen je u gljivi *P. ostreatus* P80. Primećeno je da se u alkalnim ekstraktima nalazilo i do pet puta više β -glukana u odnosu na odgovarajuće vrelе vodene ekstrakte (poglavlje 5.3.1) što je u suprotnosti sa literaturnim podacima (Kozarski i sar., 2011; Lee i Kim, 2005) koji navode da se u vrelim vodenim ekstraktima nalazi oko 10 puta više ukupnih glukana (1.9-26.9%) u odnosu na alkalne (0.1-2.7%) računato na suhu masu gljive. Tačno objašnjenje nije moguće dati bez daljih istraživanja.

5.4.5. Određivanje sadržaja ukupnih fenola u polisaharidnim ekstraktima

Primenjeni procesi ekstrakcije, etanolna precipitacija i dodatak selena, značajno su uticali na količinu fenola u ekstraktima. Postojala je značajna razlika u sadržaju fenolnih jedinjenja između kontrolnih i ekstrakata sa povećanim sadržajem selena dobijenih kod svih ispitivanih seleno jedinjenja ($P < 0.05$). U vrelim vodenim ekstraktima, ukupan sadržaj fenola kod uzoraka sa povećanim sadržajem selena bio je 10-30% veći u odnosu na kontrolne uzorke (Turlo i sar., 2010), osim u slučaju uzorka sa dodatkom selena iz kompleksa $[Zn(dapsesc)]$ kod koga sadržaj fenola u odnosu na kontrolu nije bio značajno niži (6 mg/g). U vrelom vodenom ekstraktu gljive *P. ostreatus* P80 bilo je najmanje fenolnih jedinjenja (2.66 mg/g kontrolnog i 3.82 mg/g obogaćenog ekstrakta) u odnosu na druge sojeve, kod kojih je sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima obogaćenim selenom iz kvasca bio 9.52 mg/g kod *P. ostreatus* P70, 10.2 mg/g kod *P. salmoneostramineus* i 15.6 mg/g kod *P.cornucopiae* (Slika 14).

Kada je reč o alkalnim ekstraktima, značajna razlika u sadržaju ukupnih fenola ($P < 0.05$) između neobogaćenih i selenom obogaćenih polisaharida

ustanovljena je kod svih ispitivanih sojeva roda *Pleurotus* (Slika 15). U ovom slučaju, efekat je bio suprotan, zabeležen je značajno niži sadržaj fenola u uzorcima sa selenom u odnosu na kontrolne, i to do 80%. Uzorak gljive *P.ostreatus* P80 obogaćen selenom iz preparata Sel-Plex[®] imao je najviši sadržaj fenola.

Kod vrelih vodenih polisaharadidnih ekstrakata, uočena je jaka pozitivna korelacija između sadržaja polifenola i selena ($r=0.88$). Iako su rezultati ranijih ispitivanja polisaharidnih ekstrakata (Huang i sar., 2010) pokazali da se alkalnom ekstrakcijom koncentracija fenola znatno povećava u polisaharidima, u ovom slučaju rezultat je obrnut. Alkalnom ekstrakcijom je dobijeno i do tri puta manje fenolnih jedinjenja nego vrelom vodenom ekstrakcijom. Iako se pri višoj pH vrednosti ekstrahuje više polisaharida iz gljive koji su u kompleksima sa polifenolima (Wong i Chye, 2009), izgleda da je prisustvo selena u slučaju alkalne ekstrakcije doveo do smanjenog prinosa polifenola. Dobijene vrednosti za sadržaj ukupnih fenola u polisaharidima slaže se sa ranije navedenim vrednostima (poglavlje 5.3.4).

5.4.6. Određivanje sadržaja proteina u polisaharidnim ekstraktima

Sadržaj ukupnih proteina za vrele vodene ekstrakte polisaharida kontrolnih gljiva bio je između 309.6 i 511.6 mg/g suve mase ekstrakta, a za ekstrakte sa povećanim sadržajem selena 327-526 mg/g. S obzirom na to da su u gljivama u najvećem procentu zastupljeni u vodi rastvorni proteini (Zhao i sar., 2008), pretpostavlja se da se vrelom vodenom ekstrakcijom izdvojilo dosta nečistoća pored ugljenih hidrata. Vrela vodena ekstrakcija praćena alkoholnom precipitacijom nije bila dovoljan uslov za potpuno uklanjanje proteina iz ekstrakta (Slika 14). Prema tome, sirovi vreli vodeni ekstrakti su kompleks polisaharida, fenola i proteina, čime se i objašnjava visok procenat selena koji je kvantifikovan u ekstraktima (poglavlje 5.4.2). U vodenim ekstraktima dobijenim iz selenom obogaćenih gljiva *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus* i *P. ostreatus* P80 uočava se značajno veći prinos proteina ($p<0.05$) u odnosu na kontrolne ekstrakte. Kod gljive *P. ostreatus* P70, bilo je obrnuto, s tim što je najveći udeo proteina nađen u

ekstraktima gljive obogaćene neorganskim selenom u odnosu na druga dva organska izvora.

Sadržaj proteina u alkalnim ekstraktima kontrolnih gljiva bio je u opsegu 19.9 i 34.9mg/g, a u ekstraktima sa selenom 13.3-23.9 mg/g suve mase (Slika 15). Najveći deo proteina izdvojen je vrelom vodenom ekstrakcijom dok se alkalnom ekstrakcijom izdvaja do 20 puta manje proteina. Ovim se takođe objašnjava znatno niža koncentracija selena u alkalnim ekstraktima (poglavlje 5.4.2). Sadržaj proteina u alkalnim ekstraktima selenom obogaćenih gljiva bio je značajno drugačiji u odnosu na kontrolne uzorke svih gljiva, uglavnom u manjoj količini u odnosu na kontrolne ekstrakte ili nepromenjen.

Turlo i saradnici, 2010. godine su pokazali na primeru određivanja nutritivnog sastava ekstrakta micelije *L. edodes* sa selenom, da osim prisutnog selena takođe i sredstvo za ekstrakciju utiče na odnos proteina, ugljenih hidrata, lipida i fenola.

Polisaharidni ekstrakti predstavljaju mešavinu polisaharida, proteina i polifenola koji su i dalje prisutni nakon vrele vodene/alkalne ekstrakcije i alkoholne precipitacije (Kozarski i sar., 2011; Klaus i sar., 2013) čime se iznosi opšti zaključak da na nutritivni sastav utiče ne samo dodatak selena već i vrsta, starost, uslovi gajenja gljive, oblik jedinjenja selena dodat u podlogu i kasnije postupak ekstrakcije korišćen u pripremi polisaharida. Pretpostavlja se veća biološka aktivnost obogaćenih gljiva usled povećanja sadržaja β -glukana, fenola, proteina i delimično ukupnih ugljenih hidrata u vrelim vodenim ekstraktima sa dodatim selenom (Turlo, 2010; Song i Van Griensven 2008).

5.4.7. Strukturna analiza polisaharidnih ekstrakata (FT-IR spektroskopija)

FT-IR spektroskopija je tehnika analize koja pruža informaciju o hemijskim vezama ili molekulskoj strukturi organskih i neorganskih materijala. FT-IR spektroskopske tehnike se primenjuju u strukturnoj analizi polisaharida i njihovih derivata, proteina, nukleinskih kiselina, za karakterizaciju promena u nutritivnom sastavu uzoraka (Fischer i sar., 2006). Najvećim delom, organske komponente

apsorbiraju IR spektre u oblasti $400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$. Oblast $700\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ je spektralni interval koji se može iskoristiti za istraživanje konformacionih prelaza D-glukopiranoznih prstenova u polisaharidu. Trake u oblasti IR spektara od $900\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ jedinstvene su za svaki polisaharid i potiču od skeletnih vibracija.

U cilju određivanja prisutnih glikozidnih veza u polisaharidnim ekstraktima gljiva, uzorci su snimani FT-IR spektroskopskom metodom, korišćenjem KBr diskova. Ekstrakti sadrže komplekse polisaharida, proteina i polifenola. Dobijeni FT-IR spektri ukazuju na to da polisaharidi imaju spektre karakteristične za ugljene hidrate (Prilog 3). Na oko $3000\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ u IR spektrima ekstrakata nalazi se široka, kompleksna traka, koja je rezultat valentnih vibracija OH grupa koje učestvuju u formiranju vodoničnih veza, kao i valentnih vibracija OH grupa molekula konstitucione vode (Yu i sar., 2009; Klaus i sar., 2011; He i sar., 2012). Pik dostiže maksimum u spektru jedinjenja koja sadrže vodonične veze na oko 3615 cm^{-1} . Trake različitog intenziteta u oblasti $2985\text{--}2754\text{ cm}^{-1}$ potiču od rotacionih vibracija metinskih (CH) i metilenskih (CH₂) grupa i intenzitet pikova može biti veoma veliki zbog velikog broja jedinjenja u čijem sastavu se nalaze ove grupe (Kozarski i sar., 2012; Mitić i sar., 2010). Široke trake karakteristične za amid I i amid II grupe nalaze se na $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ (karbonil region, potiče najvećim delom od vibracije istezanja C=O) i $1500\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (deformacione vibracije N-H grupa) (Fischer i sar., 2006; Wang i sar., 2007). Prisustvo valencionih vibracija ovih grupa ukazuje na prisustvo proteina, kao i amino grupa i šećera i moguće prisutnih slobodnih aminokiselina. Trake karakteristične za amid I, preklapaju se sa trakama u oblasti 1640 cm^{-1} (HOH) koje ukazuju na prisustvo vode u strukturi kompleksa (Kim i sar., 2003), samim tim se ne mogu iskoristiti pojedinačno za identifikaciju amid grupa. Mala količina proteina je uočena u oblasti karakterističnoj za apsorpcione trake proteina $1600\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$, preklapajući se sa vibracijama aromatičnih grupa, najverovatnije polifenola. Širok opseg traka u ovoj oblasti (amid I) zajedno sa trakama u oblasti $1575.7\text{--}1506.3\text{ cm}^{-1}$ ukazuju na prisustvo α -hitina, tako da se pretpostavlja da su α -glukani kovalentno vezani za druge polimere kao što je hitin, i ova struktura je zajednička velikom broju gljiva s obzirom na to da se smatra da je hitin glavna fibrilarna komponenta polisaharida u ćelijskom zidu vrsta gljive *Pleurotus*

(Moharram i sar., 2008; Kozarski i sar., 2012). Kompleksna traka u oblasti 1300–1500 cm^{-1} povezana je s jedne strane sa deformacionim u ravni vibracijama CH_2 grupa iz bočne CH_2OH grupe sa druge strane. U istoj IR oblasti nalaze se i deformacione vibracije C–O–H grupa iz CH_2OH (Mitić i sar., 2010). Pikovi u apsorpcionoj oblasti 1410–1520 cm^{-1} odgovaraju amidnoj traci II (vibraciono istezanje CN grupa), uz preklapanje sa aromatičnim komponentama što ukazuje na prisustvo produkata degradacije proteina vezanih za polisaharide. Traka u oblasti 1310–1410 cm^{-1} odgovara valentnim vibracijama OH grupa fenolnih komponenata, čime se ukazuje na prisustvo pigmenata kao i simetričnu rotaciju karboksilne grupe (Moharram i sar., 2008; Kozarski i sar., 2012). Karakteristična apsorpcija na 1376.5 cm^{-1} pripisana je vibraciji grupe C–H u ravni, što ukazuje na β -glukane (PS SP alkalni- 1377.1 cm^{-1} , PSSP vodeni- 1373.2 cm^{-1} i POP70 svi alkalni ekstrakti- 1373.2 cm^{-1}). Apsorpcija na oko 1250 cm^{-1} indicira prisustvo hemiceluloze i na 1242 cm^{-1} malu količinu proteina (Fischer i sar., 2006; Klaus i sar., 2011) samo kod vrelih vodenih ekstrakata polisaharida dobijenih iz gljiva obogaćenih selenom dodatkom selenskog kvasca (POP70 SP vodeni – 1238 cm^{-1} , PSSP vodeni- 1242.1 cm^{-1} , PCSP vodeni ekstrakt- 1238,2 cm^{-1}) (Prilog 3). Oblast 1032–1186 cm^{-1} karakteristična je za molekule glukana. Veliki broj preklopljenih IR traka u oblasti 1150–1160 cm^{-1} (najvećim delom COC valencione vibracije skeletnih i glikozidnih grupa) ukazuju na prisustvo β konfiguracije najvećeg broja glikozidnih veza i samim tim na prisustvo polisaharida kao glavne komponente. U oblasti od 975 do 1175 cm^{-1} IR spektri kompleksa mogu pripisati valentnim vibracijama C–O i C–C veza kao i deformacionim vibracijama CCH, COH i HCO veza. Apsorpcione trake u ovoj oblasti prisutne su u gotovo svim ekstraktima (Sitva i sar., 2012; Kozarski i sar., 2012). Svi uzoci gljiva imali su izražene apsorpcione trake u oblasti 1000–1100 cm^{-1} . Traka na 1080 cm^{-1} ukazuje na prisustvo β -glukana i piranoznu formu glukozil ostataka. Drugi pikovi i istezanja karakteristični za β -glukane uočeni su u blizini 1100 i 1040 cm^{-1} . Trake na 1032 cm^{-1} , 1078 cm^{-1} i 1151 cm^{-1} pripisane su α -glikozidnim vezama u piranoznom nizu (Maity i sar., 2007; He i sar., 2012; Yu i sar., 2009). Trake u oblasti 900–700 cm^{-1} predstavljaju veliki broj slabih neraspoređenih pikova koji su tipični za identifikaciju mikroorganizama (Fischer i

sar., 2006). Trake slabog intenziteta ispod 900 cm^{-1} potiču od deformacionih vibracija metilenskih grupa van ravni CH veza kao i od samog piranoznog prstena (Liu i sar., 2012). Opseg pikova između 812 i 692 cm^{-1} ukazuje na prisustvo glukana, ali u isto vreme i na moguća preklapanja sa produktima degradacije proteina vezanih za polisaharide (Synytsya i sar., 2009). U niskofrekventnom delu spektra treba očekivati i pojavu traka od vibracija molekula H_2O , između 400 i 600 cm^{-1} (Mitić i sar., 2010).

Vreli vodeni ekstrakti dobijeni iz uzoraka gljiva obogaćenih selenom iz kvasca imali su izraženije pikove α - i β -glikozidnih veza nego kontrolni ekstrakti (poglavlje 5.4.4). Takođe, samo kod ovih uzoraka detektovane su slabe apsorpcione trake na 1242 cm^{-1} karakteristične za proteine. Posmatrajuci alkalne ekstrakte, jedino su spektri karakteristični za α -glukane bili slični u uzorcima sa i bez dodatog selen. Apsorpcione trake karakteristicne za β -glukane bili su intenzivniji u kontrolnim ekstraktima nego u ekstraktima sa dodatim selenom za sve sojeve gljiva (poglavlje 5.4.4). Pretpostavlja se da se selen vezuje za ugljene hidrate i moguće je da je tokom alkalne ekstrakcije otežana ekstrakcija usled prisustva selen. U alkalnim ekstraktima najvećeg broja uzoraka pik karakterističan za β -glukan bio je odsutan ili sa manjim intenzitetom, što ukazuje na to da vrela alkalna ekstrakcija degradira potpuno ili delimično polisaharide, naročito u osnovnom nizu (Münzberg et al., 1995). Na osnovu dobijenih rezultata, može se izvesti zaključak da kombinacija selen verovatno ne utiče na glavnu strukturu polisaharida, što je u skladu sa rezultatima koje je dobio Yu, L. sa saradnicima 2009. godine *in vivo* testom na miševima.

5.4.7.1. FTIR spektri glikozidnih veza u ekstraktima *Pleurotus ostreatus* P70

Oba, vreli vodeni i alkalni ekstrakt gljive POP70 K, imaju slabe trake karakteristične za α -glikozidne veze na oko 940 cm^{-1} (glukopiranozni niz) i na oko 760 cm^{-1} (C1-H vibracije istezanja u ravni) (Šandula i sar., 1999). Spektar vrelog vodenog ekstrakta POP70 SP imao je prisutne iste pikove α -1,3-glukana, dok alkalni ekstrakt istog uzorka pokazuje slabu apsorpcionu traku na 850 cm^{-1} karakterističnu za

ekvatorijalno orijentisanu C1-H vezu, odnosno za α -D-glikozidnu vezu (Maity i sar., 2013; Synytsya i sar., 2009) i na 756 cm^{-1} (Prilog C). U vrelin vodenim ekstraktima uzorka POP70 SeO_3^{2-} , α -veze su uočene na 940 cm^{-1} i 844 cm^{-1} , dok su na spektrima alkalnog ekstrakta detektovana sva 3 pika karakteristična za α -D-glikozidnu vezu (945 , 844 i 760 cm^{-1}). U polisaharidnim ekstraktima uzorka POP70 Zn(dapsesc), apsorpcione trake karakteristične za α -glikozidne detektovane su u oblasti oko 795 cm^{-1} ukazujući na vibraciju istezanja C-H α -glikozidnih veza u furanoznom prstenu. Opseg apsorpcionih traka u oblasti $880\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ specifičan je za β -glikozidne veze i samim tim ukazuje na prisustvo β -glukana (Tool i sar., 2004; Moharram i sar., 2008; Turlo i sar., 2011). Vreli vodeni ekstrakt gljive POP70 K pokazao je pikove β -glukana na 879.5 cm^{-1} i ukazuje na deformacione vibracije C1-H β -glikozidne veze (He i sar., 2012) dok u alkalnim ekstraktima pikovi specifični za β -glikozidne veze nisu detektovani. U vrelom vodenom ekstraktu uzorka POP70SP, pik na 879.5 cm^{-1} je detektovan dok u alkalnim ekstraktima pikovi specifični za β -glikozidne veze nisu detektovani. Takođe, u ekstraktima uzorka POP70 SeO_3^{2-} , pikovi karakteristični za β -glikozidne veze nisu detektovani. Apsorpcione trake karakteristične za β -glukane kod uzorka POP70 Zn(dapsesc) jasno su detektovane, za vrelе vodene ekstrakte na 875.6 cm^{-1} i za alkaline ekstrakte na 895 cm^{-1} . Nezavisno od ovoga, pikovi oko 705 cm^{-1} detektovani su u uzorcima i možda ukazuju na prisustvo produkata degradacije proteina vezanih za polisaharide

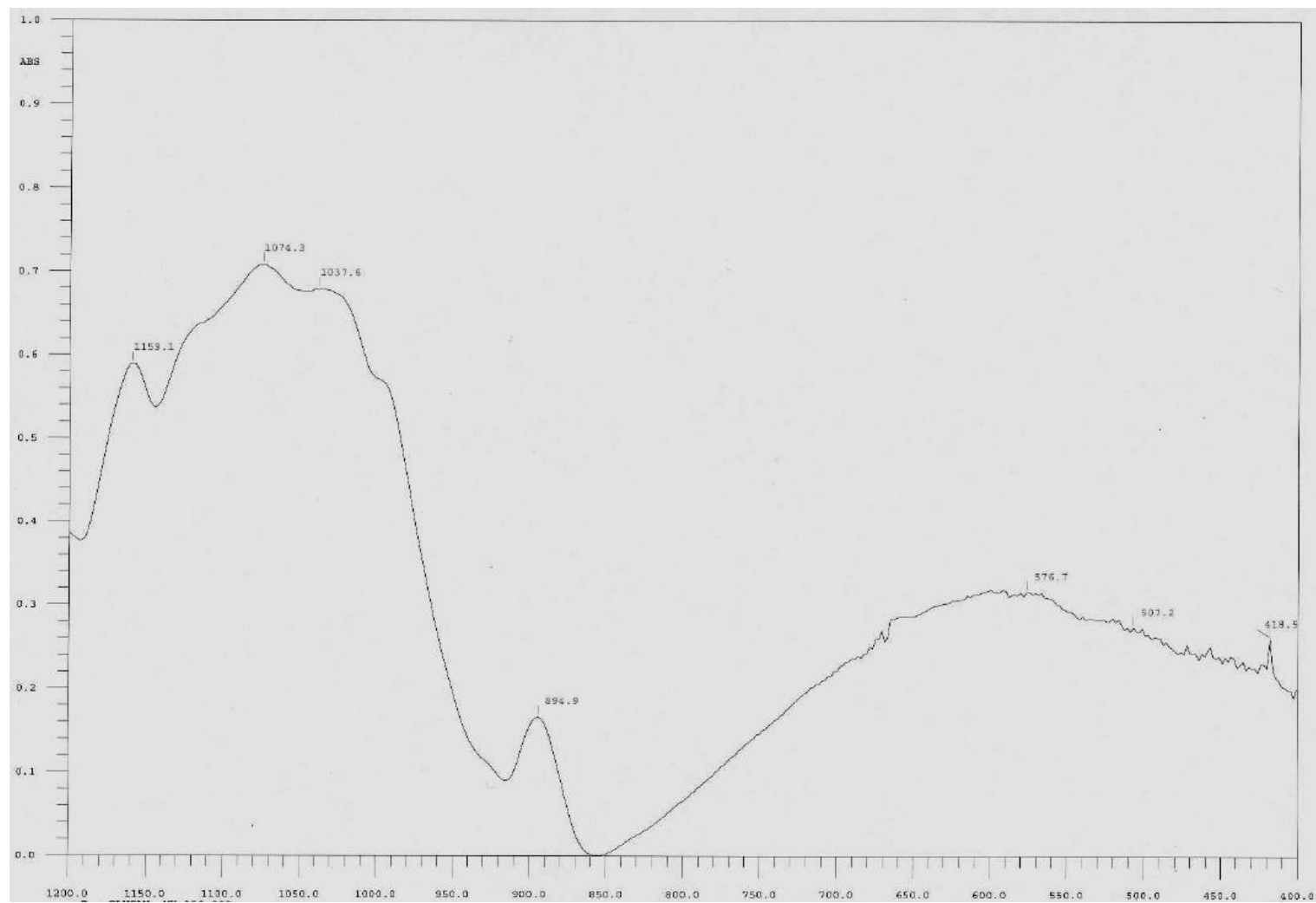
Apsorpcione trake karakteristične za α -glukane bile su istog intenziteta u svim vodenim i alkalnim ekstraktima gljive soja POP70. U slučaju β -glukana, kontrolni uzorci i POP70 Zn(dapsesc) imali su izraženije pikove u vrelom vodenom ekstraktu. POP70 SeO_3^{2-} nije pokazao ni jedan pik karakterističan za β -glukan u oba tipa ekstrakata, dok je kod ostalih vrelih alkalnih ekstrakata gljive POP70 jedino POP70 Zn(dapsesc) imao pik karakterističan za β -glukan, a POP70 K i POP70 SP nisu.

5.4.7.2. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive *Pleurotus ostreatus* P80

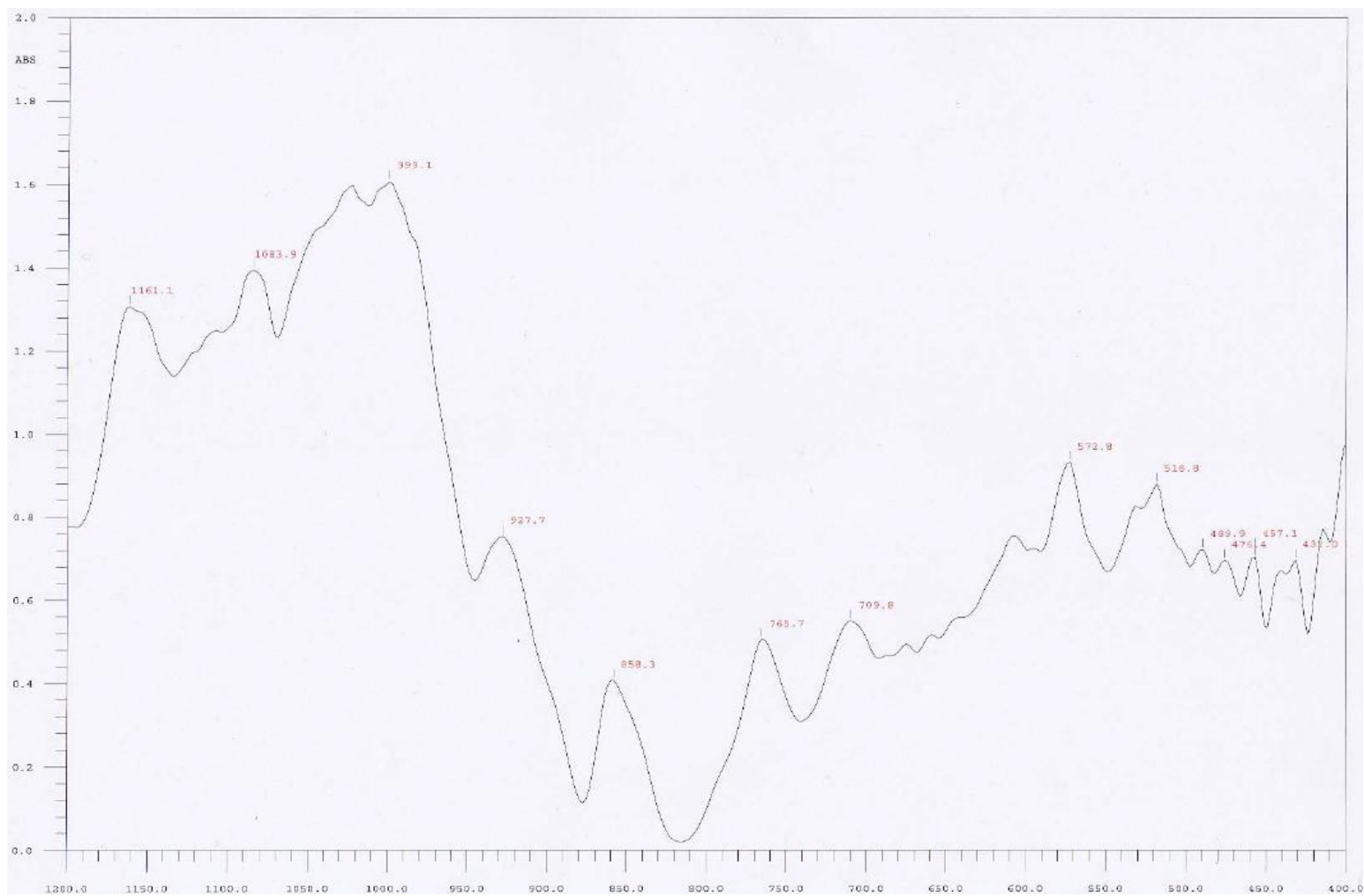
Apsorpcioni pikovi karakteristični za α -glukane detektovani su u svim ekstraktima vrste POP80 (Prilog C). U oba POP80 K ekstrakta, slabo izražene apsorpcione trake su jasno detektovane u opsegu 790-800 cm^{-1} . Vodeni ekstrakt imao je pik na 798.5 cm^{-1} , a alkalni na 790.8 cm^{-1} . Ekstrakti dobijani iz gljive POP80SP imali su apsorpcione trake u oblasti 830-870 cm^{-1} , karakteristični za ekvatorijalno orijentisanu C1-H vezu, odnosno za α -1,3-glukozidnu vezu u glukopiranoznom nizu. Vreli vodeni ekstrakt uzorka P80 SP imao je pik na 867.9 cm^{-1} , a alkalni na 837 cm^{-1} i još jedan na 790.8 cm^{-1} .

Vreli alkalni ekstrakti uzoraka POP80 K i POP80 SP nisu pokazali pikove karakteristične za β -glikozidnu vezu. Vreli vodeni ekstrakt uzorka P80 kontrola imao je pika na 875.6 cm^{-1} , dok je POP80SP pokazao karakteristični pik na 802.9 cm^{-1} (Šandula i sar., 1999). Detektovani pikovi ukazuju na prisustvo skeletne γ C-H grupe β -glikozidne veze u furanozne jedinice.

IR spektar ekstrakta POP80 K je veoma sličan spektru ekstrakta POP80SP i u oba su detektovane trake karakteristične za α -glukane sličnog izgleda, suprotno β -glukanima gde su veze detektovane jedino u vodenim ekstraktima. Nije bilo uočljivih razlika između FTIR spektara kontrolnih i POP80SP alkalnih ekstrakata. Svi pikovi su bili veoma slabi. U vrelim vodenim ekstraktima uzorka POP80K ekstrakta, pikovi karakteristični za β -glukane bili su intenzivniji nego u alkalnom ekstraktu.



Slika16. FT-IR spektar β -glukana (Standard, Sigma Aldrich)



Slika 17. FT-IR spektar α -glukana (Standard skroba, Sigma-Aldrich)

5.4.7.3. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive *Pleurotus cornucopiae*

Detektovani apsorpcioni pikovii na 802.3 i 767.6 cm^{-1} u vreloj vodenoj ekstraktu uzorka PC K ukazuje na prisustvo β glikozidne veze u glukopiranoznom i furanoznom nizu (Prilog C). Nezavisno od toga, pik na 713.6 cm^{-1} može da ukazuje na prisustvo produkata degradacije proteina vezanih za polisaharide. Vreli vodeni ekstrakt uzorka PCSP imao je pikove karakteristične za β -glukane na 877.6 ; 798.5 i 783 cm^{-1} . Alkalni ekstrakti imali su manji broj pikova u opsegu β -1,3-glukana nego vodeni ekstrakti. PC K nije imao detektovane pikove karakteristične za β glikozidne veze, dok je PCSP imala dve karakteristične apsorpcione trake na 800 - 785 cm^{-1} i 877.6 cm^{-1} (Moharram i sar., 2008; Klaus i sar., 2011). Pikovi vrelog vodenog ekstrakata uzorka PCSP karakteristični za β -glikozidne veze bili su mnogo izraženiji nego u ekstraktu PCSP.

Vodeni ekstrakt dobijen iz PC K nije imao pikove karakteristične za prisutne α -glukane, dok je kod alkalnog ekstrakta dobijenog iz istog uzorka pik detektovan na 794.6 cm^{-1} slično kao i ekstrakti gljive *P.ostreatus* P80. Vreli vodeni ekstrakt POP80 SP pokazuje pik karakterističan za α -glikozidnu vezu na 759.9 cm^{-1} , a alkalni ekstrakt iste gljive ima dva pika na 860.2 cm^{-1} i 846.7 cm^{-1} .

Vreli vodeni ekstrakt gljive PC SP je izraženiji nego alkalni što ukazuje na delimičnu degradaciju polisaharida postupkom alkalne ekstrakcije (Munzberg i sar., 1995).

5.4.7.4. FTIR spektri polisaharidnih ekstrakata gljive *Pleurotus salmoneostramineus*

Karakteristični pikovi u opsegu 875.9 cm^{-1} i 894.5 cm^{-1} ukazuju na C1-H deformacione vibracije β -glikozidnih veza (Turlo i sar., 2011) u vreloj vodenoj ekstraktu uzorka PS K (Prilog C). Vreli vodeni ekstrakt uzorka PS SP imao je takođe pikove u opsegu β -glukana na 885.3 cm^{-1} i 786.9 cm^{-1} , dok alkalni vodeni ekstrakt kontrolnog uzorka PS K nema detektovane trake u oblasti karakterističnoj za β -glukane. PS SP pokazuje dva pika na 894.9 i 786.9 cm^{-1} .

Pikovi karakteristični za α -glukan uočeni su u spektru vrelog vodenog ekstrakta PSK na 945.1cm^{-1} (α -1,3-glukozidne veze u heksapiranoznom nizu), 856.7 cm^{-1} (δ C1-H α -glikozidne veze u glucopiranoznom lancu), 817.8cm^{-1} (γ C-H grupe u jedinici furanoze) i 798.5cm^{-1} . U ekstraktu dobijenom iz PS SP, jedini pik koji odgovara α -glikozidnoj vezi detektovan je na 914.2 cm^{-1} (C1-H skeletna grupa u glukopiranoznoj jedinici). Alkalni ekstrakt uzorka PS K imao je karakteristične pikove na $856,3\text{ cm}^{-1}$ (γ C1-H u furanoznoj jedinici) i 790.8cm^{-1} i PS SP na 937.3 cm^{-1} i 848.6cm^{-1} (Synytsya i sar., 2009; Klaus i sar., 2011).

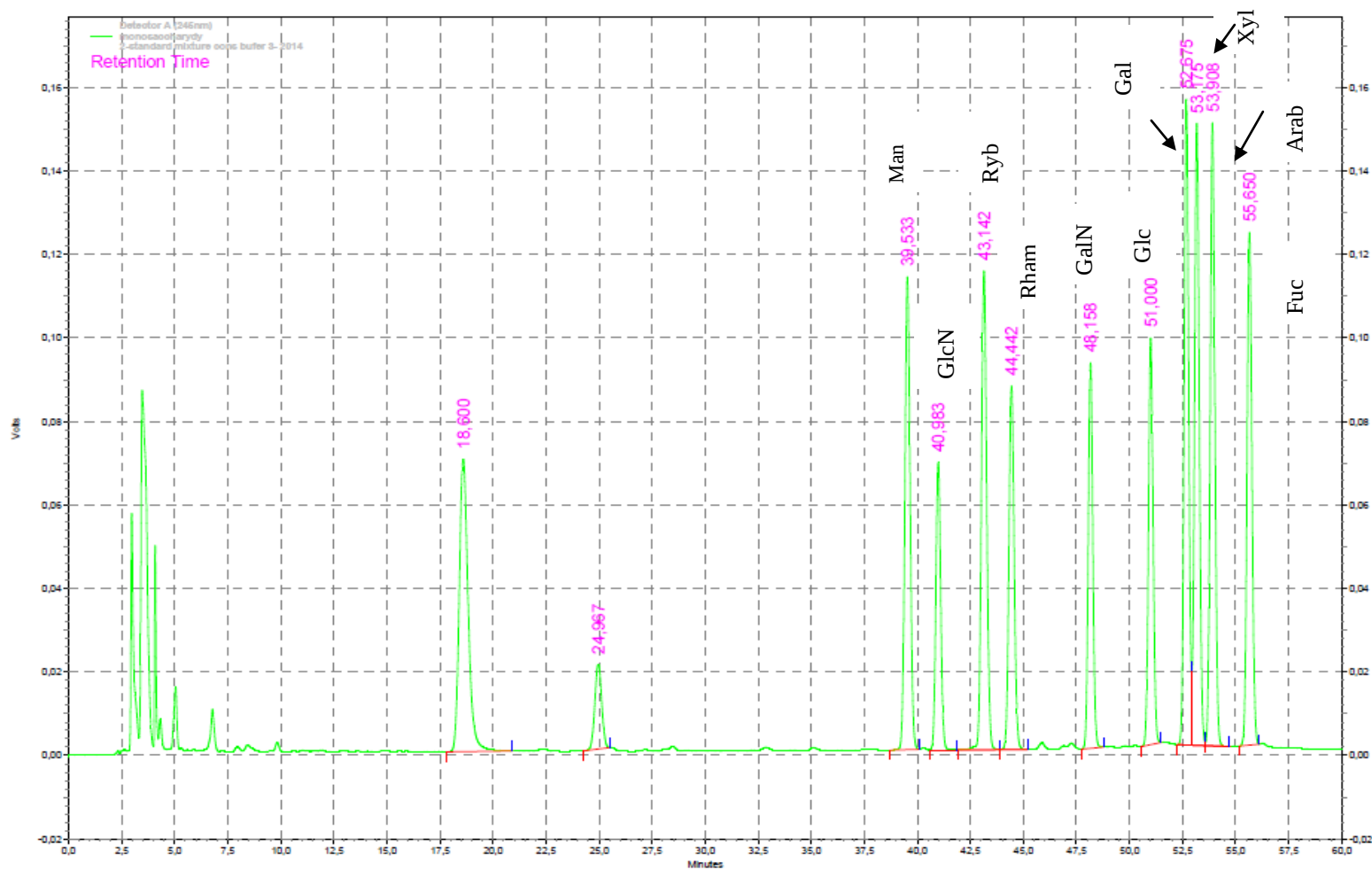
Generlno, u vrelinim vodenim ekstraktima, FTIR spektri PS K i PS SP uzorka bili su slični. U slučaju alkalnih ekstrakta, kontrolni uzorak imao je izraženiji pik za β -glukane.

5.4.8. Tečna hromatografija polisaharidnih ekstrakata

Polisaharidi viših gljiva su poznati imunostimulatori ili modulatori imunog odgovora (Kozarski i sar., 2011; Malinowska i sar., 2009). Iz tog razloga vrlo je važno ispitati monosaharidni sastav polisaharida i proveriti uticaj prisustva selena na isti s obzirom da se zna da je selen vezan za ugljene hidrate. Najpogodnijom tehnikom smatra se HPLC. Ugljeni hidrati nemaju mogućnost UV apsorpcije, iz tog razloga, 1-fenil-3-metil-5- pirazonon, PMP se koristi kao marker molekul u detekciji monosaharida. Nakon vezivanja sa PMP, redukujući šećer formira strukturu 2 p- π konjugovanog enola sa hidroksilnom grupom PMP-a, što dalje omogućava detekciju na hromatografu formiranog neutralnog jonskog para između PMP derivata i organskih amina. Azot u petočlanom pirazolin prstenu sa slobodnim elektronom, može da formira vezu sa silika gelom u C18 koloni i da dovede do kompetitivne adsorpcije sa organskim aminima u mobilnoj fazi. Nepolarne grupe PMP, kao što su benzenova i metil grupa, mogu da uvećaju verovatnoću identifikacije PMP derivata na nepolarnoj C18 koloni. U kiselim uslovima, jonizacija azota u PMP delu proizvodi više mogućnosti za optimizaciju parametara separacije (Tian i sar., 2010).

Za analizu monosaharidnog sadržaja ekstrakata odabrano je 10 standarda monosaharida (Slika 19). Za validaciju metode i saznanja koji procenat monosaharida

se gubi tokom hidrolize, standardi su takođe pripremljeni kao i uzorci (Tabela 12). Rezultati ukazuju na to da se tokom hidrolize korišćenjem 2M TFA gubi između 1.15% i 32.64% monosaharida. Ovim se potvrđuje da se PMP metod derivatizacije i TFA hidroliza u trajanju od 2h uspešno mogu koristiti za pripremu monosaharida u cilju detekcije tečnom hromatografijom.



Slika 18. Hromatogram standarda monosaharida, koncentrovana smeša

*Retenciona vremena su naznačena u tabeli 12.

Tabela 12. Prosečan gubitak monosaharida tokom kiselinske hidrolize sa TFA
praćene PMP derivatizacijom

Monosaharidi	Gubitak tokom hidolize (%)	Retenciono vreme Tr (min)
D-manoza	7.4	39.553
D-glukozamin	11.3	40.983
D-riboza	32.1	43.142
D-ramnoza	15.3	44.442
D-galaktozamin	16.3	48.158
D-glukoza	18.8	51.000
D-galaktoza	1.1	52.675
D-ksiloza	32.6	53.175
D-arabinoza	4.5	53.908
D-fukoza	15.6	55.650

Kod svih ispitivanih sojeva, najzastupljeniji monosaharidi bili su redom glukoza, galaktoza i manaza (Prilog A). Svi sojevi i vrste gljiva su imali drugačiji monosaharidni sastav. Uočene su razlike kako između selenopolisaharida i kontrolnih, takođe i između vodenih i alkalnih ekstrakta. Jedino se za sve ekstrakte ispitivanih sojeva gljive može zaključiti da se nivo glukoze znatno povećava u alkalnim ekstraktima u odnosu na vrele vodene. Sadržaj galaktoze i manaze je zavisio od soja gljive. Glukozamin je u polisaharidima prisutan u obliku N-acetilglukozamina koji je nakon kisele hidrolize prešao u glukozamin. Polimer galaktozamina je prisutan sa istim karakteristikama kao i glukozamin.

Kod svih polisaharidnih ekstrakata gljive *P. ostreatus* P70, najzastupljeniji monosaharidi bili su glukoza, galaktoza i manaza (Tabela 13). Kod vrelih vodenih ekstrakata, procenat manaze se kretao redom u kontrolnom uzorku 9.2%, u uzorku sa dodatim selenom iz kvasca 9.9%, sa dodatim selenom iz kompleksa 13.6% i selenom iz selenita 9.5%. Najmanji sadržaj manaze detektovan je u kontrolnom ekstraktu. Kada je reč o glukozu kao najzastupljenijem monosaharidu, u svim vrelim vodenim ekstraktima došlo je do povećanja sadržaja glukoze sem u ekstraktu obogaćenom

selenom iz kompleksa, suprotno manozii. Glukoza je procentualno bila zastupljena na sledeći način: kontrola 77.5%, SP 84.1%, [Zn(dapsesc)] 63.3% i selenit 80.9%. Galaktoza je u najvećoj meri zastupljena u polisaharidu sa selenom iz kompleksne soli, a najmanje iz kvasca.

Kada se posmatraju alkalni ekstrakti, kao i u predhodnom slučaju, dodatkom seleno se smanjio sadržaj monosaharida u odnosu na kontrolni ekstrakt. Procentualno, sadržaj manoze u kontroli bio je 9.5%, a zatim SP 2.5%, [Zn(dapsesc)] 0.5% i selenit 2.6%. Kod svih uzoraka sa selenom došlo je do povećanja u sadržaju glukoze u odnosu na kontrolni ekstrakt (k 80.9%, SP 90.8%, [Zn(dapsesc)] 94.6% i selenit 87.9%). U slučaju galaktoze, situacija nije bila jasno definisana. Najmanji sadržaj je uočen kod uzorka sa selenom iz kvasca, 0.04% u poređenju sa kontrolom gde je detektovano 6.35%. Kod selenita je bilo više galaktoze u odnosu na kontrolu, 7.2%, a kod [Zn(dapsesc)] manje, oko 5%.

Može se pretpostaviti da kod soja P70 i sam tip jedinjenja seleno i način ekstrakcije utiče na monosaharidni sastav polisaharida. Moguće je da uticaj vrše i druge prisutne komponente koje otežavaju detekciju monosaharida.

U svim alkalnim ekstraktima iz kontrolnih i obogaćenih gljiva, sadržaj glukoze je bio veći u odnosu na vodene ekstrakte. Manozo je u većem procentu prisutna kod svih vodenih ekstrakata. Sadržaj galaktoze je bio veći u alkalnim ekstraktima sa selenom u odnosu na vodene, dok je kod kontrolnih uzoraka situacija bila suprotna, sadržaj galaktoze je bio veći u vrelin ekstraktima.

Nije bilo značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i obogaćenih uzoraka, kao ni između vodenih i alkalnih ekstrakata. Ostali monosaharidi su takođe detektovani u uzorcima, ali su prisutni u znatno manjoj koncentraciji sa dosta niskim pikovima, a neki su detektovani u tragovima u odnosu na navedena tri heksozna monosaharida (Xia i sar., 2011).

Tabela 13. Monosaharidni sastav neprečišćenih polisaharidnih ekstrakata *Pleurotus ostreatus* P70. Rezultati su izraženi u μmol

Monosaharidi μmol	POP70K H_2O	POP70SP H_2O	POP70 Karb H_2O	POP70 SeO_3^{2-} H_2O	POP70K NaOH	POP70SP NaOH	POP70 Karb NaOH	POP70 SeO_3^{2-} NaOH
D -ksiloza	0.03	0.015	0.019	0.005	0.031	0.013	0.00009	0.081
D -riboza	0	0	0	0	0	0	0.042	0.001
D -arabinoza	0.001	0.002	0.00004	0.003	0.0041	0.002	0.001	0.014
D -manoza	0.28	0.24	0.29	0.18	0.12	0.051	0.012	0.11
D -glukoza	2.32	2.0	1.34	1.51	2.43	1.81	2.09	3.73
D -galaktoza	0.25	0.091	0.45	0.12	0.18	0.12	0.11	0.31
D -fukoza	0.013	0.013	0.019	0.002	0.005	0	0.004	0.007
D -ramnoza	0	0	0	0.003	0	0	0	0.0002
D-glukozamin	0.038	0.015	0.004	0.046	0.002	0.002	0.007	0.01
D-galaktozamin	0.005	0	0	0	0	0	0.002	0
UKUPNO	2.937	2.376	2.122	1.869	2.772	1.998	2.268	4.263

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac; Karb-[Zn(dapsesc)]; SeO_3^{2-} ; Natrijum selenit

Kod vrste *P. cornucopiae*, u vrelin vodenim ekstraktima uočen je porast u sadržaju glukoze kod ekstrakta sa selenom iz kvasca (60.2% kod kontrolnih i 67.9% kod obogaćenih), zatim do smanjenja u sadržaju manoze, 5.6% kod kontrolnih u odnosu na 5.4% kod selenskih ekstrakata i do znatnog smanjenja u sadržaju galaktoze, 38.86% u kontroli u odnosu na 17.7% u selenskim ekstraktima (Tabela 14).

Kod vrelih alkalnih ekstrakata, situacija je bila potpuno obrnuta (glukoza 2.06% u kontroli prema 3.7% SP; manozu 82.5% u kontroli prema 80.2% SP i 11.4% galaktoze u kontroli prema 11.5% u SP). Zapravo, sadržaj glukoze i galaktoze nije se znatno promenio u odnosu na manozu. U svima alkalnim ekstraktima kontrolnih i obogaćenih gljiva, sadržaj glukoze je bio veći u odnosu na vodene ekstrakate. Manozu je takođe bila zastupljena u manjoj količini kod alkalnih uzoraka kontrolnih i selenskih polisaharida kao i galaktoza.

Nije bilo značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i obogaćenih uzoraka, kao ni između vodenih i alkalnih ekstrakata. Ostali monosaharidi imali su znatno niži pik u odnosu na navedene heksoze, a neki su bili zastupljeni u tragovima.

Tabela 14. Monosaharidni sastav polisaharidnih ekstrakata *Pleurotus cornucopiae*

Monosaharidi μmol	PC H₂O	K PC SP H₂O	PC K NaOH	PC SP NaOH
D -ksiloza	0.027	0	0.052	0.077
D -riboza	0.026	0	0	0
D -arabinoza	0	0.005	0.001	0.0004
D -manoza	0.104	0.125	0.058	0.107
D -glukoza	0.923	1.54	2.32	2.286
D -galaktoza	0.715	0.403	0.323	0.328
D -fukoza	0	0.016	0.053	0.051
D -ramnoza	0	0.155	0	0
D-glukozamin	0.045	0.023	0.003	0
D-galaktozamin	0	0.002	0	0
UKUPNO	1.84	2.269	2.81	2.849

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac

Kod gljive *P. salmoneostramineus*, osim navedena tri heksozna monosaharida, visok pik je imala i fukoza (Tabela 15). Pik karakterističan za manozu je u svim vrelinim vodenim ekstraktima i alkalnim bio niži kod uzoraka sa selenom (1.54% i 1%) u odnosu na kontrolne (12.6% i 2.5%). Kod vrelog vodenog ekstrakta, sadržaj glukoze je bio veći kod uzoraka sa selenom (64.1% prema kontrolnom 25.0%) a kod alkalnog manji, 85.01% prema 65.31%. Galaktoza je u vrelinom vodenom ekstraktu bila znatno redukovana pri obogaćivanju selenom (5.1% i 4.4%) , ali i kod vrelog alkalnog ekstrakta (6.2% i 5.5%).

U svima alkalnim ekstraktima iz kontrolnih i obogaćenih gljiva, sadržaj glukoze je bio veći u odnosu na vodene ekstrakte kao i kod drugih sojeva. Manozu je u većem sadržaju prisutna kod vodenih polisaharidnih ekstrakata kontrolnih uzoraka, a nešto manje kod vodenih ekstrakata sa selenom. Sadržaj galaktoze je bio veći u alkalnim ekstraktima sa selenom u odnosu na vodene. Nije bilo značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i obogaćenih uzoraka, kao ni između

vodenih i alkalnih ekstrakta. Fukoza je bila značajno prisutna kod vrelih vodenih ekstrakata, i to 2.8% u kontroli i 6.6% u ekstraktu sa dosta selen.

Tabela 15. Monosaharidni sastav polisaharidnih ekstrakata *P. salmoneostramineus*

Monosaharidi μmol	PSK H ₂ O	PS SP H ₂ O	PSK NaOH	PSSP NaOH
D -ksiloza	0.002	0	0	0.05
D -riboza	0.037	0	0	0
D -arabinoza	0.003	0.0005	0.036	0.004
D manoja	0.081	0.0007	0.011	0.038
D -glukoza	0.16	0.029	0.49	0.47
D -galaktoza	0.33	0.002	0.036	0.21
D -fukoza	0.018	0.003	0	0.017
D -ramnoza	0	0.002	0	0
D -glukozamin	0.011	0.008	0	0.024
D-galaktozamin	0	0	0	0,017
UKUPNO	0.642	0.045	0.573	0.83

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac

Kod gljive *P. ostreatus* P80 (Tabela 16) manoja je u svim vrelim vodenim ekstraktima i alkalnim bila zastupljenja u manjoj količini kod uzoraka sa selenom (8.57% i 5.5%) u odnosu na kontrolne (22.1% i 10.8%). Takođe, kod oba ekstrakta, sadržaj glukoze je bio veći kod uzoraka sa selenom (68.6% i 82.5%) prema kontrolnom 47.5% i 79.1%. U oba ekstrakta galaktoza je bila znatno redukovana selenom (16.1% i 8.3%) u odnosu na kontrolu (27.4% i 9.1%).

U svima alkalnim ekstraktima iz kontrolnih i obogaćenih gljiva, sadržaj glukoze je bio veći u odnosu na vodene ekstrakte kao i kod drugih sojeva. Manoja je u većem procentu bila prisutna kod vodenih polisaharidnih ekstrakata kontrolnih uzoraka, a u manjem kod vodenih ekstrakata sa selenom. Sadržaj galaktoze je bio veći u alkalnim ekstraktima sa selenom u odnosu na vodene, dok je kod kontrole sadržaj galaktoze je bio veći u vrelim vodenim ekstraktima.

Nije bilo značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i obogaćenih uzoraka, kao ni između vodenih i alkalnih ekstrakata.

Tabela 16. Monosaharidni sastav polisaharidnih ekstrakata *P. ostreatus* P80

Monosaharidi μmol	POP80K H₂O	POP80SP H₂O	POP80K NaOH	POP80SP NaOH
D -ksiloza	0.001	0.003	0.058	0.074
D -riboza	0.006	0.034	0	0
D -arabinoza	0.00002	0	0.003	0.001
D -manoza	0.42	0.15	0.26	0.21
D -glukoza	0.91	0.97	2.44	3.08
D -galaktoza	0.52	0.23	0.28	0.31
D -fukoza	0.003	0.006	0.023	0.013
D -ramnoza	0	0	0	0
D -glukozamin	0.04	0.015	0	0.038
D -galaktozamin	0.004	0.005	0,012	0.006
UKUPNO	1.904	1.413	3.076	3.732

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac

Može se izvesti zaključak da na monosaharidni sastav ekstrakata utiču tip selenojedinjenja, soj i vrsta gljive, uslovi gajenja, starost gljive i rastvorljivost u različitim rastvaračima. Zhong i saradnici su 2010. godine izolovali polisaharidne frakcije iz plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*. U ispitivanim polisaharidima je uočen potpuno različit monosaharidni sastav (Zhong i sar., 2010). Međutim, u obe frakcije, kao dominantan monosaharid ističe se manoza, što se razlikuje od drugih objavljenih rezultata gde se kao dominantni monosaharid ističe glukoza što je u skladu sa dobijenim rezultatima (Xia i sar., 2011 i Yang i sar., 2012). Zato se može izvesti zaključak da su polisaharidi ispitivanih ekstrakata heteroglukani (Zhang i sar., 2012).

Rezultati dobijeni kod polisaharida ekstrahovanih iz micelijuma *L. edodes* gljive obogaćene selenom takođe ukazuju na to da su najzastupljeniji monosaharidi redom glukoza, galaktoza i manozna (Malinowska i sar., 2009).

Razlika u monosaharidnom sastavu neprečišćenih vrelih vodenih i alkalnih ekstrakata može se objasniti time što su vodorastvorni polisaharidi nerastvorni u alkalijama i obrnuto. Ovo utiče na razliku u monosaharidnom sastavu (Zhang i Cheung, 2011; Wong i sar., 2007). Tokom alkalne ekstrakcije, ćelijski zid se razara i polisaharidi ćelijskog zida se oslobađaju. Painter i Frankie su 1940. godine zaključili da se različita organska jedinjenja sa selenom različito stabilna u alkalnim rastvaračima što zavisi od sastava jedinjenja i koncentracije alkalija. Takođe, kada se primenjuju različite analitičke metode detekcije upotreba određenih hemijskih jedinjenja može dovesti do oksidacije i narušavanja strukture polisaharida. Ova tvrdnja je dokazana na primeru gljive *P. tuber-regium* gde je molekulska masa i monosaharidni sastav polisaharida bili drugačiji (Wu i sar., 2013).

Smatra se da su selenoproteini usko vezani za metabolizam glukoze, ali se ne zna šta je uzrok, a šta posledica (Mao i Teng, 2013). Na ispitivanjima rađenim na biljkama, rezultati su ukazali na to da selen podstiče metabolizam ugljenih hidrata sa redoks potencijalom (Owusu-Sekyere i sar., 2013). *In vitro* i *in vivo* testovima dokazano je da selen utiče na nivo insulina, tj., na metabolizam glukoze pomažući taloženje glukoze u mišićima i mastima. Kod populacije sa prekomernim unosom selena (oko 200µg dnevno) pretpostavljeno je da dalja suplementacija povećava rizik od insulinske rezistencije. Znači da je selen anti dijabetik, ali se u prekomernoj dozi ponaša kao pro-dijabetik (Mao i Teng, 2013; Fischer i Whanger, 1977).

5.5. Hemijska karakterizacija proteina sa selenom

Mogućnost iskorišćenja jestivih gljiva, kao kvalitetnog izvora proteina u ljudskoj ishrani u nerazvijenim zemljama predstavlja značajan poduhvat (Stojanović i Nikšić, 2000; Dabbour i Takruri, 2002) s obzirom na saznanje da neke vrste imaju izuzetno visok sadžaj proteina. Proteini predstavljaju nutritivnu komponentu i imaju bitnu ulogu u ishrani. Funkcionalna svojstva i prinos proteina zavise u mnogome od postupka izolovanja istih. Nijednim postupkom ekstrakcije proteina ne detektuje se blizu 100% selena, verovatno zbog postojanja ne-aminokiselinskih selenojedinjenja u uzorku, a i sušenjem gljive se verovatno formiraju proteinske strukture koje se ne mogu lako degradirati (Stefanka i sar., 2001). Sadržaj proteina u gljivama zavisi od sastava supstrata, od talasa plodonošenja, vremena berbe i vrste (Braaksma i Schaap, 1996). Sadržaj proteina se brzo smanjuje tokom skladištenja ubrane gljive. Du sa saradnicima, 2007. pokazao je da se od ukupno usvojenog selena u plodonosno telo gljive *G. lucidum*, oko 51-61% nalazi u vidu vodorastvornim proteina. Raspoređenost selena u različitim jedinjenjima bila je najvećim delom u vodorastvornim, zatim u alkalnim, alkoholnim i na kraju u proteinima rastvornim u solima (Zhao i sar., 2008). Ovo je logično ako se uzme u obzir činjenica da se selen u živim organizmima nalazi u obliku aminokiselina sa sumporom. Iz ovog razloga je potrebno primeniti više koraka u precipitaciji proteinskih frakcija. Iz navedenog je važno odrediti sadržaj selena u vodorastvornim selenoproteinima, aminokiselinski sastav i molekulsku masu proteina. Brojni enzimi koje gljiva sintetiše mogu da budu supresirani ili aktivirani proizvodnim supstratom, odnosno hemijskim sastavom supstrata. Gljive poseduju kompleksni sistem ćelijski zid/membrana i proizvode brojne ekstracelularne enzime za degradaciju biopolimera i imaju razvijen sistem proteina za prenos molekula kroz ćelijski zid i membranu. Iz navedenog razloga, proteini vezani za ćelijski zid i membranu biće izgubljeni tokom ekstrakcije intracelularnih enzima. Cilj praćenja transformacije selena u proteinima je između ostalog poboljšanje statusa bioaktivnih proteina u gljivama, njihovog biomedicinskog potencijala i buduće perspektive u razvijanju novih farmaceutskih proizvoda iz gljiva.

5.5.1. Ukupan sadržaj selen u proteinima rastvornim u vodi

Dobijeni rezultati ukazuju na ukupan sadržaj selen u proteinima od 54.68-134.6 $\mu\text{g/g}$ računato na suhu masu (Tabela 17). Udeo selen u proteinima u odnosu na celu gljivu bio je u proseku 44.4-70.3%, što potvrđuje navode Du i saradnika (2007). Ukupan sadržaj selen u selenoproteinima varirao je zavisno od soja. Razlika u usvojivosti selen korišćenjem organskih i neorganskih jedinjenja bila je značajna ($P < 0.05$). Selen je u proteine iz selenskog kvasca usvojen najmanje u poređenju sa druga dva ispitivana izvora selen. Iako je ukupan sadržaj proteina i selen u njima važan pokazatelj nutritivne vrednosti, ipak je aminokiselinski profil važniji parametar. Kod neprečišćenih ekstrakta proteina moguće je prisustvo drugih, neproteinskih komponenti, a takođe može doći do promena na proteinu koje mogu dovesti do pogrešnih zaključaka. Potrebno je dalje ispitati usvojivost nižih koncentracija dodatog jedinjenja selen i analizirati prečišćene ekstrakte.

Tabela 17. Ukupan sadržaj selen u vodorastvornim proteinima gljiva
Pleurotus spp. obogaćene selenom

Gljive sa selenom	Prinos vodorastvornih proteina (mg/100mg)	Ukupan selen u proteinima ($\mu\text{g/g}$)	Udeo selen u proteinima u odnosu na celu gljivu (mg/100mg)
<i>P. ostreatus</i> P80 SP	17.4 ± 2.3	97.0 ± 9.1	70.4 ± 8.2
<i>P. cornucopiae</i> SP	23 ± 3.5	65.6 ± 2.9	53.8 ± 3.5
<i>P. salmoneostramineus</i> SP	18.6 ± 2.2	134.6 ± 5.5	68.0 ± 2.2
<i>P. ostreatus</i> P70SP	13.2 ± 3.3	57.5 ± 4.1	44.4 ± 4.1
<i>P. ostreatus</i> P70 Karbaz	12.8 ± 1.9	60.9 ± 2.9	47.8 ± 0.9
<i>P. ostreatus</i> SeO_3^{2-}	11.3 ± 2.1	54.7 ± 5.2	52.8 ± 2.7

SP–Selenski kvasac; Karbaz-Kompleks cink (selenosemikarbazon); SeO_3^{2-} Natrijum selenit

Turlo i saradnici su 2010. godine vršili istraživanja na selenom obogaćenom micelijumu *L. edodes*. Za vodorastvorne proteine je zaključeno da povećan sadržaj selen u micelijumu smanjuje prinos proteina u odnosu na kontrolne uzorke.

5.5.2. Aminokiselinski sastav gljiva sa selenom

Jedan od zadatih ciljeva rada je i određivanje proteinskog sastava gljiva kroz aminokiselinski sastav. Kvantifikacija aminokiselina se danas koristi u identifikaciji proteina. Cornish Bowden je 1980. godine prvi istraživao ovu mogućnost primene.

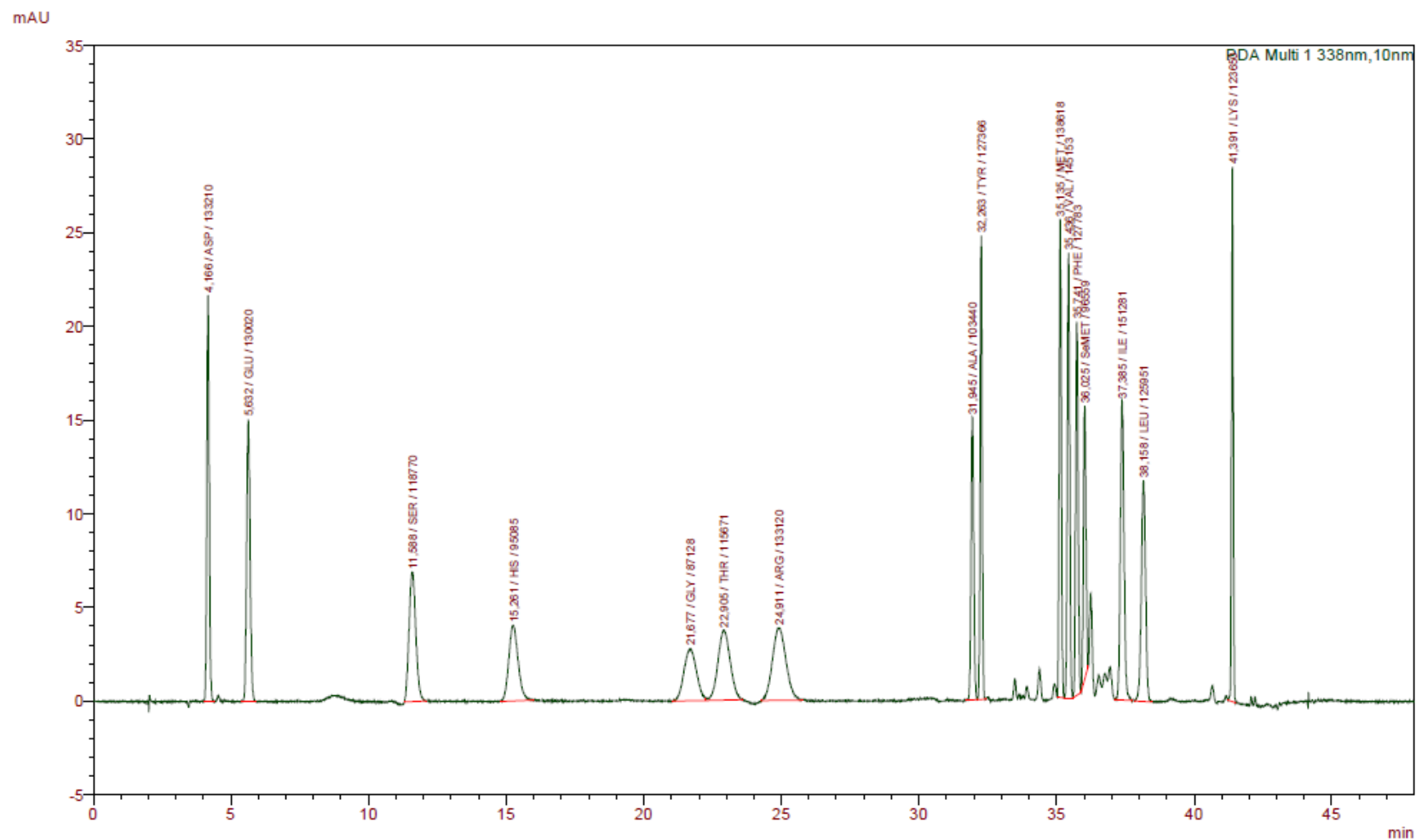
Naročita pažnja je usmerena na sadržaj aminokiselina metionina i selenometionina kod plodnosnog tela sa velikom koncentracijom selen za koje se pominje da su nosioci i do 80% ukupnog usvojenog selen u gljivama i najvažnije komponente kada je antikancerogena aktivnost selenom obogaćenih kultura u pitanju. Potrebno je proveriti i da li prisutan selen u gljivi menja aminokiselinski profil. Analiza aminokiselinskog sastava je kompleksna metoda koja uključuje hidrolizu uzorka, hromatografsko razdvajanje i detekciju aminokiselina. Pravilno izvedena hidroliza je preduslov za uspešnu analizu (Fountoulakis i Lahm, 1998). Nema hidrolize koja će dati potpuno očuvane aminokiseline, uvek postoji izvestan stepen degradacije. Uspešnost postupka zavisi pre svega od temperature, vremena delovanja agensa za hidrolizu i prisutnih aditiva. Protektivni agensi kao što su fenol, merkaptotanol, tioglikolna kiselina, indol ili triptamin dodaju se rastvoru uzorka kako bi se redukovala degradacija aminokiselina. Alifatični ostaci aminokiselina otežavaju potpuno izdvajanje kiselina i dovode do gubitaka (Zhang i sar., 2012).

Alkalna hidroliza se najčešće primenjuje kod identifikacije manje stabilnih aminokiselina kao što su triptofan, serin, treonin, arginin, cistein. Takođe se ova metoda primenjuje kod proteina sa dosta ugljenih hidrata kao što je slučaj sa hranom koja ima visok sadržaj monosaharida (Fountoulakis i Lahm, 1998). Derivatizacija sa OPA reagensom u prisustvu redukujućih agenasa je metoda koja se najčešće koristi u pripremi esencijalnih aminokiselina.

Derivatizacija amniokiselina korišćenjem o-ftaladehida (OPA) je najčešća HPLC metoda u kvantitativnom određivanju esencijalnih aminokiselina. Ovu metodu

je uveo Roth 1971. godine. Prisutan β -merkaptetoanol određuje stabilnost OPA-merkaptetoanol kompleksa koji reaguje sa aminokiselinama i produkuje fluorescirajuće derivate koji se spontano razlažu. Dodatak merkaptetoanola rezultuje redukcijom količine OPA koja direkto kvantifikuje aminokiseline. Takođe, rastvarač utiče na pH reakcione mešavine, te se boratni pufer koristi u te svrhe (Dorresteyn i sar., 1996).

Urađena je kvantifikacija 15 esencijalnih aminokiselina i dodatno selenometionina za sve ispitivane vrste roda *Pleurotus* (Slika 21). Za validaciju metode i saznanja koji procenat aminokiselina se gubi tokom hidrolize, standardi su pripremljeni kao i uzorci. Rezultati ukazuju na to da se tokom hidrolize korišćenjem 6M HCl gubi između 13.42 i 91% aminokiselina. Korišćenjem 5M NaOH, gubitak metionina i selenometionina je iznosio 64%, odnosno 65%. Najosetljivije aminokiseline pored metionina i selenometionina bile su i glutaminska kiselina, tirozin i lizin (Tabela18).



Slika 19. Hromatogram standarda aminokiselina, koncentrovana smeša

Tabela 18. Gubitak aminokiselina nakon kiselinske (bazne) hidrolize praćene OPA derivatizacijom

Aminokiseline	Gubitak tokom hidrolize (%)	Retenciono vreme tr (min)
L-asparaginska kiselina	13.4	4.148
L-glutaminska kiselina	41.1	5.599
L-serin	22.7	11.535
L-histidin	18.0	15.197
L-glicin	19.5	21.523
L-triptifan	26.1	22.719
L-arginin	14.9	24.907
L-alanin	20.4	31.922
L-tirozin	77.2	32.249
L-metionin*	64.0	35.153
L-valin	17.1	35.417
L-fenilalanin	19.9	35.722
L-selenometionin*	65.0	35.971
L-izoleucin	18.1	37.354
L-leucin	22.9	38.123
L-lizin	91.4	41.374

*Aminokiseline su kvantifikovane nakon bazne hidrolize

Jednofaktorijskim ANOVA testom, utvrđeno je da se aminokiselinski sastav različitih vrsta gljiva nije međusobno razlikovao ($P < 0.05$). Takođe, utvrđeno je da nije postojala statistički značajna razlika između gljive bez i sa povećanim sadržajem selena za sva ispitivana jedinjenja selena u gljivama, kada je reč o esencijalnim aminokiselinama. To znači da zapravo prisutan selen ne menja aminokiselinski profil gljiva, osim kada je reč o aminokiselinama sa sumporom (Prilog B).

Aminokiselinska analiza *Pleurotus* vrsta ukazuje na dominantnu glutaminsku kiselinu (13.1-28.4 mg/g suve mase) i asparaginsku kiselinu 6.8-12.5 mg/g suve

mase (Tabela 19). Razlog može biti taj što su ove aminokiseline prekursori iz kojih se formiraju bočni lanci aminokiselina i to su skladišne forme azota (Akindahunsi i Oyetayo, 2006). U manjim koncentracijama detektovani su alanin, leucin, metionin i triptofan. Kvantifikovano je veoma malo histidina, tirozina i lizina. Ukupan sadržaj aminokiselina se kreće između 70 i 107 mg/g suve mase gljive.

Aminokiselinski sastav *Pleurotus* vrsta bio je sličan onom koji je objavio (Mattila i sar., 2002) s tim što su u navedenom radu dobijene vrednosti bile nešto veće za sve aminokiseline. U odnosu na objavljen sastav *Pleurotus* vrsta od strane Yang i saradnika, 2004. godine, dobijene vrednosti su bile veće, ali je aminokiselinski sastav bio sličan. Takođe, rezultati su bili slični i kod Meng i saradnika 2010. koji je objavio aminokiselinski sastav micelijuma *P. cornucopiae*, s tim što su dobijene vrednosti za tirozin, fenilalanin, lizin, leucin, izoleucin, histidin i glutamin u navedenoj publikaciji bile znatno veće.

Tabela 19. Aminokiselinski sastav *Pleurotus spp.* izražen u mg/g suve mase gljive

Aminokiseline	POP80 K	POP80 SP	PC K	PC SP	PS K	PS SP
L-asparaginska kiselina	6.8±0.19	8.2±1.08	8.5±2.3	10.1±0.9	9.4±0.3	12.5±0.5
L-glutaminska kiselina	17.4±0.5	15.4±1.4	20.2±0.4	20.2±1.7	28.4±1.8	27.04±1.8
L-serin	5.4±0.2	5.5±0.5	7.7±0.6	6.9±0.9	8.1±0.6	8.8±0.3
L-histidin	1.3±0.0	1.4±0.2	2.4±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	2.3±0.1
L-glicin	3.3±0.2	3.7±0.8	5.0±0.1	4.9±0.4	5.8±0.3	6.9±0.3
L-triptifan	6.4±0.1	7.0±0.9	8.6±0.1	8.5±0.6	9.6±1.2	10.9±0.6
L-arginin	2.6±0.0	3.6±0.3	5.1±0.3	5.1±0.3	1.9±1.7	0.3±0.5
L-alanin	7.7±0.4	5.2±0.9	6.0±0.1	6.1±0.5	9.7±0.8	10.7±0.5
L-tirozin	1.3±0.1	1.1±0.1	1.9±0.0	2.7±0.3	2.9±0.1	5.3±0.2
L-metionin	n.a.	0.6±0.0	n.a.	0.8±0.0	n.a.	0.4±0.1
L-valin	4.7±0.1	7.7±0.6	5.5±0.3	7.7±0.4	8.3±0.4	7.5±0.4
L-fenilalanin	3.7±0.1	3.7±0.6	4.5±0.2	4.6±0.4	6.0±0.3	5.7±0.3
L-SeMet	n.a.	0.07±0.0	n.a.	0.12±0.01	n.o.	0.05±0.0
L-izoleucin	3.5±0.1	3.5±0.3	4.1±0.2	4.3±0.3	5.5±0.2	4.6±0.3
L-leucin	5.5±0.1	4.9±0.5	7.2±0.2	7.1±0.6	9.3±0.5	9.1±0.5
L-lizin	0.3±0.0	0.5±0.1	0.6±0.0	0.6±0.0	0.5±0.0	0.7±0.0

PO=*Pleurotus ostreatus*; PC=*Pleurotus cornucopiae*; PS= *Pleurotus salmoneostramineus*

K-Kontrola, SP-Selenski kvasac

n.a.-nije analiziran

U svim gljivama sa povećanim sadržajem selena, metionina je bilo više u odnosu na selenometionin (Wrobel i sar., 2003). Odnos ove dve aminokiseline kod *P. ostreatus* P80 je oko 10:1, *P. cornucopiae* 7:1, *P. salmoneostramineus* 9.5:1, a za *P. ostreatus* P70 0.8:1-2:1 zavisno od dodatog jedinjenja. To znači da supstrat na kojem se gljiva gaji i parametri gajenja znatno utiču na odnos ove dve aminokiseline s obzirom na to da je jedino gljiva *P. ostreatus* P70 gajena u drugačijim uslovima u odnosu na ostale. Kod analize aminokiselinskog sastava, dokazano je da je selenski kvasac bio najbolji izvor selena u odnosu na druga dva jedinjenja (Tabela 20). Ovim se potvrđuje da neprečišćeni ekstrakti proteina ne daju dovoljno precizne rezultate o raspodeli selena u plodonosnom telu gljive zbog visokog sadržaja nečistoća (poglavlje 5.5.1).

Iako se u literaturi navodi da je oko 75% ukupnog selena inkorporirano u aminokiseline umesto sumpora kod gljiva (Wrobel i sar., 2003; EFSA, 2008), rezultati novijih istraživanja ukazuju na vrlo visok sadržaj drugih organojedinjenja sa selenom, neke mogu imati jaču antitumornu aktivnost od Se-Met (Huerta i sar., 2006). Zato su potrebna dodatna istraživanja na temu raspodele selena u gljivama. Neke od organskih jedinjenja tipa selenoaminokiselina poseduju kovalentnu vezu kojom se ostvaruje veza sa proteinima ili peptidima. Zato se vodena ekstrakcija selenskih uzoraka gljiva uglavnom završava efikasnošću ekstrakcije od svega 10–40% (Dernovics i sar., 2002).

Tri aminokiseline sa selenom SeCys, SeMet i neproteinska aminokiselina su identifikovane u gljivama *A. bisporus* i *L. edodes*. Neproteinska aminokiselina nađena je u proteinskim ekstraktima zbog vodorastvorljivosti i postoji delom u precipitatu proteina (Gergely i sar., 2006). Huerta i saradnici, 2005. godine navode SeMet kao dominantnu seleno komponentu gljiva *Macrolepiota procera*, *Lepista luscina* i *Boletus luridus*. Objavljeno je da je dosta selena kvantifikovano i u vidu jedinjenja malih molekulskih masa, najvećim delim selenoproteina (< 10 kDa). Takođe se navodi i prisustvo SeCys, Se⁺⁴ i Se-metilselenocisteina.

Tabela 20. Aminokiselinski sastav gljive *P.ostreatus* P70 izražen u mg/g suve mase

Aminokiseline	POP70 K	POP70 SP	POP70 Karbaz	POP70 SeO ₃ ²⁻
L-asparaginska kiselina	6.8±0.2	9.6±0.5	7.8±0.3	6.7±0.9
L-glutaminska kiselina	13.1±0.2	16.2±0.8	15.5±0.5	12.1±1.5
L-serin	5.1±0.2	6.9±0.3	6.0±0.1	4.9±0.7
L-histidin	1.1±0.1	1.6±0.1	1.6±0.1	0.9±0.2
L-glicin	4.7±0.1	5.9±0.2	4.5±0.3	3.6±0.7
L-triptifan	8.2±0.1	9.9±0.3	8.5±0.3	6.6±1.2
L-arginin	5.3±0.0	6.5±0.4	5.9±0.2	3.4±0.6
L-alanin	10.0±0.2	11.5±0.4	9.1±0.4	7.5±1.3
L-tirozin	3.2±0.3	5.8±0.3	3.9±0.2	2.6±0.5
L-metionin	n.a.	0.4±0.0	0.1±0.0	0.1±0.5
L-valin	6.2±0.1	7.5±0.3	6.3±0.3	5.3±0.8
L-fenilalanin	4.3±0.1	4.4±0.9	4.1±0.1	3.5±0.6
L-selenometionin	n.a.	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0
L-izoleucin	4.0±0.0	5.5±0.3	4.8±0.3	4.2±0.5
L-leucin	6.9±0.1	8.5±0.4	5.9±0.2	5.8±1.0
L-lizin	0.4±0.1	8.5±0.03	0.4±0.0	0.3±0.1

K-Kontrola; SP-Selenski kvasac; Karb-[Zn(dapsesc)]; SeO₃²⁻; Natrijum selenit

n.a.-nije analizirano

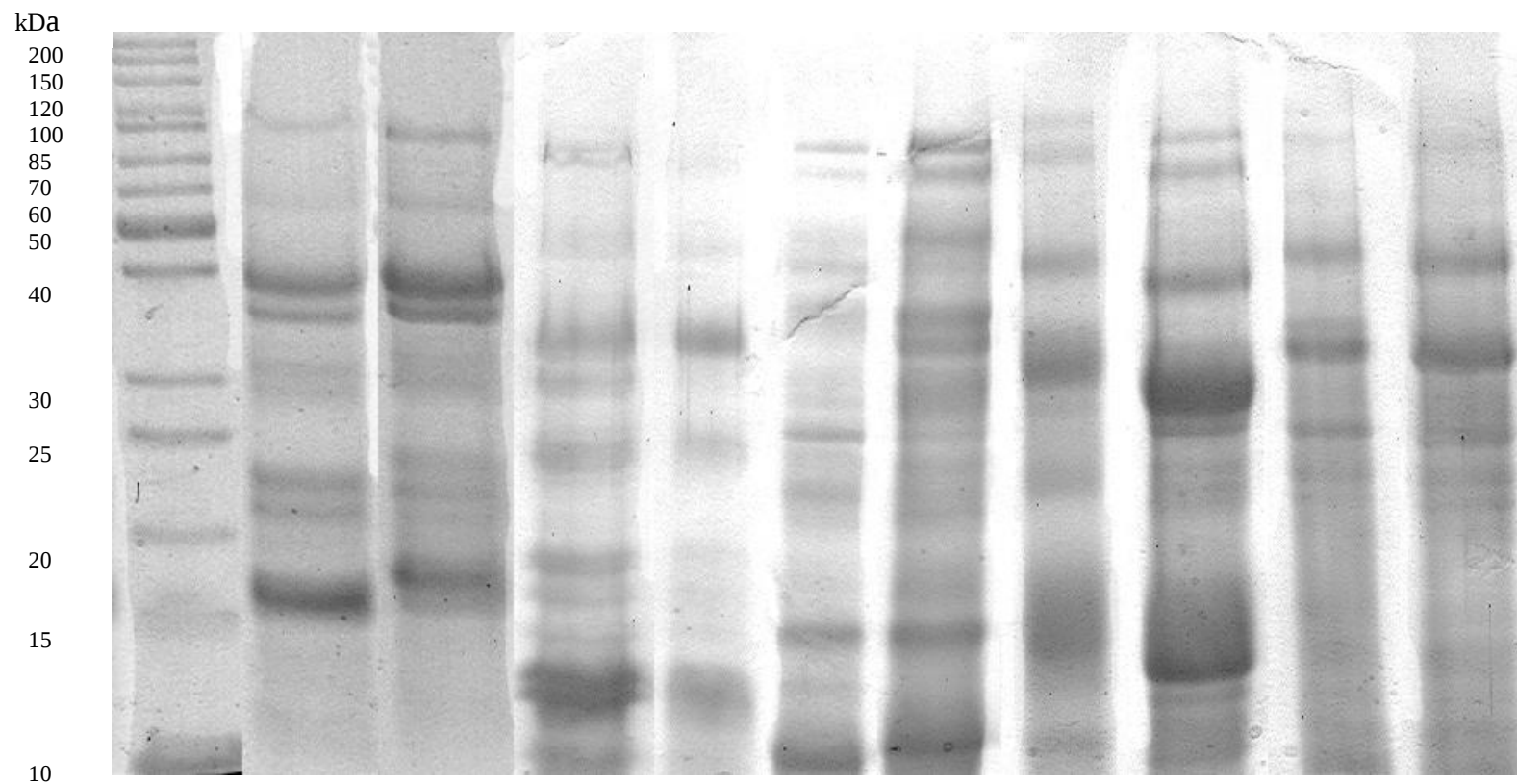
Ispitivanjem hemijskog sastava micelije *L. edodes* sa selenom u ranijem istraživanju dokazano je da se povećanjem ukupnog selena sa 23 µg/g suve mase na 1800 µg/g suve mase sadržaj selenoaminokiselina povećao sa 23 na 289 µg/mL, ali gledajući u odnosu na ukupan selen, taj procenat se drastično smanjuje sa oko 70% na svega oko 6% dok je za Se-Cys dokazano da ne zavisi direktno od sadržaja selena u medijumu. Procenat prevedenog metionina u selenometionin rastao je proporcionalan povećanju selena u podlozi (Turlo i sar., 2010). Glavne aminokiseline nađene u polisaharidnom ekstraktu dobijenom iz ovakvog uzorka jesu serin, alanin i glutaminska kiselina (Malinowska i sar., 2009).

5.5.3. Skrining proteinskog profila (SDS-PAGE gel elektroforeza)

Ekstrakti gljiva sadrže komplekse proteina sa drugim makromolekulima, kao i molekulima male mase. Iz tog razloga se za svaku pripremu uzorka proteina podrazumeva nekoliko koraka prečišćavanja u cilju izolovanja bioaktivnog proteina ili proteinskih kompleksa u čistoj formi. Jedna od čestih metoda jeste metod precipitacije sa amonijum sulfatom u kombinaciji sa dijalizom (Erjavec i sar., 2012). Rastvorljivost proteina zavisi od koncentracije soli u rastvoru. Fizičko oštećenje na ćelijskom zidu gljive ili oštećenje izazvano dejstvom endogenih proteaza, dovodi do otkrivanja vrlo niskog sadržaja proteina velike molekulske mase (preko 150 kDa). Ovo se može izbeći korišćenjem inhibitora proteaze ili odgovarajućim puferima (Bridge i sar., 2004). Jedan od ciljeva rada bio je i da se ispita raspodela selen u proteinskim frakcijama, kao i da se proverí molekulska masa proteina sa selenom i uporedi sa proteinima bez povećanog sadržaja selen. Najčešće se primenjuje metoda po Laemmli-ju. Razdvajanje proteina SDS-PAGE metodom koristi se za određivanje relativne molekulske mase, raspodelu glavnih proteinskih frakcija u uzorku. Dokazano je da niske koncentracije selen stimulišu aktivnost proteaza, koja hidrolizuje albumin i globulin do aminokiselina ili malih molekula peptida, dok visoke koncentracije selen imaju inhibitorski efekat na rast gljiva, dok odsustvo selen redukuje prinos (Liu i sar., 2011). Dokazano je da proteini dobijani iz gljive *G. lucidum* obogaćene selenom imaju jače antioksidativno delovanje, koje se povećava sa povećanjem selen. Iz ovog razloga, u istom istraživanju je izolovan čist protein sa visokim sadržajem selen kako bi se utvrdila veza između sadržaja selen i aktivnosti proteina (Du i sar., 2007). Izolovali su novi vodo-rastvorni seleno-protein iz gljive (36 kDa) koristeći postupak amonijum sulfatne precipitacije i prečišćavanja. El-Fakharany i saradnici su 2010. godine prečistili enzim lakazu (58 kDa) antiviralnog dejstva iz plodonosnog tela gljive *P. ostreatus*. Lektini su izolovani iz gljive *P. sajor-caju*. U poslednjih par decenija poraslo je izuzetno interesovanje za lektinima, proteinima sa antiviralnim, antibakterijskim i antifungalnim delovanjem (Xu i sar., 2011).

Proteini dobijeni iz uzoraka gljiva analizirani su na SDS-PAGE elektroforezi (Slika 20). Dobijene frakcije su razvrstane prema molekularnoj masi. Kao što je i očekivano, uzorci gljive su imali širok opseg proteinskih frakcija, od oko 9.5-110 kDa. Raspored frakcija na SDS-PAGE gelu pokazuje postojanje značajne intraspecijske razlike. Više od 10 frakcija može se vizualizovati u uzorcima. Postupkom razdvajanja proteina na SDS-PAGE gelu, najvećim delom se razdvajaju frakcije manjih molekularnih masa, manje od 70 kDa, najbolje su razdvojene one ispod 30 kDa, u proseku oko 50% u odnosu na ostale uočene, u slučaju vodorastvornih proteina. Nije bilo detektovanih proteina sa molekularnom masom većom od 110 kDa. Proteinske frakcije od oko 15 kDa i između 30 i 40 kDa bile su dominantne za sve proučavane sojeve i vrste. Za većinu uzoraka, frakcije su imale slične molekularne mase, jedino je kod gljive *P. salmoneostramineus* detektovana traka od 100 kDa. Između sojeva proučavanih gljiva bilo je primetne razlike u prisutnim proteinskim frakcijama, međutim prisutan selen u različitom obliku nije uticao na promenu molekularnih masa. U soju *P. ostreatus* P70, dominantne su bile frakcije od oko 46 kDa, 36 kDa i 18 kDa. U soju *P. salmoneostramineus*, od oko 36 kDa i 17 kDa, a u soju *P. ostreatus* P80 od oko 40 kDa, 33 kDa i 18 kDa. U soju *P. cornucopiae*, dominantne su bile frakcije od oko 48 kDa, 40 kDa i 18 kDa.

U ranijim istraživanjima je utvrđeno da gljiva *Ganoderma lucidum* najvećim delom transformisan selen iz podloge inkorporira u vodorastvorne proteinske frakcije koje su manje od 16 kDa (Zhao i sar., 2004). Osim polisaharida, takođe i proteini imaju izražena bioaktivna svojstva (Xu i sar., 2011). Uslovi gajenja su izuzetno važni za dobijanje visokog procenta proteina u uzorku. Selen je inkorporiran u svim proteinskim frakcijama gljive *Ganoderma lucidum* obogaćene selenom. Takođe je primećeno da selen nije uticao na distribuciju proteina u uzorcima što je slučaj i u našim uzorcima. Sa smanjenjem molekularne mase proteinske frakcije, sadržaj selena raste (Zhao i sar., 2004). U istraživanju rađenom na gljivi i bakteriji sa dodatim selenom, u analiziranom uzorku proteina zaključeno je da sve frakcije proteina mogu da usvoje selen, od najmanjih oko 8 kDa pa do onih od oko 140 kDa (Kim i sar., 2009).



Slika 20. SDS-PAGE vodorastvorljivih proteina proučavanih vrsta i sojeva gljiva bez i sa dodatkom selena metodom po Laemli-ju.

Trake s leva na desno su redom: Standard, *P. ostreatus* P70 kontrola, *P. ostreatus* P70 Sel-Plex[®], *P. ostreatus* Na₂SeO₃, *P. ostreatus* P70 [Zn(dapsesc)], *P. salmoneostramineus* kontrola, *P. salmoneostramineus* Sel-Plex[®], *P. ostreatus* P80 kontrola, *P. ostreatus* P80 Sel-Plex[®], *P. cornucopiae* kontrola i *P. cornucopiae* Sel-Plex[®].

5.6. Optimizacija procesa proizvodnje gljiva

Jedan od ciljeva rada je i proučavanje kultivacije i definisanje najboljeg načina za što efikasnije obogaćivanje gljiva selenskim kvascem kako bi se korigovao nedostatak u ljudskoj ishrani.

Sastav čvrstog supstrata jedan je od faktora koji utiču na rast gljive, na izgled plodonosnog tela i prinos biomase. Vicente je 2000. godine ukazao na uticaj supstrata za gajenje *Pleurotus* gljive na kompoziciju aminokiselina i lipida plodonosnog tela što je važno pri proizvodnji gljiva sa selenom. U fazi fruktifikacije i reprodukcije gljiva, svetlost ima važnu ulogu i može direktno ili indirektno da utiče na njihov rast i morfologiju. Bukovača može rasti na različitim materijalima uključujući slamu, kukuruzne klice, ostatke povrća i drugo. Piljevina, strugotina drveta i slama sa dodatim suplementima se najčešće koriste u komercijalnoj proizvodnji. Smatra se da su pšenične mekinje kao dodatak odličan izvor Ca, P, K, kao i proteina koji su esencijalni za rast gljive. Slama u kombinaciji sa 20% mekinja predstavlja idealan supstrat za razvoj micelijuma mnogih lignikolnih gljiva. S obzirom na to da se gljive normalno razvijaju na drvetu (Singer, 1962), razumljiv je i njihov rast na slami kao celuloznoj sirovini. Enzimi gljiva depolimerizuju, razgrađuju i demineralizuju celulozu, hemicelulozu, lignin u proizvode potrebne radi micelijarnog rasta i propagacije. Slama se najčešće koristi zbog dobre apsorpcije i održavanja vlažnosti potrebne za pravilnu fiziologiju gljive (Stamets, 2000), osim toga supstrat je dovoljno rastresit što je pogodno za rast micelije. Slama bi trebalo da je sveža i suva. Gajenjem gljive *P. florida* na pirinčanoj slami sa prahom pamuka, postiže se veći prinos biomase, sa povećanim sadržajem proteina, aminokiselina, ukupnih lipida dok se smanjuje sadržaj vlakana i šećera. Kao dobra kombinacija za visok prinos biomase pokazala se i mešavina lešnikovog lista, vlažne slame i otpadnog papira (Vicente et al, 2006). No, za gajenje se mogu koristiti i drugi materijali, kao što je kombinacija otpadnog papira i pilećeg stajnjaka, ali sa manjim prinosom. Najvažnije je da supstrat bude čist, sitno isečen i sterilan.

Nakon otvaranja džakova, vrlo je važno sprečiti isušivanje supstrata što se postiže vlaženjem dva puta dnevno uz održavanje vlažnosti od oko 90%. Takođe,

važno je provetravati objekat u kome se odvija fruktifikacija najmanje jednom dnevno, održavati temperaturu na 15-20°C za zimske i do 25°C za letnje sojeve gljiva. Svetlost je bitan faktor za morfologiju plodonosnog tela gljive i preporučuje se 100-200 luksa oko 13h dnevno (Maksimović i Polak, 1998).

U cilju definisanja načina za što efikasnije obogaćivanje gljiva selenom iz selenskog kvasca kao odabranog jedinjenja, izvršeno je ispitivanje na kulturi *P. ostreatus* P70 i *Agaricus bisporus*.

Industrijski supstrat za gajenje bukovače pripremljen je na bazi slame (29%), bukove piljevine (24%), bukove šuške (42%) i gipsa (5%) kao što je opisano u poglavlju 4. Suvi supstat je navlažen sa 60% vode. Selenski kvasac je dodat u koncentracijama 25, 50, 75 i 100 mg/kg suve mase supstrata. Gljiva je rasla pod laboratorijskim uslovima u kontrolisanim parametrima okruženja.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da različite gljive imaju različitu mogućnost usvajanja selen iz supstrata dodatog u formi selenskog kvasca. Prva plodonosna tela gljive *P. ostreatus* P70 su se javila između 23. i 28. dana od inokulacije u kontrolnim i uzorcima sa niskim procetom selen. Kada su rasle na supstratu sa preko 75 mg/kg Se, prva berba je obavljena 3-5 dana kasnije. Prolongacija je takođe primećena i kod gljive *Agaricus bisporus* obogaćene selenom iz kvasca.

Tabela 21. Step en usvajanja različitih koncentracija selenskog kvasca u plodonosno telo gljive *P.ostreatus* P70

mg Se/kg komposta	0	10	25	50	75	100
μg Se/g						
suve mase	0.7±0.1	22.4±1.7	42.4±3.4	88.2±0.9	101.1±3.9	133.1±2.4
gljive						

Rezultati ranijih istraživanja (Estrada et. al, 2009) ukazuju na značajnu korelaciju u sadržaju selen u supstratu i u plodonosnom telu. Šešir i spore su najbogatije selenom i sadrže znatno više mikronutrijenta nego drška (Falandysz, 2008), što

ukazuje na nejednaku raspodelu selena u plodonosnom telu tokom fruktifikacije. Prosečan sadržaj selena u kontrolnim uzorcima gljiva kretao se između 0.12 i 0.68 µg/g čime se potvrđuje inicijalna tvrdnja da je supstrat iz prirode i gljive koje rastu na njemu siromašan u selen. Takođe, gljiva je usvojila značajnu količinu selena, preko 10 mg/kg. Sposobnost apsorpcije selena se smanjivala proporcionalno sa povećanjem količine selena dodatog u sustrat. Sa dodavanjem 10 mg/kg dobijena je gljiva sa 22.41 µg Se/g, a sa 100 mg/kg gljiva sa 133.12 µg Se/g (Tabela 21). Toksični efekat na rast gljiva pojavio se dodavanjem kvasca sa 75 mg/kg Se i više. Prikazani rezultati odnose se na gljive iz prvog fruktifikacionog talasa. Plodonosna tela dobijena u drugom talasu imala su oko 50% manje Se od onih u prvom talasu (Da Silva et al, 2012). Vetter i Rimoczi, 1993. su došli do zaključka da je najviši sadržaj ukupnih proteina kod gajene gljive *Pleurotus ostreatus* čiji je prečnik šešira od 5-8cm. Koncentracija proteina je niža kod starijih gljiva čime se objašnjava ova činjenica.

Mogućnost usvajanja selena iz selenskog kvasca potvrđena je i na gljivi *Agaricus bisporus* kada je selen dodat u kompost zajedno sa vodom za vlaženje. S obzirom na to da gljiva *Agaricus bisporus* sadrži dosta proteina, očekuje se da može usvojiti dosta selena što je potvrđeno u ranijim istraživanjima (poglavlje 2.5). Komercijalni kompost je zasejan micelijumom soja A 15. Kompost sa a_w - 0.68 sadržao je 1.9 % N i 0.08 % NH_3 . Prosečna masa jedne vreće iznosila je 19 kg. U prvoj fazi proizvodnje (inkubacija - prorastanje supstrata) održavna je konstantna temperatura supstrata od 25°C. Inkubacija je trajala od 18-21 dan. Po prorastanju micelijuma nanošena je pokrivka po površini hranljivog supstrata koja ima funkciju održavanja potrebne količine vlage. U trenutku kada je micelijum prorastao pokrivni sloj vršeno je prekopavanje pokrivnog sloja (grabuljanje) kako bi se omogućio rast plodonosnih tela po celoj površini vreće. Po izvršenom grabuljanju ubacivan je kiseonik u gajilište, što za cilj ima početak formiranja plodonosnih tela (fruktifikacija). Temperatura vazduha u gajilištu kretala se oko 18°C. Aplikacija selenskog kvasca izvršena je rastvaranjem u vodi, i to u tri koncentracije preračunato na količinu selena u preparatu: 35, 70 i 150 mg/kg suvog supstrata. Dodavanje selenskog kvasca je obavljeno u proizvodnim uslovima (Šampinjon centar, Kraljevo)

u tri stadijuma proizvodnje šampinjona: nakon zasejavanja, nakon pokrivanja, nakon grabuljanja.

Gljiva *Agaricus bisporus* je najviše selen usvojila u plodonosno telo dodatkom selenskog kvasca u kompost odmah nakon inokulisanja micelijumom. Velika razlika u količini usvojenog selen, zavisno od trenutka aplikacije, objašnjava se činjenicom da se selen zadržao u pokrivci jer u kasnijim fazama gljiva ima slabiju sposobnost apsorpcije selen, a da je u najvećem procentu usvojen selen iz supstrata tokom prorastanja micelijuma u ranoj fazi razvoja vegetativnog tela gljive (Tabela 22). Za postizanje visoke koncentracije selen u gljivi potrebno je, na osnovu navedenih rezultata, selen dodati supstratu odmah pri inokulisanju.

Tabela 22. Usvojivost selen u plodonosno telo gljive *Agaricus bisporus* pri dodavanju različitih koncentracija selenskog kvasca u kompost

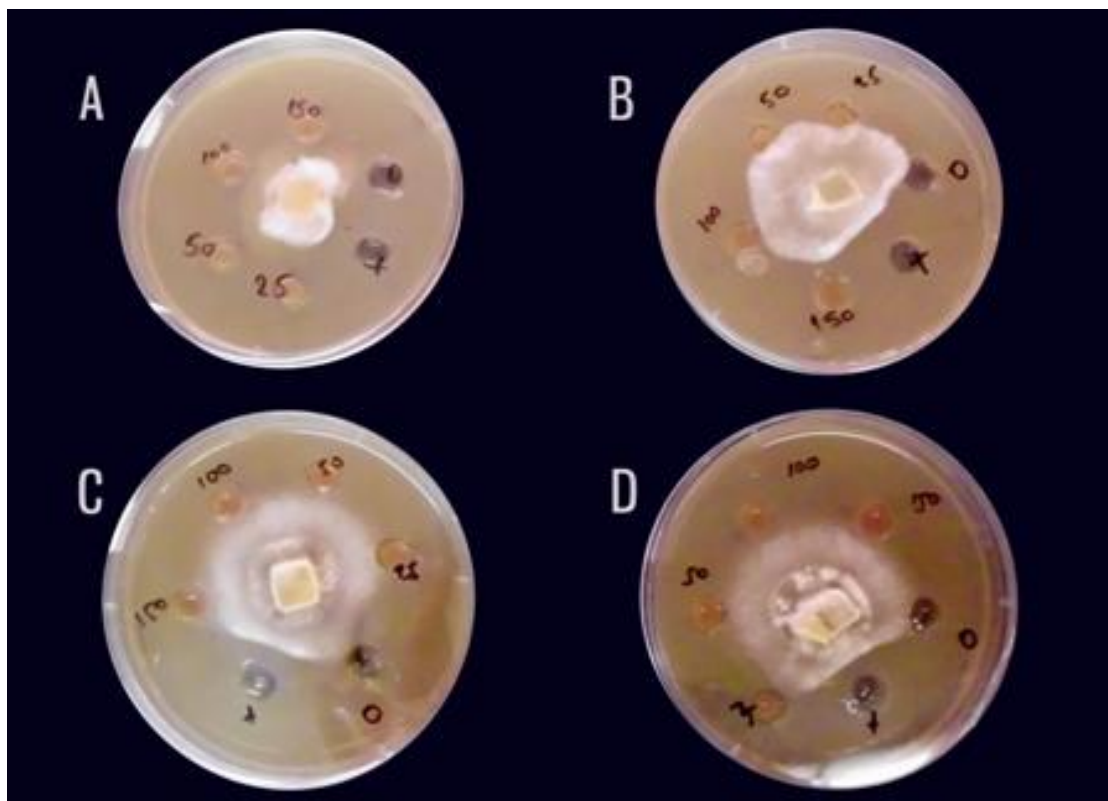
Količina dodatog selen (mg/džaku)	Dodatak Se po inokulisanju	Dodatak selen nakon pokrivanja	Dodatak selen po grabuljanju
100	130 ± 25.2	19.1 ± 8.2	5.4 ± 0.1
200	192.7 ± 34.2	28.1 ± 12.4	13.8 ± 3.2
400	275.2 ± 23.3	71.4 ± 9.1	28.4 ± 4.6

Turlo i saradnici su 2008. godine pratili kinetiku usvajanja selen u gljivi *L. edodes* gajenoj submerno, sa dodatkom 20 µg selenita/mL. Svakodnevnom praćenjem rasta, uzorkovanjem i kvantifikacijom selen, moguće je odrediti momenat kada gljiva usvaja najviše selen u skladu sa prinosom biomase. Zaključili su da je to u ovom slučaju bilo posle 7 dana gajenja, nakon čega se starenjem micelije sadržaj selen postepeno smanjuje.

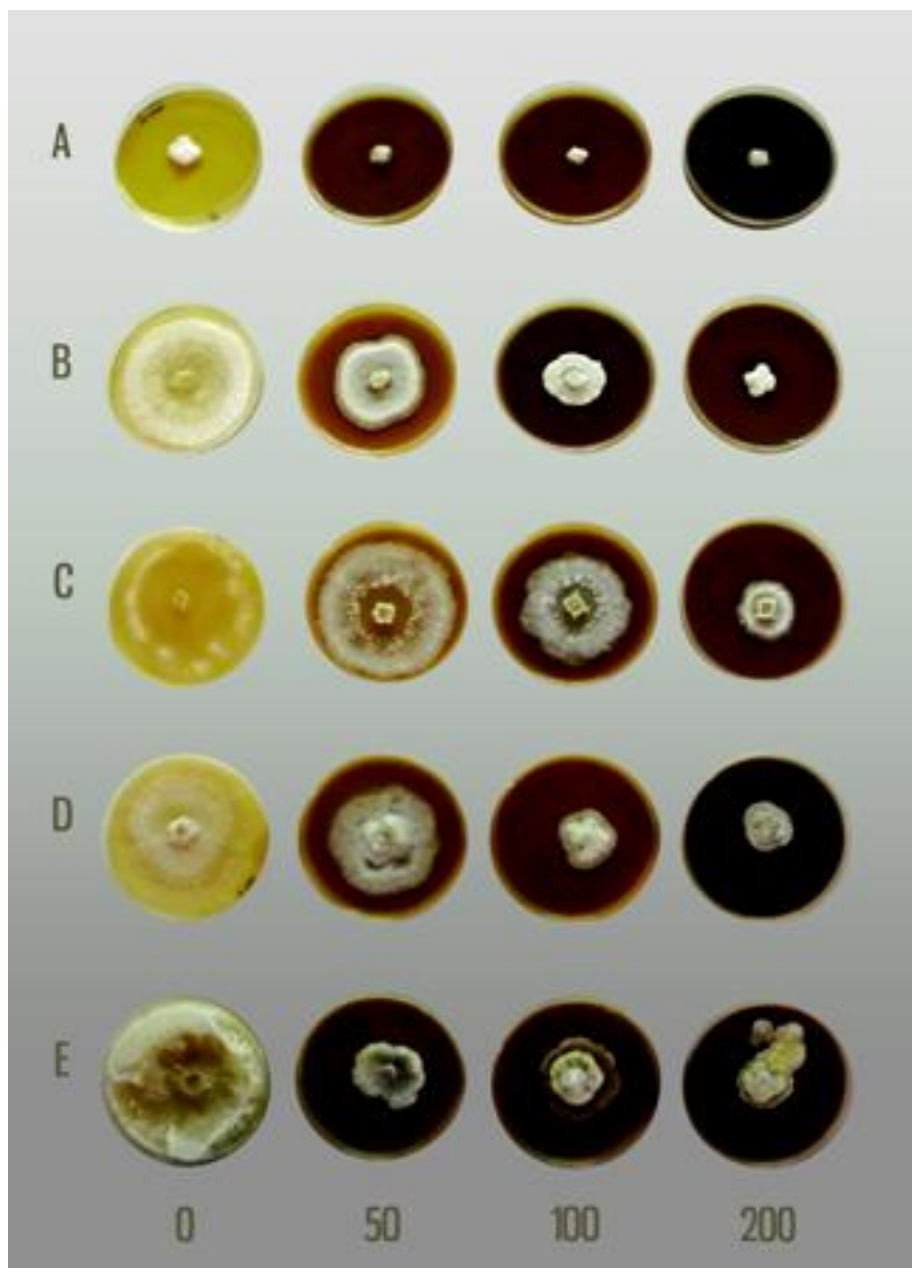
5.6.1. Određivanje antifungalne aktivnosti preparata Sel-Plex[®]

Veliki broj organizama izazivača bolesti, uključujući i plesni prisutan je u proizvodnom kompostu i pokrivki u gajilištima industrijskih gljiva gde nanose veliku štetu (Hatvani et. al., 2007). S obzirom na činjenicu da nekontrolisana upotreba fungicida dovodi do pojave sve većeg broja rezistentnih sojeva mikroorganizama uz prateće neželjene efekte, naučna istraživanja se usmeravaju ka pronalaženju novih preparata iz prirodnih izvora kao što su biljke i gljive (Sokovic and Van Griensven, 2006). Na osnovu navedenog, jedan od ciljeva istraživanja bio je ispitivanje antifungalne aktivnosti selenskog kvasca, preparata Sel-Plex[®] na patogene plesni, nalaženje nejefektnije koncentracije preparata i kao takvog aplikacija u proizvodnji selenom obogaćenih industrijskih gljiva. Efikasnost preparata Sel-Plex[®] kao fungicida još nije dokumentovana.

Antifungalna aktivnost različitih koncentracija preparata Sel-Plex[®] određivana je za pet sojeva plesni: *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃, *Trichoderma harzianum* P₁T₆, *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆, *Mycogone perniciosa* P₁M₂, i *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆. Rezultati ukazuju na snažno fungistatičko delovanje preparata na mikopatogene u gajilištima gljiva (Slika 21). Četiri od pet plesni je inhibirano korišćenjem visokih koncentracija organskog izvora selena (150 ppm) u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Na mestima negativne kontrole i nižih koncentracija preparata, micelija je potpuno prorasla tj., bila je otporna na preparat. Sel-Plex[®] nije značajno inhibirao rast gljive *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃. Porast micelije na sladnom agaru sa dodatim preparatom Sel-Plex[®] u poređenju sa kontrolom, prikazan je na slici 21. Rezultati ukazuju na to da porast ispitivanih antagonističkih gljiva može da se inhibira dodavanjem preparata selenskog kvasca u proizvodni supstrat. Razlika u porastu plesni na agaru bez i sa selenom statistički je značajna (P<0.05). Značajno se razlikovao porast plesni *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃ od porasta ostalih plesni. V₁V₃ je inhibirana dodatkom čak i nižih koncentracija Se u podlogu, 50 µg/mL. Rast micelijuma plesni u svim tretmanima bio je kontinuirano i značajno supresiran povećanom koncentracijom selena u podlozi (P<0.05).



Slika 21. Test antifungalne aktivnosti preparata Sel-Plex[®]. (A) *Mycogone perniciosa* P₁M₂, (B) *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆, (C) *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆, (D) *Trichoderma harzianum* P₁T₆ sa dodatim preparatom Sel-Plex[®] koncentracije: 0, 25, 50, 100 i 150 Se/ml i pozitivnom kontrolom (+).



Slika 22. (A) *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃, (B) *Trichoderma harzianum* P₁T₆, (C) *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆, (D) *Mycogone perniciosa* P₁M₂, (E) *Cladobotryum dendroides* Kal₁C₆, Tabela 2. Antifungalna aktivnost preparata Sel-Plex[®] na mikopatogene. Zona inhibicije određena je merenjem prečnika micelijuma (mm).

IC₅₀ vrednosti dobijene iz rezultata antifungalne aktivnosti prikazane su u Tabeli 23. Vrednost IC₅₀ za Sel-Plex[®] izražena kao koncentracija selen, kretala se od 31.63 µg/g do 574.4 µg/g. Sel-Plex[®] ima snažno fungistatičko delovanje na *Cladobotryum dendroides* (IC₅₀ je 31.63 µg/g Se). Primećen je nizak inhibicioni efekat preparata na gljive *Trichoderma harzianum* Ko₁T₆ i *Verticillium fungiola* var. *fungiola* V₁V₃. Za inhibiciju rasta ove dve vrste za 50%, potrebna je 7-18 puta veća koncentracija organskog jedinjenja selen (Slika 22).

Tabela 23. IC₅₀ vrednosti antifungalne aktivnosti preparata Sel-Plex[®]

Indikator mikroorganizmi	IC ₅₀ (µg/g Se)
<i>Trichoderma harzianum</i> Ko ₁ T ₆	229
<i>Trichoderma harzianum</i> P ₁ T ₆	64.6
<i>Mycogone perniciosa</i> P ₁ M ₂	67.6
<i>Cladobotryum dendroides</i> Kal ₁ C ₆	31.63
<i>Verticillium fungiola</i> var. <i>fungiola</i> V ₁ V ₃	574.4

Rezultati ukazuju na potencijal korišćenja selenskog kvasca za proizvodnju selenom obogaćenih gljiva, sa snažnim fungistatičkim delovanjem na mikopatogene plesni, izazivače štete u gajilištima industrijskih gljiva.

Najefikasnije koncentracije selenskog kvasca koje su inhibirale rast plesni jesu koncentracije 70-200 µg/g selen. Dodavanjem koncentracije od 100 mgSe/kg supstrata, selen će usporiti fruktifikaciju gljiva za par dana, ali će plodonosna tela usvojiti visoke koncentracije selen, oko 100 µg/g za *Pleurotus spp.* računato na suhu masu gljive. Na ovaj način postignut je dvostruki efekat gajenja gljiva sa dodatkom selenskog kvasca u proizvodni supstrat-smanjenje kontaminacije u supstratu i dobijanje plodonosnog tela gljive sa visokim sadržajem selen, dovoljnim za zadovoljenje dnevnih potreba čoveka.

6. ZAKLJUČCI

Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj selen u obliku neorganske soli selenita, organskog kompleksnog jedinjenja karbazona i selenskog kvasca u cilju nalaženja novog izvora ovog elementa koji će dobro uticati na prinos biomase i dobijanje novog dijetetskog suplementa.

Određivanje brzine rasta micelije

Praćen je uticaj selenskih jedinjenja na rast micelijuma komercijalnih sojeva gljiva *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* i *Pleurotus spp.* (*Pleurotus ostreatus* P70, *Pleurotus ostreatus* P80, *Pleurotus cornucopiae* i *Pleurotus salmoneostramineus*). Korišćeni su laboratorijski sojevi. Ispitivan je uticaj natrijum selenita koncentracije 1-100 µg/mL, kompleksa cink-selenosemikarbazona, Zn[(dapsesc)] koncentracije 1-50 µg/mL i selenskog kvasca- komercijalnog preparata Sel-Plex® (Alltech Inc., Lexington, USA) koncentracije 1-100 µg/mL. Micelijarni rast meren je kao prečnik rasta čiste kulture na agaru sa dodatkom različitih koncentracija jedinjenja sa selenom.

Neorganska so, natrijum selenit je delovala najtoksičnije na rast micelijuma bukovače. Snažno inhibitorno delovanje primećeno je već pri najmanjim koncentracijama. Za *P. ostreatus* selenski kvasac se pokazao kao najbolji dodatak selen i u manjim koncentracijama stimulisao je rast micelije. Kompleksno jedinjenje u manjim koncentracijama je takođe delovalo stimulatивно na rast micelijuma gljiva. Rast gljive *G. lucidum* bio je stimulisan neorganskim jedinjenjem selen, a najveću stimulaciju rasta pokazao je selenski kvasac. Kada je u pitanju gljiva *L. edodes*, najbolji izvor selen bio je natrijum selenit, a kompleksno jedinjenje i Sel-Plex nisu bili zadovoljavajući izvor selen zbog velikog inhibitornog delovanja na rast micelijuma već pri nižim koncentracijama.

Usvajanje selen u plodonosna tela gljiva *Pleurotus spp.*

U radu je ispitivana mogućnost akumulacije i transformacije selen iz selenita (100 mg Se/kg supstrata), selenskog kvasca (100 mg Se/kg supstrata) i kompleksnog jedinjenja (50 mg Se/kg supstrata) u plodonosno telo modela gljive *P.ostreatus* P70 proizvedene u laboratorijskim uslovima. Kod ostalih ispitivanih sojeva (*P. ostreatus* P80, *P. salmoneostramineus* i *P. cornucopiae*) koji su odgajani u gajilištu "Mycorex Mushroom Limited" (Larnak, Cyprus), praćena je samo mogućnost usvajanja selen iz selenskog kvasca (100 mg Se/kg supstrata) kao najpogodnijeg izvora selen. Gljive su proizvedene u industrijskim uslovima. Ukupan sadržaj selen u gljivama određen je na uređaju ICP-OES nakon kiselinske hidrolize sa vodonik peroksidom i azotnom kiselinom.

1. Selen iz Na_2SeO_3 koncentracije 100 mg/kg efektno je usvojen iz supstrata i akumuliran u plodonosno telo *P. ostreatus* P70 (120 μg Se/g suve mase). Nije uočena razlika u morfologiji plodonosnog tela bez i sa dodatim selenom. Selen je iz organskog kompleksnog jedinjenja uspešno usvojen i akumuliran u plodonosna tela gljive. Sadržaj selen u obogaćenoj gljivi kretao se u proseku 65 $\mu\text{g/g}$. Nije primećena razlika u izgledu plodonosnih tela bez i sa dodatim selenom.

2. Izučavane vrste gljiva imaju različitu mogućnost apsorpcije selen dodatog u supstrat u formi selenskog kvasca. Fruktifikacija je kasnila 3-5 dana kod uzoraka sa dodatim selenskim kvascem u količini od 50 mg/kg Se. Ukupan sadržaj selen je bio najveći kod soja *P. salmoneostramineus* 197.93 $\mu\text{g/g}$, zatim *P. ostreatus* P80 137.84 $\mu\text{g/g}$, *P. cornucopiae* 122.11 $\mu\text{g/g}$, *P. ostreatus* P70 133.12 $\mu\text{g/g}$.

3. Usvajanje i prisustvo metala u plodonosnom telu gljiva zavisi od ekoloških faktora, genetskih karakteristika svake vrste pojedinačno, starosti gljive, kao i oblika u kom se elementi nalaze u zemljištu. Supstrat određuje mobilnost i dostupnost metala. Korišćenje selenskog kvasca je potencijalni izvor Se sa nizom prednosti. Izloženost neorganskim jedinjenjima Se izaziva kratkoročne i dugoročne zdravstvene probleme kod čoveka. Dodatkom visokih koncentracija Sel-Plex® u supstrat, 70-100 mg/kg Se, selen će usporiti rast gljiva 3-5 dana, ali će plodonosna tela usvojiti

visok sadržaj selena, u proseku oko 100µg/g za *Pleurotus spp.* računato na suhu masu uzorka.

Nutritivni sastav gljiva sa selenom

Ispitivan je hemijski sastav gljiva u cilju utvrđivanja uticaja selena na eventualnu razliku u hemijskom sastavu i praćenja transformacije usvojenog selena u plodonosnom telu. Određivan je ukupan sadržaj ugljenih hidrata, proteina, lipida i fenola i meren je ukupan sadržaj selena u proteinima i polisaharidima odgovornim za akumulaciju najvećeg dela selena.

1. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u celim gljivama određen je kolorimetrijski korišćenjem fenol-sumporne metode uz D-glukozu kao standard. Postojala je statistički značajna razlika u sadržaju ugljenih hidrata između svih sojeva bukovače obogaćene selenom, 20-42.89%. Kod svih ispitivanih sojeva, sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u gljivama obogaćenim selenom iz kvasca bio je do 25% veći u odnosu na kontrolu. Kada se posmatra uticaj neorganskog jedinjenja ili kompleksa, razlika u rezultatu između kontrolnog i obogaćenog uzorka nije statistički značajna. Dobijeni rezultati svakako potvrđuju da se selen vezuje za ugljene hidrate kao i to da vrsta jedinjenja selena verovatno utiče na ekstraktibilnost ugljenih hidrata.

2. Ukupan selen u proteinima određen je na uređaju ICP-OES. Uzorak je ekstrahovan u Tris-HCl (pH 7.5) puferu nakon čega je izvršana precipitacija acetonom. Razlika u sadržaju neprečišćenih proteina najpre je izazvana razlikama u vrsti, ali i u proizvodnom supstratu i uslovima gajenja gljive. Utvrđeno je da postoji značajna razlika u proteinskom sadržaju između različitih sojeva sa dodatim selenom iz kvasca (13.31-23%). Takođe je utvrđeno i da različita jedinjenja selena kod *P. ostreatus* P70 dovode do značajne razlike u sadržaju proteina (11.32-13.24%). Samo je sadržaj proteina kod gljive obogaćene selenom iz neorganske soli (11.32%) bio značajno niži u odnosu na kontrolu.

3. Sadržaj lipida u plodonosnom telu gljiva određen je postupkom koji je opisan u AOAC, 1995. Sadržaj lipida se u gljivama sa dodatim selenom kretao 1.71-

3.09%. Nije postojala statistički značajna razlika između uzoraka sa i bez povećanog sadržaja selen. Kod svih ispitivanih sojeva, pri dodatku selen iz selenskog kvasca došlo je do smanjenja u sadržaju lipida, međutim kod *P. ostreatus* P70 sa dodatkom selen iz kompleksa ili neorganske soli, sadržaj ukupnih lipida je bio veći u odnosu na kontrolne uzorke. Prisutan selen je menjao koncentraciju lipida, ali ne značajno.

4. Sadržaj ukupnih fenola određen je spektrofotometrijski korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa. Sadržaj fenola je kod gljiva sa selenom bio za oko 30-40% veći u odnosu na sadržaj fenola kod kontrolnih gljiva, osim u slučaju dodavanja kompleksa [Zn(dapsesc)] gde je sadržaj fenola bio nešto manji u odnosu na druge uzorke gljive *P. ostreatus* P70. Povećan sadržaj fenola može imati veze sa inhibicijom enzima polifenoloksidaze seleno-komponentama kao snažnim antioksidantima. Iz tog razloga se može pretpostaviti da su gljive sa selenom snažniji antioksidansi u odnosu na gljive bez dodatog selen.

Hemijska karakterizacija polisaharidnih ekstrakata sa selenom

Radi praćenja transformacije usvojenog selen u plodonosnom telu gljive, rađena je hemijska karakterizacija neprečišćenih vrelih vodenih i alkalnih ekstrakata polisaharida. Određivan je ukupan sadržaj selen, ugljenih hidrata, β -glukana, proteina, i fenola u ekstraktima. Takođe je urađena strukturna analiza ekstrakta FT-IR spektroskopijom i određen je monosaharidni sastav HPLC metodom. Za dobijanje polisaharidnog ekstrakta iz plodonosnog tela gljiva korišćen je postupak ekstrakcije vrelom vodom i alkalne ekstrakcije uz alkoholnu precipitaciju sa 96% etanolom na hladnom, 24h.

1. Nakon obogaćivanja gljiva selenom, primećeno je značajno smanjenje prinosa polisaharidnih ekstrakata, kako vodenih tako i alkalnih najverovatnije kao posledica smanjenja njihove rastvorljivosti vezivanjem selen. Kod svih ekstrakata, primećena je negativna korelacija između prinosa ekstrakata i sadržaja selen u uzorcima gljiva. Prinos polisaharida dobijenih vrelom alkalnom ekstrakcijom bio je veći u odnosu na prinos vrelom vodenom ekstrakcijom. Pretpostavlja se da je razlog ovome to što je vreli alkalni tretman bio efektivniji u degradaciji ćelijskog zida i

vodo nerastvornih materijala koje su zaostale nakon izdvajanja vodorastvornih komponenata.

2. Ispitivanjem sadržaja ukupnog selena u vrelim vodenim (merenje na ICP-OES nakon kiselinske hidrolize), a i alkalnim polisaharidnim ekstraktima gljiva, uočeno je da se vrlo visok sadržaj selena zadržava u polisaharidima. U poređenju sa polisaharidom izolovanim iz plodonosnog tela gljive *P. ostreatus* P70 obogaćene selenom iz neorganskog izvora, organski je u većoj meri inkorporiran u polisaharidu. Poredeći rezultate dobijene za sojeve gljiva obogaćene selenom iz kvašćevog preparata, koncentracija selena u obogaćenim uzorcima bila je značajno veća u odnosu na kontrolne uzorke. Dokazana pozitivna korelacija između celih gljiva i vodenih ($r=0.895$) i alkalnih ekstraktata ($r=0.725$) kada je reč o sadržaju selena. Statističkom analizom, utvrđeno je postojanje najmanje duplo veće koncentracije selena u vrelim vodenim nego u alkalnim polisaharidnim ekstraktima, što znači da se selen najvećim delom zadržava u vodorastvornim komponentama. Alkalni ekstrakt gljive *P. salmoneostramineus* imao je najveću koncentraciju selena i značajno se razlikovao u odnosu na sve ostale sojeve.

3. Prisutan selen koji se vezuje za ugljene hidrate, uticao je na sadržaj ukupnih ugljenih hidrata u polisaharidnim ekstraktima kako vrelim vodenim tako i alkalnim. Koncentracija ugljenih hidrata u vrelim vodenim ekstraktima sa povećanom koncentracijom selena za *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus*, *P. ostreatus* P80 i *P. ostreatus* P70 kretala se redom 225.6 mg/g, 457.6 mg/g, 412 mg/g i 420.4 mg/g. Razlika u odnosu na kontrolne gljive nije bila značajna. S obzirom na to da su u pitanju neprečišćeni vrela vodena ekstrakta, pretpostavlja se da su na prinos pored prisutnog selena uticale i druge prisutne komponente u ekstraktu, što ponovo zavisi od sojeva gljive. Takođe, kao u slučaju vrelog vodenog ekstrakta, u alkalnim ekstraktima gljiva sa povećanim sadržajem selena *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus*, *P. ostreatus* P80 i *P. ostreatus* P70 sadržaj ukupnih ugljenih hidrata bio je veći u odnosu na kontrolne ekstrakte 684.3 mg/g, 665 mg/g, 696.4 mg/g i 577.2 mg/g. Moguće je da veći sadržaj ovih polisaharida predstavlja vid odbrane od oksidativnih oštećenja. Takođe, moguć je uticaj selena jedinjenja na

enzime gljive. U alkalnim ekstraktima bilo je više ugljenih hidrata kao posledica razgradnje ćelijskog zida pod uticajem rastvarača.

4. Korišćenjem beta glukana kita Mushroom and Yeast β -glucan Assay Procedure, utvrđeno da se sadržaj β -glukana u vrelin vodenim ekstraktima sa povećanom koncentracijom selen kretao 26.1-138.2 mg/g suve mase ekstrakta. Kod svih vreljih vodenih ekstrakata sa povećanim sadržajem selen, detektovan je značajno viši sadržaj β -glukana. U slučaju soja *P. ostreatus* P70, kod vodenog ekstrakta sa selenom dobijenom iz gljive koja je rasla na supstratu sa neorganskim selenom i kompleksom, došlo je do statistički značajnog smanjenja sadržaja β -glukana. Iz ovoga se pretpostavlja da vrsta jedinjenja korišćenja u suplementaciji ima važnu ulogu u sadržaju glukana i prednost je u korišćenju organskog jedinjenja selen. Primećeno je da se u alkalnim ekstraktima nalazilo i do pet puta više β -glukana u odnosu na odgovarajuće vrele vodene ekstrakte. U svim uzorcima, osim u ekstraktima gljive *P. salmoneostramineus*, sadržaj β -glukana bio je statistički značajno manji u odnosu na kontrolu, 100.7-224.8 mg/g suve mase ekstrakta.

5. Kod vodenog i alkalnog ekstrakta svih uzoraka, postojala je značajna razlika u sadržaju fenolnih jedinjenja između kontrolnih i ekstrakata sa povećanim sadržajem selen dobijenih kod svih dodavanih seleno jedinjenja. U vrelin vodenim ekstraktima, ukupan sadržaj fenola kod uzoraka sa povećanim sadržajem selen bio je za oko 10-30% veći u odnosu na kontrolne uzorke, osim u slučaju uzorka sa dodatkom selen iz kompleksa [Zn(dapsesc)]. Sadržaj fenolnih jedinjenja u obogaćenim ekstraktima selenom iz kvasca kretao se od 3.82 mg/g do 15.6 mg/g. Kod alkalnih ekstrakat efekat je bio suprotan, ukupan sadržaj fenola kod uzoraka sa povećanim sadržajem selen bio je i do 80% manji u odnosu na kontrolne uzorke.

6. Koncentracija proteina u ekstraktima polisaharida određena je spektrofotometrijski metodom po Bradfordu. Sadržaj ukupnih proteina za vrele vodene ekstrakte sa povećanim sadržajem selen kretao se 327-526 mg/g, a u alkalnim ekstraktima sa selenom 13.3-23.9 mg/g suve mase ekstrakta. U vodenim ekstraktima dobijenim iz selenom obogaćenih *P. cornucopiae*, *P. salmoneostramineus* i *P. ostreatus* P80 dobijeno je značajno veći prinos proteina u odnosu na kontrolne ekstrakte. Kod gljive *P. ostreatus* P70, bilo je obrnuto, s tim što

je najveći udeo proteina nađen u ekstraktima iz gljive sa dodatim neorganskim selenom u odnosu na druga dva organska izvora. Najveći deo proteina izdvojen je vrelom vodenom ekstrakcijom dok se alkalnom ekstrakcijom izdvaja do 20 puta manje proteina. Ovim se takođe objašnjava znatno niža koncentracija selen u alkalnim ekstraktima.

7. Polisaharidni ekstrakti predstavljaju mešavinu polisaharida, proteina i polifenola koji su i dalje prisutni nakon vrele vodene/alkaline ekstrakcije i alkohoolne precipitacije iz čega se izvodi generalan zaključak da na nutritivni sastav utiče ne samo dodatak selen već i vrsta, starost, uslovi gajenja gljive, oblik jedinjenja selen dodat u podlogu i kasnije postupak ekstrakcije korišćen u pripremi polisaharida. Vrela vodena ekstrakcija praćena alkoholnom precipitacijom nisu bile dovoljan uslov za potpuno uklanjanje proteina iz ekstrakta. Iz priloženog se vidi da su neprečišćeni vreli vodeni ekstrakti zapravo kompleks polisaharida i proteina, čime se i objašnjava visok procenat selen koji je kvantifikovan u ekstraktima.

8. U cilju određivanja prisutnih glikozidnih veza u polisaharidnim ekstraktima gljiva, uzorci su analizirani FT-IR spektroskopskom metodom, presovanjem KBr diskova. Dobijeni FT-IR spektri ukazuju na to da polisaharidni ekstrakti imaju spektre karakteristične za ugljene hidrate. Vreli vodeni ekstrakti dobijeni iz uzoraka gljiva obogaćenih selenom iz kvasca imali su izraženije pikove α - i β -glikozidnih veza nego kontrolni ekstrakti. Takođe, samo kod ovih uzoraka detektovane su slabe apsorpcione trake karakteristične za hemicelulozu. Posmatrajuci alkalne ekstrakte, jedino su spektri karakteristični za α -glukane bili slični u uzorcima sa i bez dodatog selen. Apsorpcione trake karakteristicne za β -glukane bile su intenzivnije u kontrolnim ekstraktima nego u ekstraktima sa dodatim selenom za sve sojeve gljiva. Pretpostavlja se da se selen vezuje za ugljene hidrate i moguće je da je tokom alkaline ekstrakcije otežana ekstrakcija usled prisustva selen. U alkalnim ekstraktima najvećeg broja uzoraka pik karakterističan za β -glukan bio je odsutan, što ukazuje na to da vrela alkalna ekstrakcija degradira polisaharide naročito u osnovnom nizu. Na osnovu dobijenih rezultata, može se izvesti zaključak da kombinacija selen verovatno ne utiče na glavnu strukturu polisaharida. Pored navedenog, snimljeni spektri ukazuju i na prisustvo proteinske strukture, feonolne

komponente čime se ukazuje na prisustvo aromatičnih jedinjenja, verovatno pigmentata. Pikovi koji ukazuju na prisustvo hitina, tako da se pretpostavlja da su α -glukani kovalentno vezani za druge polimere kao što je hitin za koji se smatra da je glavna fibrilarna komponenta polisaharida u ćelijskom zidu vrsta gljive *Pleurotus*.

9. Određen je monosaharidni sastav polisaharidnih ekstrakata za 10 monosaharida. Polisaharidni ekstrakti hidrolizovani su sa triflorsirćetnom kiselinom. Pre analize vršena je PMP derivatizacija uzoraka i uzorci su analizirani na RP-HPLC uređaju. Kod svih ispitivanih sojeva, najzastupljeniji monosaharidi bili su redom glukoza, galaktoza i manoha. Jedino se za sve ekstrakte ispitivanih sojeva gljive može zaključiti da se nivo glukoze povećava u alkalnim ekstraktima u odnosu na vrele vodene. Sadržaj galaktoze i manoha je zavisio od soja i vrste gljive. Može se pretpostaviti da kod soja P70 i sam tip jedinjenja selena i način ekstrakcije utiče na monosaharidni sastav polisaharida. Kod gljive *P. salmoneostramineus* fukoza je bila značajno prisutna kod vrela vodenih ekstrakata, i to 2.82-6.64%. Moguće je da na detekciju monosaharida uticaj vrste i druge prisutne komponente koje otežavaju detekciju. Nije bilo značajne razlike u monosaharidnom sastavu između kontrole i obogaćenih uzoraka, kao ni između vodenih i alkalnih ekstrakata. Ostali detektovani monosaharidi su takođe komparabilni, ali su prisutni u znatno manjoj koncentraciji sa dosta niskim pikovima u odnosu na navedena 3 heksozna monosaharida. Može se izvesti zaključak da na monosaharidni sastav ekstrakata utiču tip selenojedinjenja, soj gljive, uslovi gajenja, starost gljive i rastvorljivost u različitim rastvaračima. Razlika u monosaharidnom sastavu neprečišćenih vrela vodenih i alkalnih ekstrakata može se objasniti time što su vodorastvorni polisaharidi nerastvorni u alkalijama i obrnuto. Ovo utiče na razliku u monosaharidnom sastavu. Tokom alkalne ekstrakcije, ćelijski zid se razara i intramolekulski polisaharidi prelaze u rastvarač.

Hemijska karakterizacija proteina sa selenom

Sadržaj proteina u gljivama zavisi od sastava supstrata, od talasa, vremena berbe i vrste. Sadržaj proteina se brzo smanjuje tokom stajanja ubrane gljive. Cilj praćenja transformacije selena u proteinima je između ostalog poboljšanje statusa

bioaktivnih proteina u gljivama, njihov biomedicinski potencijal i buduće perspektive u razvijanju novih farmaceutskih proizvoda iz gljiva.

1. Ukupan sadržaj selen u vodorastvornim proteinima određen je na ICP-OES uređaju. Dobijeni rezultati ukazuju na ukupan sadržaj selen u proteinima od 54.68-134.6µg/g računato na suhu masu. Udeo selen u proteinima u odnosu na celu gljivu bio je u proseku 44.45-70.34%, što je u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora.

2. Jedan od zadatah ciljeva rada je i određivanje proteinskog sastav gljiva kroz aminokiselinski sastav. Naročita pažnja je usmerena na sadržaj aminokiselina metionina i selenometionina kod plodnosnog tela sa velikom koncentracijom selen. Urađena je kvantifikacija 15 esencijalnih aminokiselina i dodatno selenometionina za sve ispitivane vrste roda *Pleurotus*. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela gljiva određen je na HPLC uređaju. Za detekciju selenometionina i metionina primenjen je postupak bazne hidrolize sa 5M NaOH na 110°C u trajanju od 16h. Nakon neutralizacije, urađena je OPA derivatizacija uzoraka. Utvrđeno je da se aminokiselinski sastav različitih vrsta gljiva nije međusobno razlikovao. Takođe, utvrđeno je da nije postojala statistički značajna razlika između gljive sa i bez povećanog sadržaja selen za sva ispitivana jedinjenja selen u gljivama, kada je reč o esencijalnim aminokiselinama. To znači da zapravo prisutan selen ne menja aminokiselinski profil gljiva, osim kada je reč o aminokiselinama sa sumporom.

Aminokiselinska analiza *Pleurotus* vrsta ukazuje na dominantne glutaminsku kiselinu (13.13-28.46 mg/g suve mase) i asparaginsku kiselinu 6.81-12.55 mg/g suve mase. Razlog može biti taj što su ove aminokiseline prekursori iz kojih se formiraju bočni lanci aminokiselina i to su skladišne forme azota. U svim gljivama sa povećanim sadržajem selen, metionina je bilo više u odnosu na selenometionin. Odnos ove dve aminokiseline kod *P. ostreatus* P80 je oko 10:1, *P. cornucopiae* 7:1, *P. salmoneostramineus* 9.5:1, a za *P. ostreatus* P70 0.8:1-2:1 zavisno od vrste dodatog jedinjenja. To znači da supstrat na kojem se gljiva gaji i parametri gajenja znatno utiču na odnos ove dve dobijene kiseline s obzirom na to da je jedino gljiva *P. ostreatus* P70 gajena u drugačijim uslovima u odnosu na ostale. Kod analize aminokiselinskog sastava, dokazano je da je selenski kvasac bio najbolji izvor selen

u odnosu na druga dva jedinjenja. Ovim se potvrđuje da neprečišćeni ekstrakti proteina zbog dodatnih nečistoća ne daju dovoljno precizne rezultate za tvrdnju o raspodeli selen u plodonosnom telu gljive.

3. Molekulske mase vodorastvornih proteina gljiva analizirane su korišćenjem natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE) metodom po Laemmli-ju. Ovaj tip elektroforeze vršen je na 4% koncentrišućem i 10% razdvajajućem poliakrilamidnom gelu. Dobijene frakcije su razvrstane prema molekulskoj masi. Uzorci gljive su imali širok opseg proteinskih frakcija, od oko 9.5-110 kDa. Raspored frakcija na SDS-PAGE gelu pokazuje postojanje značajne intraspecijske razlike. Proteinske frakcije od oko 15 kDa i između 30 i 40 kDa bile su dominantne za sve proučavane sojeve. Između sojeva i vrsta proučavanih gljiva bilo je primetne razlike u prisutnim proteinskim frakcijama, međutim prisutan selen u različitim oblicima nije uticao na promenu molekulskih masa. U soju *P. ostreatus* P70, dominantne su bile frakcije od oko 46 kDa, 36 kDa i 18 kDa. U soju *P. salmoneostramineus*, od oko 36 kDa i 17 kDa, a u soju *P. ostreatus* P80 od oko 40 kDa, 33k Da i 18 kDa. U soju *P. cornucopiae*, dominantne su bile frakcije od oko 48 kDa, 40 kDa i 18 kDa.

Optimizacija procesa proizvodnje gljiva

U cilju definisanja načina za što efikasnije obogaćivanje gljiva selenom iz selenskog kvasca, u suvi supstrat za gajenje bukovače dodat je selenski kvasac u koncentracijama 25, 50, 75 i 100 mg/kg suve mase supstrata. Gljiva je rasla u laboratorijskim uslovima pod kontrolisanim parametrima. Sposobnost apsorpcije selen se smanjivala proporcionalno sa povećanjem količine selen dodatog u sustrat. Toksični efekat na rast gljiva pojavio se dodavanjem kvasca sa 75 mg/kg Se i više. Plodonosna tela dobijena u drugom talasu imala su oko 50% manje Se od onih u prvom talasu. Mogućnost usvajanja selen iz selenskog kvasca potvrđena je i na gljivi *Agaricus bisporus* kada je aplikacija selenskog kvasca izvršena u tri stadijuma proizvodnje: nakon zasejavanja, nakon pokrivanja, nakon grabuljanja. Gljiva *Agaricus bisporus* najviše selen je usvojila u plodonosno telo dodatkom selenskog

kvasca u kompost odmah nakon inokulisanja micelijumom. Velika razlika u količini usvojenog selen, zavisno od trenutka aplikacije, objašnjava se činjenicom da se selen zadržao u pokrivci jer u kasnijim fazama gljiva ima slabiju sposobnost apsorpcije selen.

Najefikasnije koncentracije selenskog kvasca koje su inhibirale rast plesni jesu koncentracije 70-200 µg/g selen. Preparat je pokazao fungistatičko delovanje na mikopatogene gljive. Dodavanjem koncentracije od 100 mgSe/kg supstrata, selen će usporiti fruktifikaciju gljiva za par dana, ali će plodonosna tela usvojiti visoke koncentracije selen, oko 100 µg/g za *Pleurotus spp.* računato na suhu masu gljive. Na ovaj način postignut je dvostruki efekat gajenja gljiva sa dodatkom selenskog kvasca u proizvodni supstrat-smanjenje kontaminacije u pogonima i dobijanje plodonosnog tela gljive sa visokim sadržajem selen, dovoljnim za zadovoljenje dnevnih potreba čoveka.

Rezultati celokupnog istraživanja ukazuju na to da jestive gljive imaju nizak sadržaj selen u plodonosnom telu, čime se potvrđuje problem deficita u ishrani usled osiromašenosti zemljišta. Dobijeni rezultati ukazuju na to da gljive mogu da akumuliraju selen iz neorganskih i organskih jedinjenja selen. Prema rezultatima eksperimenata, najvećim delom se selen inkorporira u polisaharidnim i proteinskim frakcijama rastvornim u vodi. Jednim delom selen se nalazi i u obliku selenometionina kako je i pretpostavljeno. U daljem istraživanju je potrebno dobiti preciznije rezultate koji se odnose na transformaciju selen iz organskog jedinjenja selen, kao najpogodnijeg izvora selen za dobijanje obogaćenih gljiva.

7. LITERATURA

1. Agahar-Murugkar, D. & Subbulakshmi, G. (2005): Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89, 599–603.
 2. Akil, M., Gurbuz, U., Bicer, M., Sivrikaya, A., Mogulkoc R. & Batalaci A. K. (2011): Effect of selenium supplementation on lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and lactate levels in rats immediately after acute swimming exercise. *Biological Trace Elements Research*, 142(3), 651-659.
 3. Akindahunsi, A.A. & Oyetayo, L.F. (2006): Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. *LWT*, 39, 548–553.
 4. Alaejos, S.M., Diaz Romero, F.J. & Diaz Romero, C. (2000): Selenium and Cancer: Some Nutritional Aspects. *Nutrition*, 16(5), 376-83.
 5. Alarcon, J. & Aguila, S. (2006): Lovastatin production by *Pleurotus ostreatus*: effects of the C:N ratio. *Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences*, 61, (1-2), 95-8
- AOAC (1995): Official methods of analysis (16th edition). Arlinton VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
6. Arthur, R.J., Nicol, F. & Beckeit, J.G. (1993): Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57, 2365-2395.
 7. Attia, H. F., Soliman, M. M. & Ismail, T. A. (2012): Protective Effect of Vitamin E and Selenium on the Liver, Heart and Aorta, *Journal of Veterinary Anatomy*, 5 (1), 17-29.
- Ausubel, F.M., Brett, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, L. (1991): *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1. Wiley. New York. Chapter 10.
8. Backovic, D., Stamenic, V., Marmut, Z. & Jorga, J. (1998): Blood selenium in healthy persons and individuals with malignant diseases. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*, 126, 18-22.

9. Bano, Z., & Rajarathnam, S. (1988): *Pleurotus mushrooms*. Part II, nutritional value, post-harvest physiology, preservation and role as human food. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 27(2), 87–158.
10. Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L.M. & Ferreira, I.C. (2008): Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2742–2747.
11. Beck, A.M. (1999): Selenium and host defence towards viruses. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 707–711.
12. Behne, D., Alber, D., & Kyriakopoulos, A. (2010): Long-term selenium supplementation of humans: Selenium status and relationships between selenium concentrations in skeletal muscle and indicator materials. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24, 99–105.
13. Benjamin, D. R. (1995): *Mushroom, Poisons and Panaceas*. W. H. Freeman & Company, New York. 1- 422.
14. Bhatia, P., Aureli,F., D'Amato, M., Prakash, R., Cameotra, S.S., Nagaraja, T.P. & Cubadda, F. (2013): Selenium Bioaccessibility and Speciation in Biofortified *Pleurotus* Mushrooms Grown on Selenium-Rich Agricultural Residues, *Food Chemistry*, 140, 1-2, 225-230.
15. Birringer, M., Pilawa, S. & Flohe, L. (2002): Trends in selenium biochemistry. Review Article. *Natural Product Reports.*, 19, 693-718.
16. Bleys, J., Navas-Acien, A. & Guallar, E. (2008): Serum selenium levels and all-cause, cancer, and cardiovascular mortality among US adults. *Arch Intern Med*, 168, 404-410.
17. Block, S. S., Tsao, G., & Han, L. H. (1958): Production of mushrooms from sawdust. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 923-927.
18. Bobek, P., Ozdin, L. & Kuniak, L. (1997): Effect of Oyster mushroom and isolated beta-glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8, 469–471.

19. Bohn, J. A., & Be Miller, J. N. (1995): (1→3)-b-D-Glucan as biological response modifiers: A review of structure–functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28, 3–14.
20. Borovička J. & Randa Z. (2007): Distribution of iron, cobalt, zinc and selenium in macrofungi, *Mycological Progress*, 6, 249-259.
21. Braaksma, A. & Schaap, J. D. (1996): Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*, 7, 119-127.
22. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
23. Bremer, J. & Natori, Y. (1960): Behavior of some selenium compounds in transmethylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 44, 367-370.
24. Bridge, D. P., Kokubun, T. & Simmonds, M. (2004): Protein Extraction From Fungi. *Methods in Molecular Biology*, vol. 244: Protein Purification Protocols: Second Edition, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 37-46.
25. Burk, R.F., Hill, K.E. (1994): Selenoprotein P. A selenium-rich extracellular glycoprotein. *Journal of Nutrition*, 124 (10), 1891-1897.
26. Cabral, S.M. & Calbral, J. (1995): The fungistatic and fungicidal activity of vinclozolin against *Botrytis cinerea*, *Mycological Research*, 99(9), 1041-1046.
27. Campos, A., H., Tejera, A.N. & Sanchez, J.C. (2009): Substrate role in the accumulation of heavy metals in sporocarps of wild fungi. *Biometals*, 22, 835–841.
28. CCME (2007). Canadian Soil Quality Guidelines: Selenium. Environmental and human health. Scientific supporting document. Winnipeg: Canadian Council of Ministers of the Environment, 1-104.
29. Chang, R. (1996): Functional properties of mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54, 91-93.
30. Chang S. T. (1991): Cultivated mushrooms, in: *Handbook of Applied Mycology*, Vol.3, Marcel Dekker, New York, 221-240.
31. Chang S. T. (1999): World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Letinula edodes* (Berk.) Sing. In China *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 291-300.

32. Chang S. T. (2006): The world mushroom industry: Trends and technological development. *Int. J. Med. Mush.*, 8, 297-314.
33. Chang, S. T. & Hayes, W. A. (1978): *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*. Academic Press, New York.,117.
34. Chasteen, T.G. & Bentley, R. (2003): Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chemical Reviews*, 103(1), 1-25.
35. Chen, H. & Tappel, A. L. (1993): Protection of heme proteins by vitamin E, selenium, and beta-carotene against oxidative damage in rat heart, kidney, lung and spleen. *Free Radical Research Communication*, 19 (3), 183-190.
36. Chen, T., Zheng, W., Wong, Y.S., Yang, F. & Bai, Y. (2006): Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. *Bioresource Technology*, 97, 2260–2265.
37. Clark, L.C. (1985): The epidemiology of selenium and cancer. *Federation proceedings*, 44(9), 2584-2589.
38. Cornish-Bowden, A. (1980): Critical values for testing the significance of amino acid composition indexes. *Analytical Biochemistry*, 105 (1), 233–238.
39. Crystal, R.G., (1973): Elemental selenium: structure and properties, in: Klayman, D.L. and Gunther, W.H.H. (eds), *Organic Selenium Compounds: their Chemistry and Biology*, Wiley, New York, pp. 107–167.
40. Chu, Y., Liu, Q., Hou, C. & Yu, S. (1984): Blood selenium concentration in residents of areas in China having a high incidence of lung cancer. *Biological Trace Element Research*, 6, 133.
41. Čuvarđić, M. (2003): Selenium in soil. *Zbornik matice srpske za prirodne nauke*, 104, 23-37.
42. Dabbour, R. I. & Takruri, R. H. (2002): Protein quality of four types of edible mushrooms found in Jordan. *Plant Foods for Human Nutrition*. 57 (1), 1-11.
43. Da Silva, M.C.S., Naozuka, J., Da Luz, J.M., De Assunção, L.S., Oliveira, P.V., Vanetti, M.C.D., Bazzolli, D.M.S. & Kasuya, M.C.M (2012): Enrichment of *Pleurotus ostreatus* mushrooms with selenium in coffee husks. *Food Chemistry*, 131, 558–563.

44. Davis, C.D. (2012): Selenium supplementation and cancer prevention. *Current Nutrition Reports*, 1, 16-23.
45. Dernovics, M. (2003): Development of sample preparation methods and production of reference materials for speciation analyses, Theses of the doctoral dissertation, Szent István University, Department of Applied Chemistry Budapest, 3-9.
46. Dernovics, M., Stefanka, Z. & Fodor, P. (2002): Improving selenium extraction by sequential enzymatic processes for Se-speciation of selenium-enriched *Agaricus bisporus*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372, 473–480.
47. Derumeaux, H., Valeix, P., Castetbon, K., Bensimon, M., Boutron-Ruault, M.C., Arnaud, J. & Hercberg, S. (2003): Association of selenium with thyroid volume and echostructure in 35- to 60-year-old French adults. *European Journal of Endocrinology*, 148(3), 309-15.
48. Diaz, P.J., Navarro, M., Lopez, H. & Lopez, C.M.(1996): Selenium (IV) and (VI) levels in potable, irrigation and waste waters from an industrial zone in southeastern Spain. *The Science of the Total Environment*, 186, 231-236.
49. Diez, V.A. & Alvarez, A. (2001): Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chemistry*, 75, 417–422.
50. Dorresteyn, C.R., Berwald, G.L., Zomer, G., De Gooijer, D.C., Wieren, G. & Beuvery, C.E. (1996): Determination of amino acids using *o*-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography A*, 724, 159-167.
51. Du, M., Zhao, L., Li, C., Zhao, G. & Hu, X. (2007): Purification and characterization of a novel fungi Se-containing protein from Se-enriched *Ganoderma Lucidum* mushroom and its Se-dependent radical scavenging activity. *European Food Research and Technology*. 224(5), 659-665.
52. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamitton, J. K., Reders, P. A., & Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
53. Duckova, K., Bukovsky, M. & Kucera, J. (1997): Study of topical dispersions with an immunomodulatory activity. *STP Pharma Sciences*, 7, 223–228.

54. Dumont, E., Vanhaecke, F. & Cornelis, R. (2006): Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1304–1323.
55. EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the product Sel- Plex®2000 as a feed additive according to Regulation (EC) No 1831/2003. *The EFSA Journal*, 348, 1-40.
56. EFSA (European Food Safety Authority). 2008. Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population. *The EFSA Journal*, 766, 1-42.
57. EFSA (European Food Safety Authority). 2009. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements. *The EFSA Journal*, 1082, 1-39.
58. EFSA (European Food Safety Authority). 2010. Long-term dietary exposure to selenium in young children living in different European countries (EXPOCHI), 00786, 1-38.
59. El-Fakharany, E.M., Haroun, B.M., Ng, T.B. & Redwan, E.R.M. (2010). Oyster mushroom laccase inhibits hepatitis C virus entry into peripheral blood cells and hepatoma cells. *Protein & Peptide Letter*, 17(8), 1031–9.
60. Elteren, J.T., Woroniecka, U.D. & Kroon, K.J. (1998): Accumulation and distribution of selenium and cesium in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*—a radiotracer-aided study. *Chemosphere*, 1787–1798.
61. ENV/JM/MONO(2013)23- Environment directorate joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals, pesticides and biotechnology streamlined summary document supporting oecd guideline 437 on the bovine corneal opacity and permeability for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment No. 189
62. Erjavec, J., Kos, J., Ravnikar, M., Dreo, T. & Sabotic, J. (2012): Proteins of higher fungi – from forest to application. Review. *Trends in Biotechnology*., 30 (5), 259-273.

63. Esaki, N., Tanaka, H., Uemura, S., Suzuki, T. & Soda, K.(1979): Catalytic action of L-methionine gamma-lyase on selenomethionine and selenols. *Biochemistry*, 18(3), 407-10.
64. Estrada, A.E.R., L, H.J., Beelman, B.R., Jimenez-Gasco, M. & Royse, J.D. (2009): Enhancement of the antioxidants ergothioneine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* basidiomata through cultural practices. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1597–1607.
65. Falandysz J. (2008). Selenium in edible mushrooms, *Journal of environmental science and health, part C*, 26, 256–299.
66. Falandysz., J., Kunito, T., Kubota, R., Bielawski, L., Frankowska, A. & Tanabe, S. (2008): Multivariate characterization of elements accumulated in King Bolete *Boletus edulis* mushroom at lowland and high mountain regions. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 43, 1692–1699.
67. Fan-Yun, M., Xiao-Nan, L., Le, J., Zhen, S., Peng, D. & Keming. F. (2010): Culture optimization and amino acid composition of Cr-enriched mycelia by *Pleurotus cornucopiae* SD-01. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (1), 107-113.
68. Fischer, C.W. & Whanger, D.P. (1977): Fatty Acid and Glucose Metabolism in Selenium Deficient Rats and Lambs. *Journal of Nutrition*, 107 (8), 1493-14501.
69. Fischer, G., Braun, S., Thissen, R. & Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 63-77.
70. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (2000): Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. National Academy Press, Washington, D.C., 1-20.
71. Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Beliveau, R. (1999): Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis., *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77, 465-480.
72. Fountoulakis, M. & Lahm, H.W. (1998): Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Review. *Journal of Chromatography A*, 826, 109–134.

73. Gao, J., Liu, Y., Huang, Y., Lin, Z., Banuelos, S.G., Hon-Wah Lam, M. & Yin, X. (2011): Daily selenium intake in a moderate selenium deficiency area of Suzhou, China. *Food Chemistry*, 126, 1088–1093.
74. Ganther, E.H. (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis*, vol. 20, 9, 1657-1666.
75. Ge, K.Y., Xue, A. & Bai, J. (1983): Keshan disease – an endemic cardiomyopathy in China. *Virchows Archives*, 401, 1–14.
76. Gergely, V., Kubachka, M.K., Mounicou, S., Fodor, P. & Caruso, A.J. (2006): Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1101, 94–102.
77. Govasmark, E., Brandt-Kjelsen, A., Szpunar, J., Bierla, K., Vegarud, G. & Salbu, B. (2010): Bioaccessibility of Se from Se-enriched wheat and chicken meat. *Pure and Applied Chemistry*, 82 (2), 461–471.
78. Gregori, A., Švagelj, M. & Pohleven, J. (2007): Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 45 (3), 238–249.
79. Greenlee, H. (2012): Natural products for cancer prevention. *Seminars in Oncology Nursing*, 28, 1, 29-44.
80. Griensven, V. (2000): Science and Cultivation of Edible Fungi, A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, 41-49, 771-774.
81. Grooper, S.S., Smith, J.L. & Groff, J.L. (2009): Advanced nutrition and human metabolism, Wadsworth Cengage Learning, Belmont. 5th Edition, 1-624.
82. Gunde-Cimerman, N.G. & Cimerman, A. (1995): Pleurotus fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase-Lovastatin. *Experimental Mycology*, 19, 1-6.
83. Hathcock, N.J. (2004): Vitamin and Mineral Safety. Council for Responsible Nutrition, 2nd Edition. Ebook.

84. Hatfield, D.L. (2003): Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health, 2nd edition, Kluwer Academic Publishers, 1-585.
85. Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Nagy, A., Nagy, E., Vágvölgyi, C. & Kredics, L. (2007): Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology*, 97,532-537.
86. Hawkes, W.C. & Alkan, Z. (2010): Regulation of redox signaling by selenoproteins. *Biological Trace Element Research*, 134(3), 235-251.
87. He, J.Z., Ru, Q.M., Dong, D.D. & Sun, P.L. (2012): Chemical Characteristics and Antioxidant Properties of Crude Water Soluble Polysaccharides from Four Common Edible Mushrooms. *Molecules*, 17, 4373-4387.
88. Hilber, O. (1993): The taxa of the genus *Pleurotus* - a key for determination. *Mitteilungen Versuchsanstalt Pilzanbau Landw. Kammer Rheinland*, 16, 57-63.
89. Himeno, S., Chittum, H.S. & Burk, R.F. (1996): Isoforms of selenoprotein P in rat plasma. Evidence for a full-length form and another form that terminates at the second UGA in the open reading frame. *Journal of Biological Chemistry*, 271(26), 15769-15775.
90. Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E.K., Nuhu Alam, Hussain, S., Hasan, M., Choudhury, S.K. & Mahmud, I. (2003): Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolameic rats. *Clinical and Experimental PharmacologyandPhysiology*,30,470-475.
91. Houshdar Tehrani, M.H., Fakhrehoseini, E., Kamali Nejad, M., Mehregan, H. & Hakemi-Vala, M. (2012): Search for Proteins in the Liquid Extract of Edible Mushroom, *Agaricus bisporus*, and Studying their Antibacterial Effects. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1): 145-150.
92. <http://www.realmagick.com/basidiomycota-life-cycle/> (4.4.2014)
93. <http://en.wikipedia.org/wiki/Beta-glucan>(4.4.2014)
94. Huang, S. Q., Li, J. W., Wang, Z., Pan, H. X., Chen, J. X., & Ning, Z. X. (2010): Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their effect on immune function in mice. *Molecules*, 15, 3694-3708.
95. Huerta, V.D., Luisa, M., Sanchez, F. & Sanz-Medel, A. (2005): Qualitative and

quantitative speciation analysis of water soluble selenium in three edible wild mushrooms species by liquid chromatography using post-column isotope dilution ICP-MS. *Analytica Chimica Acta*, 538, 99–105.

96. Huerta, V.D., Sánchez, M.L.F. & Sanz-Medel, A. (2006): An attempt to differentiate HPLC-ICP-MS selenium speciation in natural and selenised *Agaricus* mushrooms using different species extraction procedures. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384, 902–907.

97. Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakanishi, M. & Fukuoka, F. (1969): Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29, 734-735.

98. Infante, G.H., O'Connor, G., Rayman, M., Hearn, R. & Cook, K. (2006): Simultaneous identification of selenium-containing glutathione species in selenised yeast by on-line HPLC with ICP-MS and electrospray ionisation quadrupole time of flight (QTOF)-MS/MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 1256-1263.

99. Institute of Medicine, Food & Nutrition Board. (2000): Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington. **100.** Jakoby, W.B. (1971): Crystallization as a purification technique, *Enzyme Purification and Related Techniques*, in *Methods in Enzymology*, Vol.22, Jakoby, W.B., Ed., Academic Press, 248-252.

101. James, Y.T., Liou, S-R & Vligalys, R. (2004): The genetic structure and diversity of the A and B mating-type genes from the tropical oyster mushroom, *Pleurotus djamor*. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 813–825.

102. Jayakumar, T., Ramesh, E. & Geraldine, P. (2006). Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats *Food and Chemical Toxicology*, 44, 1989-1996.

103. Kabuto, M., Imai, H., Yonezawa, C. et al. (1994): Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan. *Cancer Epidemiological Biomarkers, Preview*, 3, 465-469.

104. Kalač, P. (2001): A review of edible mushroom radioactivity. *Food Chemistry*, 75, 29-35.

- 105.** Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chem.* 113, 9–16.
- 106.** Kalač, P. (2010): Trace element contents in european species of wild growing edible mushrooms: a review for the period 2000 – 2009. *Food Chemistry*, 122 (1), 2–15.
- 107.** Kalač, P. & Svoboda, L. (2000): A review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69, 273–281.
- 108.** Khan, M.A. Rahul Amin, S.M., Nazim Uddin, M., Tania, M. & Alam, N. (2008): Comparative Study of the Nutritional Composition of Oyster Mushrooms Cultivated in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Mushroom*, 2(1), 9-14.
- 109.** Kim, G.Y., Parks, H.S., Nam, B.H., Lee, S.J. & Lee, J.D. (2003). Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A. Curtis) Teng. *Bioresource Technology* 89 (2003) 81–87.
- 110.** Kim, H.J., Kim, J.S. & Park, R.H. (2009): The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms, *Journal of Medicinal Plant Research*, 3(12), 1016–1020.
- 111.** Kim, H.Y., Zhang, Y., Lee, B.C., Kim, J.R. & Gladyshev, V.N. (2009): The selenoproteome of *Clostridium sp. ohilas*: characterization of anaerobic bacterial selenoprotein methionine sulfoxide reductase A. *Proteins*, 74(4), 1008-1017.
- 112.** Klapac, T., Mandić, L.M., Grgić, J., Primorac, Lj., Ikić, M., Lovrić, T., Grgić, Z. & Herceg, Z. (1998): *The Science of the Total Environment*, 217, 127-136.
- 113.** 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.
- 114.** Klaus, A., Kozarski, M., Nikšić, M., Jakovljević, D., Todorović, N., Stefanoska, I. & van Griensven, L.J.L.D. (2013): The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64, 599-610.

- 115.** Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J.P.F.G. & van Griensven, L.J.L.D. (2011): Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food Chemistry, 129, 1667–1675.
- 116.** Kozarski, M., Klaus, A., Nikim, 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, 26, 144-153.
- 117.** Kummer, P. (1871): Der Führer in die Pilzkunde, 1st. ed., 1-146.
- 118.** Kurtzman, H.R. (1997): Nutrition from mushrooms, understanding and reconciling available data. Mycoscience, 38, 247-253.
- 119.** Latifah, A.L., Abu Bakar, M.D. & Abu Bakar, M. (1996): Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. Food Chemistry, 56, (2), 115-121.
- 120.** Lau, C.C., Abdullah, N., Shuib, A.S. & Aminudin, N. (2012): Proteomic Analysis of Antihypertensive Proteins in Edible Mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 12341–12348.
- 121.** Lavi, I., Friesem, D., Geresh, S., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2006): An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. Cancer Letters, 244, 61–70.
- 122.** Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (5259), 680–685.
- 123.** Lee, Y. T. & Kim, Y. S. (2005): Water solubility of b-glucans in various edible mushrooms. Journal of Food Science and Nutrition, 10, 294–297.
- 124.** Levander, O.A. & Burk, R.F. (1994): Selenium. In: Ziegler EE, Filer LJ, eds. Present knowledge in nutrition, 7th ed. Washington, DC: ILSI Press, 320- 328.
- 125.** Li, L., Xie, Y., El-Sayed, M.W., Szakacs, G.J. & Roberts, C.J. (2004): Characteristics of selenazolidine prodrugs of selenocysteine: toxicity, selenium

- levels, and glutathione peroxidase induction in A/J mice Life Sciences, 75, 447–459.
- 126.** Liu, K., Chen, F., Zhao, Y., Gu, Z. & Yang, H. (2011). Selenium accumulation in protein fractions during germination of Se-enriched brown rice and molecular weights distribution of Se-containing proteins. Food Chemistry 127, 1526–1531.
- 127.** Liu, J., Sun, Y., Yu, H., Zhang, C., Yue, L., Yang, X., Wang, L. & Liu, J. (2012): Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer). Carbohydrate Polymers, 87, 348–352.
- 128.** Maihara, A.V., Moura, L.P., Catharino, G.M., Castro, P.L. & Figueira, L.C. (2008): Arsenic and cadmium content in edible mushrooms from São Paulo, Brazil determined by INAA and GF AAS. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 278 (2), 395–397.
- 129.** Maity, K., Bhunia, K.S., Behera, B., Maiti, K.T., Mallick, P., Sikdar, R.S. & Islam, S.S. (2013): Structural study of an immuno enhancing polysaccharide isolated from an edible hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Lentinula edodes*. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 1, 72–80.
- 130.** Malinowska, E., Krzyczkowski, W., Herold, F., Łapienis, G., Slusarczyk, J., Suchocki, P., Kuras, M. & Turlo, J. (2009): Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. Enzyme and Microbial Technology, 44, 334–343.
- 131.** Manzi, P. & Pizzoferrato, L. (2000): Beta-glucans in edible mushrooms. Food Chemistry, 68, 315–318.
- 132.** Manzi, P., Marconi, S., Aguzzi, A. & Pizzoferrato, L. (2004): Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. Food Chemistry, 84, 201–206.
- 133.** Mao, J. & Teng, W. (2013): The Relationship between Selenoprotein P and Glucose Metabolism in Experimental Studies. Review. Nutrients, 5, 1937–1948.
- 134.** Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, 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.
- 135.** Mayland, H.F., Panter, L.F. & Sonderegger J.L. (1989): Selenium in seleniferous environments. In: Selenium in agriculture and the environment, SSSA special publication no 23. Madison: American Society of Agronomy, 15–49.

- 136.** Mena, L.M., Gomez, M.M. & Palacios, A.M. (1999): Fast on-line selenium determination in enriched yeast slurry by microwave digestion–hydride generation–atomic absorption spectroscopy, *Laboratory Automation and Information Management*, 34, 159–165.
- 137.** Meng, F.Y., Liu, X.N., Jia, L., Song, Z., Deng, P. & Fan, K.M. (2010): Culture Optimization and Amino Acid Composition of Cr-Enriched Mycelia of *Pleurotus cornucopiae* SD-01. *Food Technology and Biotechnology*, 48 (1), 107–113.
- 138.** Meplan, C. & Hesketh, J. (2012): The influence of selenium and selenoprotein gene variants on colorectal cancer risk. *Mutagenesis*. vol. 27 no. 2 pp. 177–186.
- 139.** Miles P. G. & Chang S. T. (1997): Mushroom biology: concise basics and current developments (ebook). Worldscientific, Singapore. 1-216.
- 140.** Minato, K. I., Mizuno, M., Ashida, H., Hashimoto, T., Terai, H. & Tsuchida, H. (1999): Influence of storage conditions on immunomodulating activities in *Lentinus edodes* Berk. Sing. Agaricales s.l., Basidiomycetes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1(3), 243-250.
- 141.** Mitić, Ž., Cakić, M., Nikolić, S. G., Ilić, Lj. & Stanković, M. (2010): Spektroskopska karakterizacija bioaktivnih Cu (II) kompleksa SA polisaharidima savremenom FTIR mikrospektroskopijom. *Hemijska industrija*, 64 (1), 9–20.
- 142.** Mizuno, T., Sakai, T., & Chigara, G. (1995): Health foods and medicinal usage of mushrooms. *Food Review International*, 11, 69–81.
- 143.** Moharram, A.H., Salama F.M. & Hussien, A. A. (2008): Characterization of Oyster Mushroom Mycelia as a Food Supplement. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 632-642.
- 144.** Moore, D. (1998): Fungal morphogenesis. Cambridge University Press, 1st edition, 1-469.
- 145.** Morris, C.V. & Levander, A. (1970): Selenium Content of Foods. *Journal of Nutrition*, 200, 1383-1388.
- 146.** Mueller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W. & Williams, D.L. (2000): The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-3)-beta-D-glucan receptors in human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, 10, 339-346.

147. Münzberg, J., Rau U. & Wagner, F. (1995): Investigations on the regioselective hydrolysis of a branched β -1,3-glucan, *Carbohydrate Polymers*, 27, 271-276.
148. Muthangya, M., Hashim, O.S., Amana, M.J., Mshandete, M.A. & Kivaisi, K.A. (2013): Optimization of *Pleurotus* Mushroom Cultivation on Saline Sisal Solid Waste. *World Applied Sciences Journal*, 23 (9), 1146-1150.
149. Muthukumar, M., Rabeeth, M., Rajesh, P., Sujatha, K., Navin, S. & Madhu, K. (2009): Isolation, purification and biochemical characterization of lectin from oyster mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *Plant Archives*, 9(1), 41-46.
150. Nakamaru, Y., Tagami, K. & Uchida, S. (2005): Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils *Chemosphere*, 58, 1347–1354.
151. Navarro-Alarcon, M., Lopez-Ga de la Serrana, H., Perez-Valero, V. & Lopez-Martinez, M.C. (1998): Serum selenium levels as indicators of body status in cancer patients and their relationship with other nutritional and biochemical markers. *Science of the Total Environment*, 212, 195-202.
152. Navarro-Alarcon, M. & Lopez-Martinez, C.M. (2000): Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The Science of the Total Environment*, 249, 347-371.
153. Neidleman, L.S. & Laskin, I.A. (1995): *Advances in Applied Microbiology*, Volume 47 (Hardcover). Publisher: Lightning Source Inc , 234-340.
154. Ngai, P., Zhao Z. & Ng, B.T.(2005): Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides* , 26,191–196.
155. Niketić, V. (2007): Uputstva za vežbe iz hemije za studente hemije smera istraživanje i razvoj, Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet, Beograd. 36-39.
156. Nono, I., Ohno, N., Mazura, A., Oikawa, S. & Yadomae, T. (1991): Oxidative degradation of an antitumor 1,3-beta-D-glucan, grifolan. *Journal of Pharmacobiodyn*, 14, 9–19.
157. Ogra, Y., Ishiwata, K., Encinar, R.J., Lobinski, R. & Suzuku, T.K. (2004): Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 861-866.

- 158.** Oldfield, E.J. (2002). A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention). American Society of Animal Science, 1-4
- 159.** Ooi, V. E. C. & Lui, F. (1999): A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1, 195–206.
- 160.** Ouzouni, K.P., Petridis, D., Koller, D.W. & Riganakos, A.K. (2009): Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece, Food Chemistry, 115, 1575–1580.
- 161.** Owusu-Sekyere, A., Kontturi, J., Hajiboland, R., Rahmat, S., Aliasghar zad, N., Hartikainen, H. & Seppanen, M.M. (2013): Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Soil, 373, 541–552.
- 162.** Painter, E.P. & Franke, W.K. (1940): The decomposition of seleniferous proteins in alkaline solutions. Journal of Biological Chemistry, 134, 557-566.
- 163.** Papaspyridi, L-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E. & Christakopoulos, P. (2010): Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by *Pleurotus ostreatus* ATHUM 4438 under submerged culture. Biochemical Engineering Journal, 50, 131-138.
- 164.** Park, J.P., Kim, S.W., Hwang, H.J., Cho, Y.J. & Yun, J.W. (2002): Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. Enzyme and Microbial Technology, 31, 250–255.
- 165.** Paulík, S., Mojziso vá, J., Durove, A., Benísek, Z., Húska, M. (1996): The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice, Journal of veterinary medicine, 43, 129–135.
- 166.** Pavličević, Ž. M., Stanojević, P.S. & Vucelić-Radović, V.B. (2013): Influence of extraction method on protein profile of soybeans. Chemical Industry, Hemijska Industrija, 67(4), 687-694.

- 167.** Pavlović, Z., Miletić, I., Jokić, Ž., Stevanović, J., Šobajić, S. & Bulat, Z. (2013): The influence of selenium supplementation of animal feed on human selenium intake in Serbia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 29 (2), 345-352 .
- 168.** Petäistö, R. L., Rissanen, T. E., Harvima, R. J. & Kajander, E. O. (1994): Analysis of the protein of *Gremmeniella abietina* with special reference to protease activity. *Mycologia*, 86, 242–249.
- 169.** Petersen, R. & Hughes, W.K. (1993): Intercontinental, interbreeding collections of *Pleurotus pulmonarius*, with notes on *P. ostreatus* and other species, 45(1), 139-152.
- 170.** Piepponen, S., Pellinen, M.J. & Hattula, T. (1984): The selenium content of mushrooms. Trace element - Analytical chemistry in medicine and biology. Berlin: Walter de Gruyter & Co, 159-166.
- 171.** Rácz, L., Bumbálová, A., Harangozó, M., Tölgyessy, J. & Tomecek, O. (2000): Determination of cesium and selenium in cultivated mushrooms. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 245, 3, 611-614.
- 172.** Rajarathnam, S., Zakia Bano & Patwardhan, M. V. (1986): Nutrition of the mushroom *Pleurotus flabellatus* during its growth on paddy straw substrate. *Journal of Horticultural Science*, 61 (2), 223–232.
- 173.** Rajković, B.M., (2002): Hemija elemenata, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, 360-363.
- 174.** Rasmussen, L.B., Schomburg, L., Kohrle, J., Pedersen, I.B., Hollenbach, B. & Hog, A. (2011): Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *European Journal of Endocrinology*, 164, 585-90.
- 175.** Rayman, M.P. (2008): Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *British Journal of Nutrition*, 100(2), 254-68.
- 176.** Redhead, S. (1984): Mycological observations 13-14: on *Hypsizygus* and *Tricholoma*. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, 25, 1-9.
- 177.** Reid, S.M., Middleton, P., Cossich, M.C. & Crowther, C.A. (2010): Interventions for clinical and subclinical hypothyroidism in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*: CD007752.

- 178.** Reilly, C. (2006): Selenium in Food and Health. Springer, Second Edition, 1-219.
- 179.** Reverberi, M., Fabbri, A.A., Zjalic, S., Ricelli, A., Punelli, F. & Fanelli, C. (2005): Antioxidant enzymes stimulation in *Aspergillus parasiticus* by *Lentinula edodes* inhibits aflatoxin production. Applied Microbiology and Biotechnology, 69, 207–215.
- 180.** Rice, P.J., Adams, E.L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A.J., Goldman, M.P., Lockhart, B.E., Barker, L.A., Breuel, K.F., Deponti, W.K., Kalbfleisch, J.H., Ensley, H.E., Brown, G.D., Gordon, S. & Williams, D.L.(2005): Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 314(3), 1079-86
- 181.** Roman, M., Jitaru, P. & Barbante, C. (2014): Selenium biochemistry and its role for human health. Metallomics, 6(25), 25-5.
- 182.** Rop, O., Mlcek, J. & Jurikova, T. (2009): Beta-glucans in higher fungi and their health effects. Nutrition Reviews, 67(11), 624-31.
- 183.** Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y. & Vetvickova, J. (1999): Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer, Immunopharmacology, 42(1-3), 61-74.
- 184.** Roth, M. (1971): Fluorescence reaction for amino acids. Analytical Chemistry, 43, 880-882.
- 185.** Rout, D., Mondal, S., Chakraborty, I., Pramanik, M. & Islam, S. S. (2005). Chemical analysis of a new (1-3)-, (1-6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. Carbohydrate Research, 340, 2533–2539.
- 186.** Saritha, K. & Kummar, N. (2001): Qualitative detection of selenium in fortified soil and water samples by a paper chromatographic–carboxyl esterase enzyme inhibition technique. Journal of Chromatography A, 919, 223–228.
- 187.** Satish, N., Ramachandra, M., Rajashekharappa, K.S., Tulasidas, T.N., Murali, K. & Mallesha B.C. (2006): Drying of oyster mushroom (*Pleurotus florida*) in different dryers. Journal of Dairying, Foods and Home Sciences, 25(2), 79-86.

- 188.** Seby, F., Potin Gautier, M. & Astruc, M.L. (1997): Selenium speciation in soils after alkaline extraction. *The Science of the Total Environment*, 207, 81-90.
- 189.** Serafin Muñoz A.H., Wrobel, K., Gutierrez Corona J.F. & Wrobel, K. (2007): The protective effect of selenium inorganic forms against cadmium and silver toxicity in mycelia of *Pleurotus ostreatus*. *Mycological research*, 111, 626 – 632.
- 190.** Shang, D., Zhang, J., Wen, L., Li, Y. & Cui, Q. (2009): Preparation, Characterization, and Antiproliferative Activities of the Se-Containing Polysaccharide SeGLP-2B-1 from Se-Enriched *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7737-7742.
- 191.** Singleton, V.L., Orthofer, R. & Ramuela-Raventos, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol*, 299, 152-178.
- 192.** Singer, R. (1986). *The agaricales in modern taxonomy*. 4th ed. Koeltz Scientific Books, 1-981.
- 193.** Silva, S., Martins, S., Karmali, A. & Rosa, E. (2012). Production, purification and characterization of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* with antitumour activity. *Journal of the science of food and agriculture*, 92(9), 1826-32.
- 194.** Sokovic, M. & Griensven, L.J.L.D. van (2006): Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 211-224.
- 195.** Simonoff, M., Sergeant, C., Garnier, N. (1992): Antioxidant status (selenium, vitamins A and E) and aging. In: Emerit I, Chance B, editors. *Free radicals and aging*. Basel: Birkhauser, 368-396.
- 196.** 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.
- 197.** Spolar, M.R., Schaffer, E.M., Beelman, R.B. & Milner, J.A. (1999): Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushroom suppress 7,12-dimethylbenz[a]anthracene bioactivation in mammary tissue. *Cancer Letters*, 138, 145–150.
- 198.** Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms Paperback* . Ten Speed Press; 3 th edition, 283-327.

- 199.** Stefanka, Z., Ipoly, I., Dernovics, M. & Fodor, P.(2001): Comparison of sample preparation methods based on proteolytic enzymatic processes for Se-speciation of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) samples. *Talanta*, 55, 437–447.
- 200.** Svoboda, L., K. Zimmermannova, P. & Kalac, U. (2000): Concentrations of mercury, cadmium, lead and copper in fruiting bodies of edible mushrooms in an emission area of a copper smelter and a mercury smelter. *The Science of the Total Environment*, 246, 61 -67.
- 201.** Stajić, M.M., Brčeski, D, I., Wasser, S.R. & Nevo, E. (2006): Screening of selenium absorption ability of mycelia of selected *Pleurotus species*. *Agro food industry Hi-Tech*, 17 (3), 33-35.
- 202.** Stijve, T., Noorloos, T., Byrne, A.R., Slejkovec, Z. & Goessler, W. (1998): High selenium levels in edible *Albatrellus* mushrooms. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 94,275–279.
- 203.** Stojanović, M. & Nikšić, M. (2000): Tehnološka mikrobiologija biljnih proizvoda. Poljoprivredni fakultet, Beograd, 122-133.
- 204.** Stojanović, M. & Nikšić, M. (2003): Laboratorijska uputstva za vežbe iz tehnološke mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 41-44.
- 205.** Sunde, R.A.(2012): Selenium. In: Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 225-37.
- 206.** Suzuki, K. (2005): Metabolomics of Selenium Metabolites Based on Speciation Studies. Review. *Journal of Health Science*, 51(2), 107-114.
- 207.** Svoboda, L., Havlíková, B. & Kalač, P. (2006). Contents of cadmium, mercury and lead in edible mushrooms growing in a historical silver-mining area. *Food Chemistry*, 96,580-585.
- 208.** Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonsky', I., Spěvák, J. & Erban, V. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76,548–556.

- 209.** Šandula, J., Kogan, G., Kačuráková, M. & Machovac, E. (1999). Microbial (1 → 3)-β-D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 38, 247–253.
- 210.** Tan, J., Zhu, W., Wang, W., Li, R., Hou, S., Wang, D. & Yang, L. (2002): Selenium in soil and endemic diseases in China. *The Science of the Total Environment*, 284, 227–235.
- 211.** Tapiero, H., Townsend, M.D. & Tew, D.K. (2003): The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57, 134–144.
- 212.** Terry, E.N., Diamond, A.M. (2012): Selenium. In: Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell, 568–587.
- 213.** Tham, L.X., Matsushashi, S. & Kume, T. (1999): Growth and fruitbody formation of *Ganoderma lucidum* on media supplemented with vanadium, selenium and germanium. *Mycoscience*, 40, 87–92.
- 214.** Thomet, U., Vogel, E. & Krähenbühl, U. (1999): The uptake of cadmium and zinc by mycelia and their accumulation in mycelia and fruiting bodies of edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 209, 317–324.
- 215.** Thomson, D.C. (1998): Selenium speciation in human body fluids. *Analyst*, 827–883.
- 216.** Tian, L.M., Qiu, X.M., Pan, Z.J., Lu, Y. & Yang, X.B. (2010): Development of a new HPLC technique for analyzing monosaccharide composition and its application in the quality control of *Silybum marianum* polysaccharide. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 45, 498–504.
- 217.** Todorović, R.T., Bacchi, A., Juranić, O.N., Sladić M.D., Pelizzi, G., Božić, T.T., Filipović, R.N. & Andjelković, K.K. (2007): Synthesis and characterization of novel Cd(II), Zn(II) and Ni(II) complexes with 2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbazone. Crystal structure of bis(2-quinolinecarboxaldehyde selenosemicarbazonato)nickel(II). *Polyhedron*, 26, 3428–3436.
- 218.** Toole, G., Kačuráková, M., Smith, C.A., Waldron, W.K. & Wilson, H.R. (2004). FT-IR study of the *Chara corallina* cell wall under deformation. *Carbohydrate Research*, 339, 629–635.

- 219.** Tseng, Y.-H., Lee, Y.-L., Li, R.-C., & Mau, J.L. (2005). Non-volatile flavour components of *Ganoderma tsugae*. Food Chemistry, 90, 409–415.
- 220.** Tseng, Y.H., Yang, J.H. & Mau, J.L. (2008): Antioxidant properties of polysaccharides from *Ganoderma tsugae*. Food Chemistry, 107, 732–738.
- 221.** Tu, B.P., Mohler, R.E., Liu, J.C., Dombek, K.M., Young, E.T., Synovec, R.E. & McKnight, S.L. (2007): Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell; Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104, 16886-16891.
- 222.** Turło, J., Gutkowska, B. & Herold, F. (2010): Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. Food and Chemical Toxicology, 48, 1085–1091.
- 223.** Turlo, J., Gutkowska, B., Klimaszewska, M., Kapusta, C., Schneider, K., Skora, M., Cieślak, M., Kazmierczak-Baranska, J., Górski, A., Purchla, S. & Golaś, A. (2011): Selenium-enriched polysaccharide fraction isolated from mycelial culture of *Lentinula edodes* (Berk.)- Preliminary analysis of the structure and biological activity. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 247-251.
- 224.** Tuzen M. (2003): Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. Microchemical Journal, 74(3), 289-297.
- 225.** UN APCAEM. Training Manual on Mushroom Cultivation Technology, United Nation Economic and Social Commission for Asia and the Pacific, Asian and Pacific Centre for Agricultural Engineering and Machinery (APCAEM), China International Science and Technology Convention Centre, Beijing, China
- 226.** U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. (2012): USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 25. Nutrient Data Laboratory Home Page
- 227.** Vadim, V.E. (2006): Mushrooms as a source of trace elements consumption, Ecologica 13, 48, 3-6.
- 228.** Vetter, J. (2004): Arsenic content of some edible mushroom species. European Food Research and Technology, 219, 71-74.

- 229.** Vetter, J. & Rimoczi, I. (1993): Crude, digestible and indigestible protein in fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung 197, 427–428.
- 230.** Vrvic, M.M. & Matić, F.V. (2006): Biotechnological production of organically bonded essential oligo and trace elements (EOTEs): from conventional toward modern biotechnology?. Mikrobiologija, 43, 1, 1-14.
- 231.** Vrvic, M., Vučetić, J., Matić, V., Veljković, V. & Lazić, M. (1988): Biotehnološki postupak za dobijanje stabilnog prehrambenog proizvoda na bazi modifikovanog selenskog kvasca, PP 1930/88 od 17.10.1988, Savezni zavod za patente, Beograd
- 232.** Waites, J.M., Morgan, L.N., Rockey, S.J. & Highton, G. (2001): Industrial Microbiology: An Introduction. Wiley-Blackwell, Chapter 14, 226-228.
- 233.** Wang, W.H., Gao, Q.J. & Ng, B.T. (2000). A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *P. ostreatus*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 275, 810–816.
- 234.** 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.
- 235.** Wasser, S. P. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Application of Microbiological Biotechnology, 60, 258–274.
- 236.** Wojdylo, A., Oszmianski, J. & Czemerys, R. (2007): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105, 940–949..
- 237.** Wong, J. Y. & Chye, F. Y. (2009): Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. Journal of Food Composition and Analysis, 22, 269-277.
- 238.** Wong, S. M., Wong, K. K., Chiu, L. C. M., & Cheung, P. C. K. (2007): Nonstarch polysaccharides from different developmental stages of *Pleurotus tuber-regium* inhibited the growth of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by cell-cycle arrest and/or apoptotic induction. Carbohydrate Polymers, 68, 206–217.
- 239.** Wrobel, K., Kannamkumarath, S.S., Wrobel, K. & Caruso, A.J. (2003). Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC-ICP-MS

determination of seleno-methionine in yeast and nuts. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 133–138.

240. Wu, G.H., Hu, T., Huang, Z.L. & Jiang, J.G. (2013): Characterization of water and alkali-soluble polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* sclerotia. *Carbohydrate Polymers*, 96, 284–290.

241. Yan, L., Frenkel, G.D. (1992): Inhibition of cell attachment by selenite. *Cancer Research*, 52, 5803–5807.

242. Yang, J.H., Lin, H.C. & Mau, J.L. (2001): Non-volatile taste components of several commercial mushrooms. *Food Chemistry*, 72, 465–471.

243. Yang, L., Sturgeon, E., McSheehy, S. & Mester, Z. (2004): Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1055, 177–184.

244. Yang, Q., Huang, B., Li, H., Zhang, C., Zhang, R., Huang, Y. & Wang, J. (2012): Gastroprotective activities of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 1224–1228. **245.** Yeh, J.Y., Beilstein, M.A., Andrews, J.S. & Whanger, P.D. (1995): Tissue distribution and influence of Se status on levels of Se-W. *Faseb journal*, 9, 392–396.

246. Ying, J. (1987): Icons of medicinal fungi. Reviews. Science Press, Beijing, 1–575.

247. Yoshioka, Y., Tabeta, R., Saito, H., Uehara, N. & Fukoaka, F. (1985): Antitumor polysaccharides from *P. ostreatus* (Fr.) Quel. Isolation and structure of a β -glucan. *Carbohydrate Research*, 140, 93–100.

248. Yu, J., Cui, P.J., Zeng, W.L., Xie, X.L., Liang, W.J., Lin, G.B. (2009): Protective effect of selenium polysaccharides from the mycelia of *Coprinus comatus* on alloxan-induced oxidative stress in mice. *Food Chemistry*, 117, 42–47.

249. Xia, F., Fan, J., Zhu, M. & Tong, H. (2011): Antioxidant effects of a water-soluble proteoglycan isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 402–407.

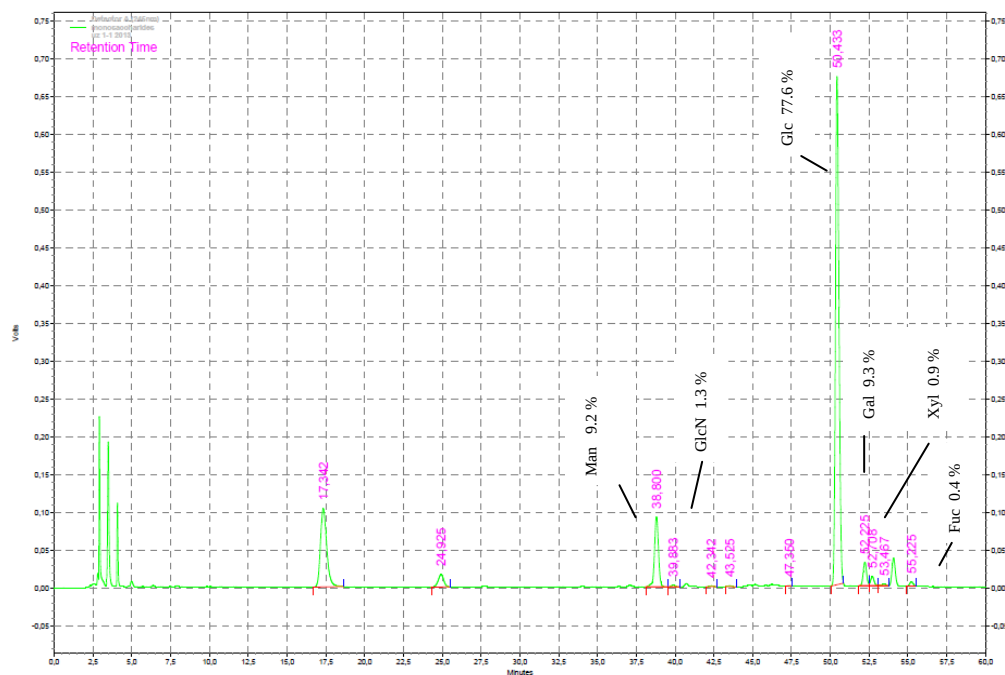
250. Xu, X., Yan, H., Chen, J. & Zhang, X. (2011): Bioactive proteins from

- mushrooms. Research review paper. *Biotechnology Advances*, 29, 667–674.
251. Xun, P., Liu, K., Morris, J.S., Daviglus, M.L. & He, K. (2010): Longitudinal association between toenail selenium levels and measures of subclinical atherosclerosis: the CARDIA trace element study. *Atherosclerosis*, 210, 662–667.
252. Zadrazil, F. (1980). Conversion of different plant wastes into feed by basidiomycetes. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 9, 243–248.
- Zeng, H. Cao, J.J. & Combs, F.G. (2013): Selenium in Bone Health: Roles in Antioxidant Protection and Cell Proliferation. Review. *Nutrients*, 5, 97–110;
253. Zeng, H. & Combs, G.F. (2008): Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. Review. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 1–7.
254. Zhang, B. B., & Cheung, P. C. K. (2011): Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1210–1216.
255. Zhang, M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., & Zhang, L. (2004). Evaluation of sulfated fungal β -glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. *Carbohydrate Research*, 339, 2297–2301.
256. Zhang, Y., Dai, L., Kong, X. & Chen, L. (2012): Characterization and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 259–265.
257. Zhang, X., Yang, L. & Mester, Z. (2012): Determination of amino acids in selenium-enriched yeast by gas chromatography–mass spectrometry after microwave assisted hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 744, 54–59.
258. Zhao, L., Zhao, G., Du, M., Zhao, Z., Xiao, X. & Hu X. (2008). Effect of selenium on increasing free radical scavenging activities of polysaccharide extracts from a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. *European Food Research and Technology*, 226, 499–505.

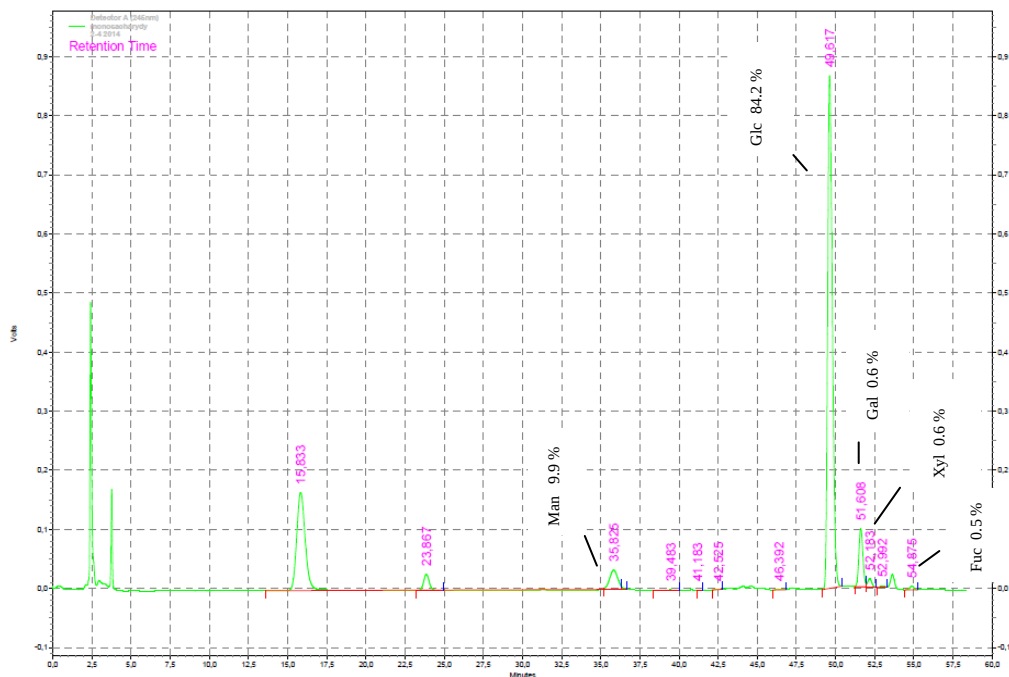
- 259.** Zhao, L., Zhao, G., Zhao, Z., Chen, P., Tong, J. & Hu, X.(2004): Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 3954–3959.
- 260.** Zhong, X. K., Jin, X., Lai, F. Y., Lin, Q. S. & Jiang, J. G. (2010): Chemical analysis and antioxidant activities in vitro of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. cultivated in China. Carbohydrate Polymers, 82, 722–727.

8.1. PRILOG A

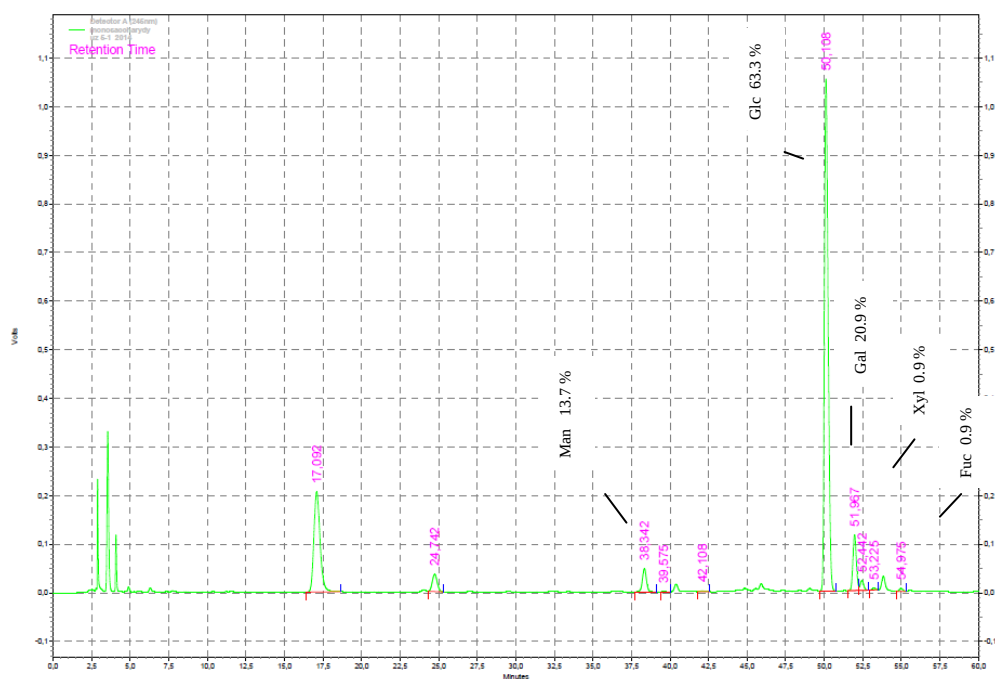
Hromatogrami monosaharidnog sastava polisaharida gljiva *Pleurotus spp.*



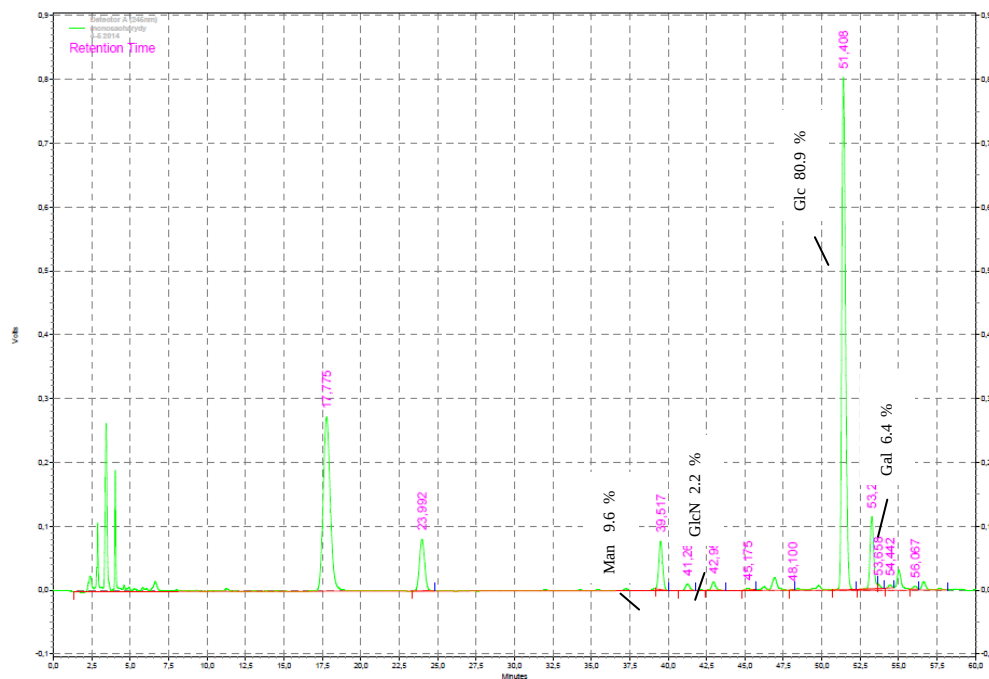
8.1.1. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PO P70 K



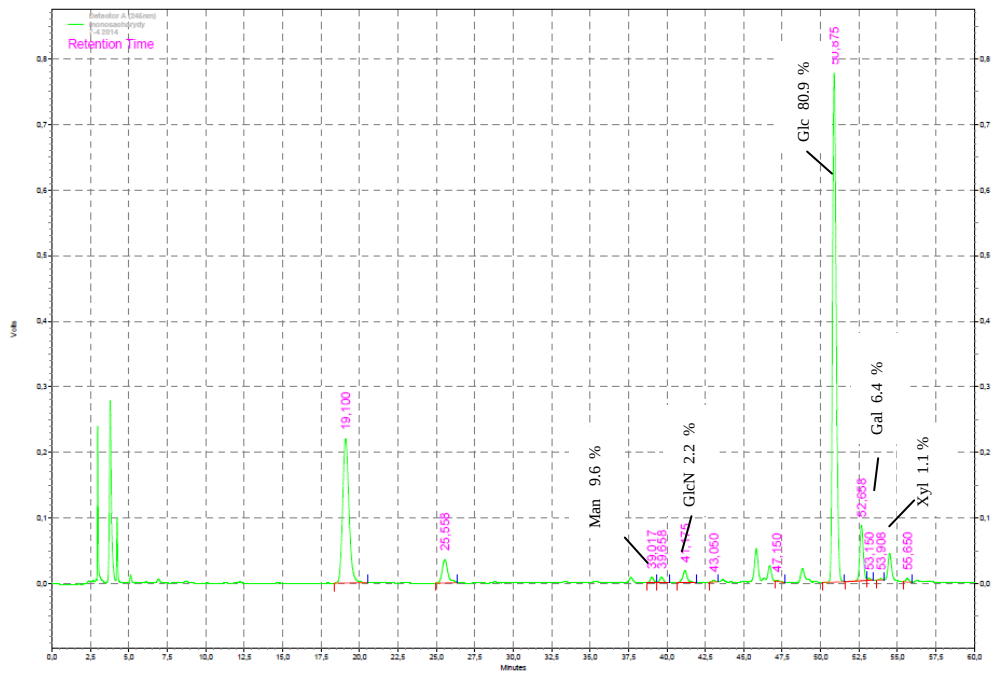
8.1.2. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PO P70 SP



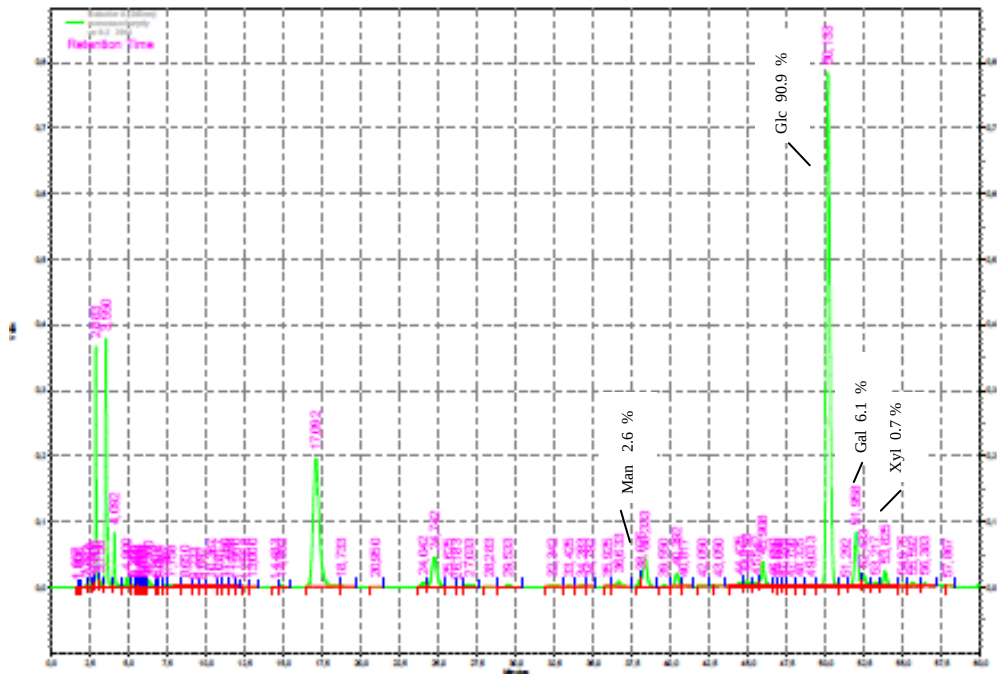
8.1.3. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PO P70 Zn(dapsesc)



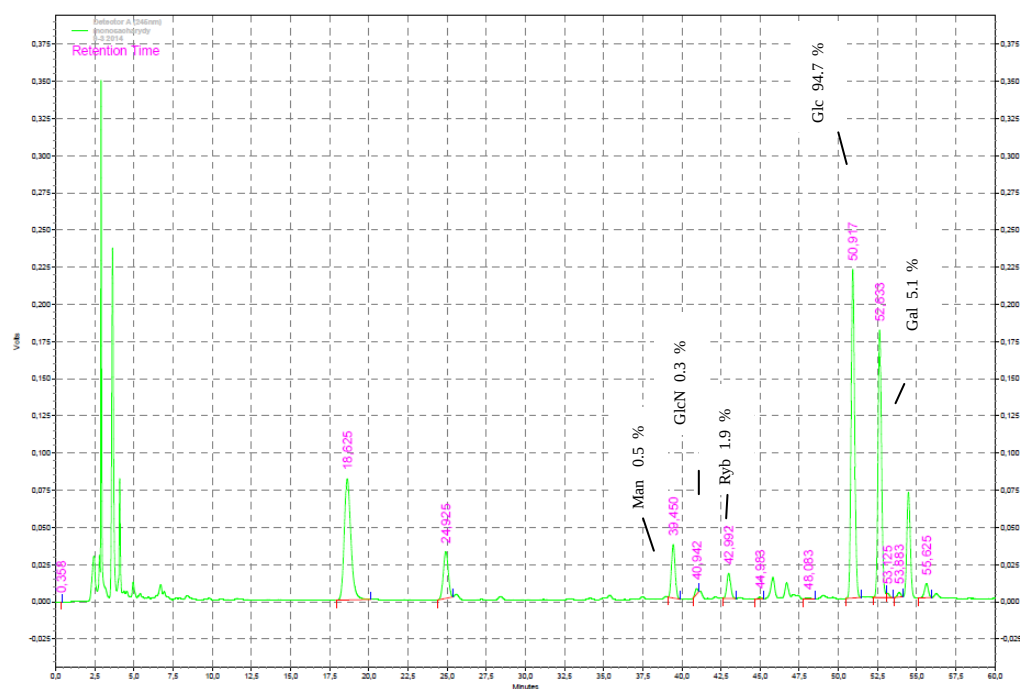
8.1.4. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PO P70 SeO₃²⁻



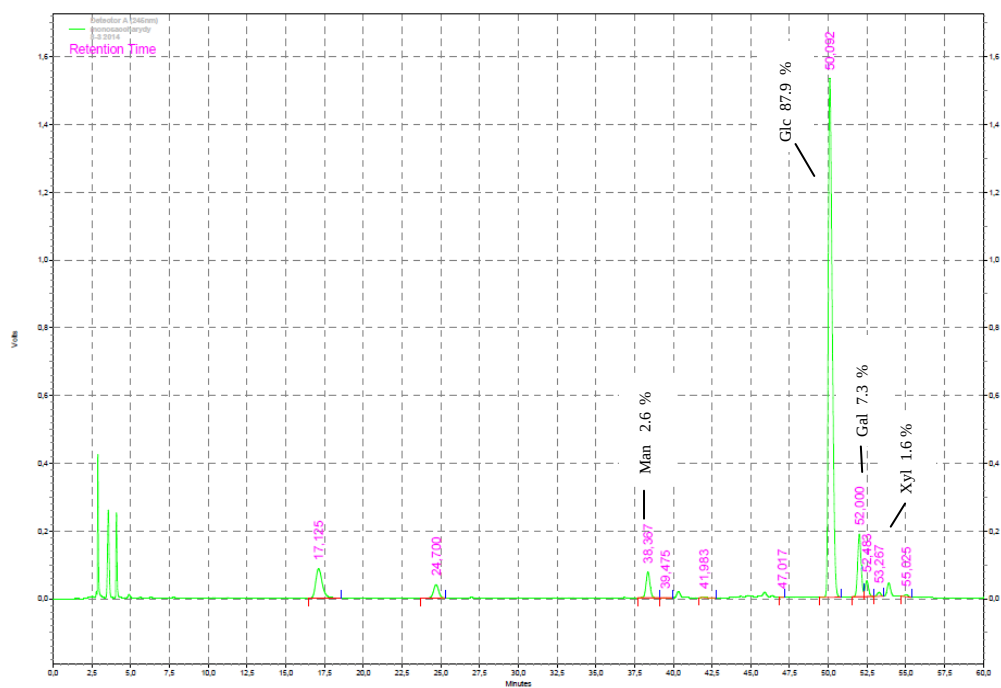
8.1.5. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 K



8.1.6. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 SP



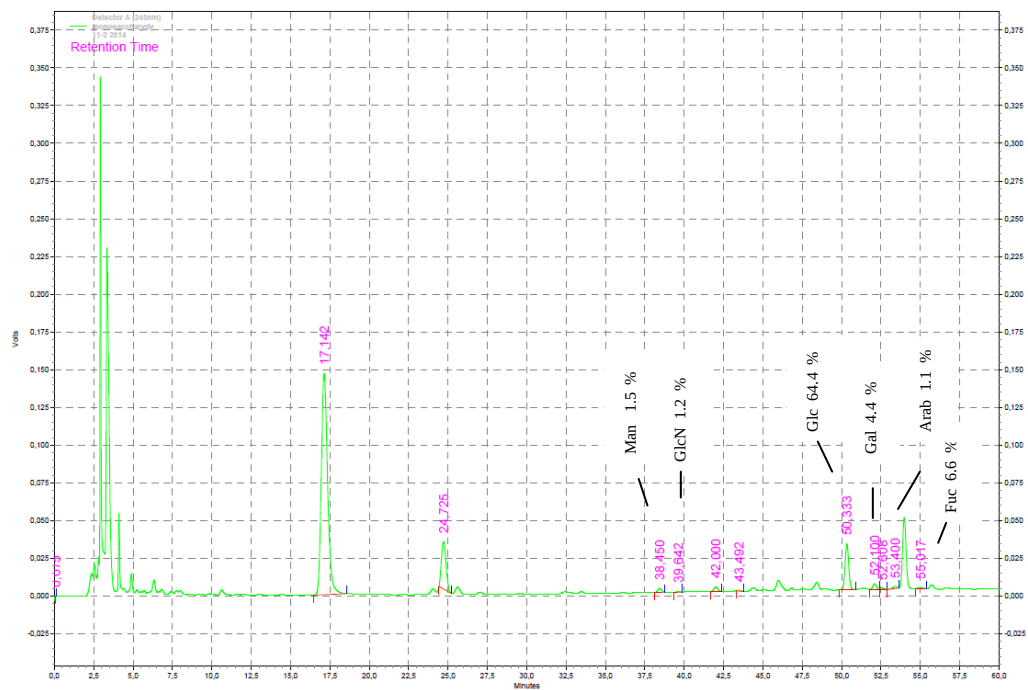
8.1.7. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 Zn(dapsesc)



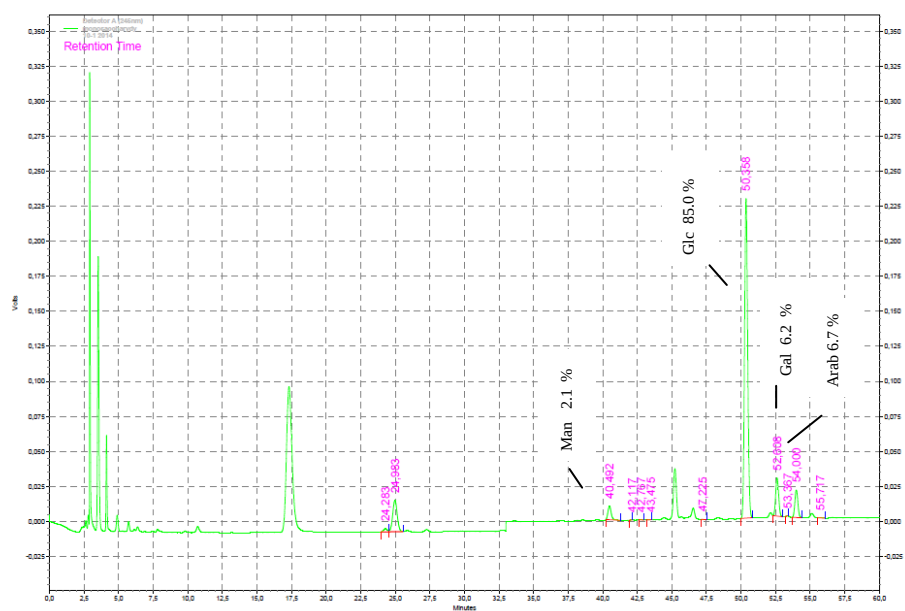
8.1.8. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 SeO_3^{2-}



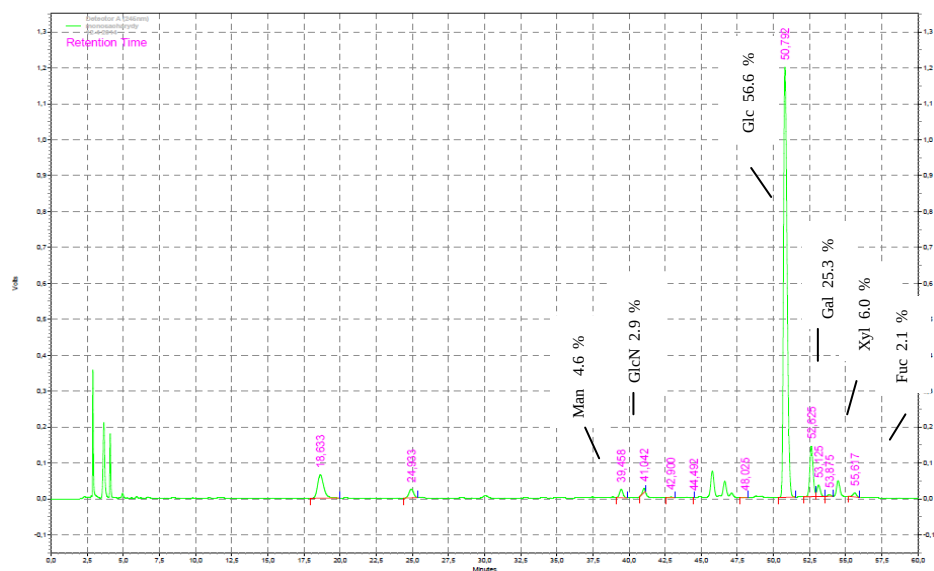
8.1.9. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PS K



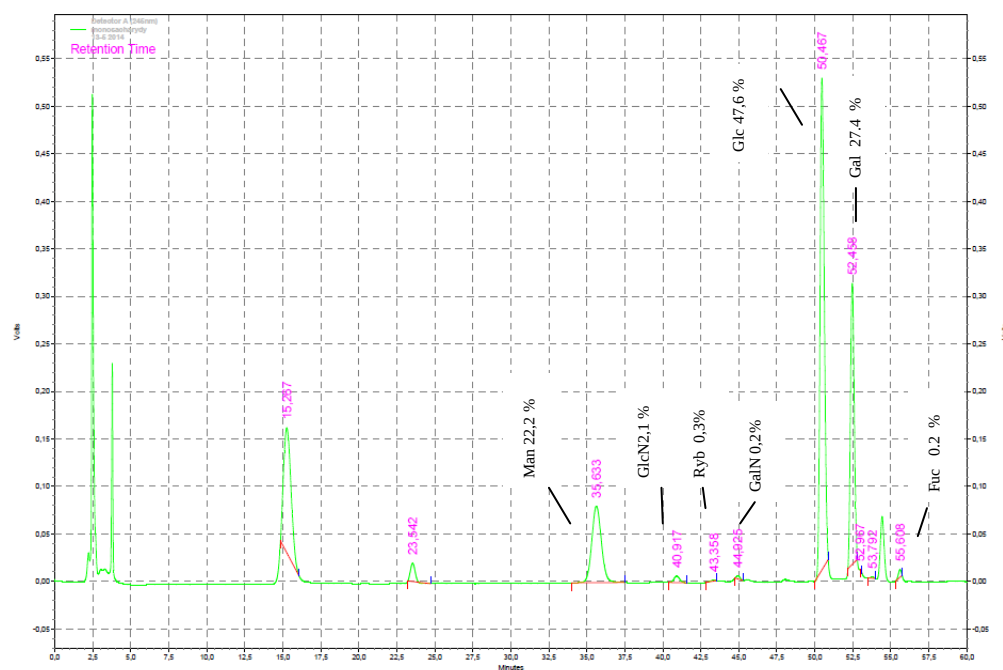
8.1.10. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PS SP



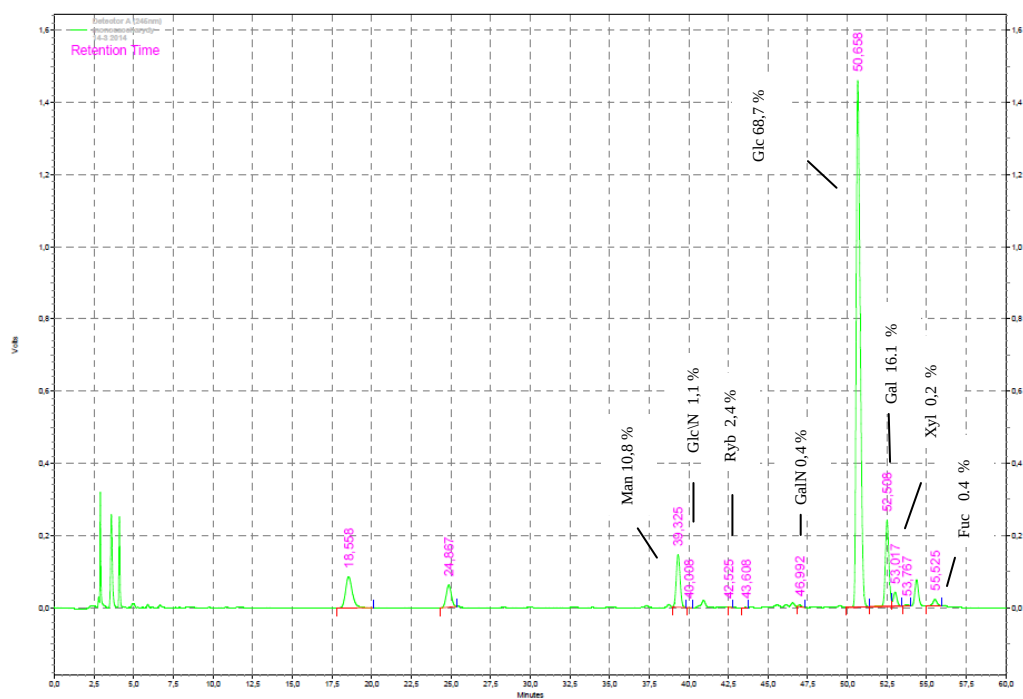
8.1.11. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PS K



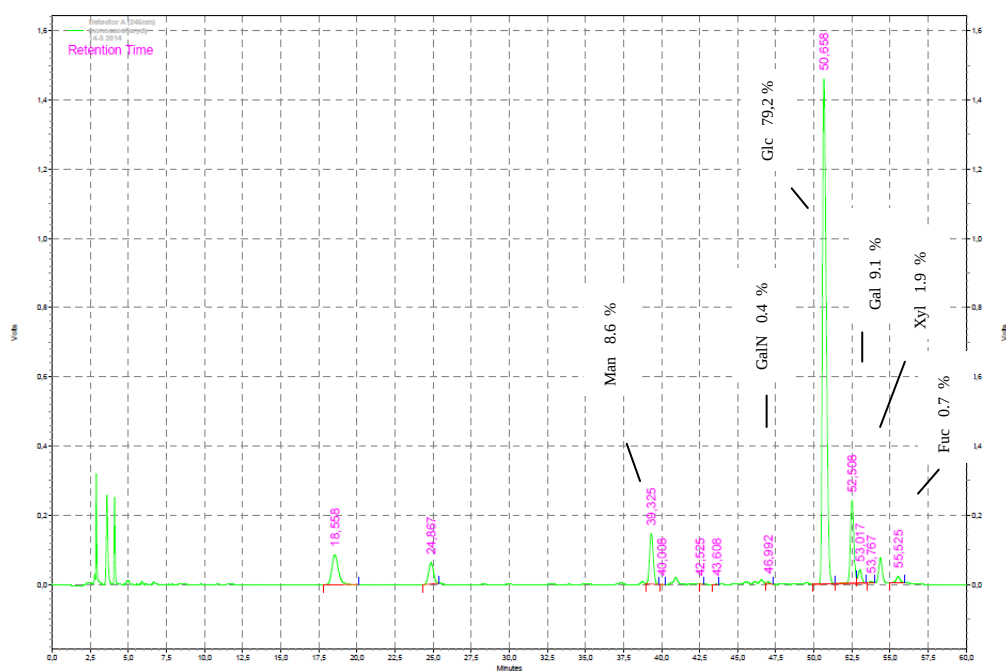
8.1.12. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PS SP



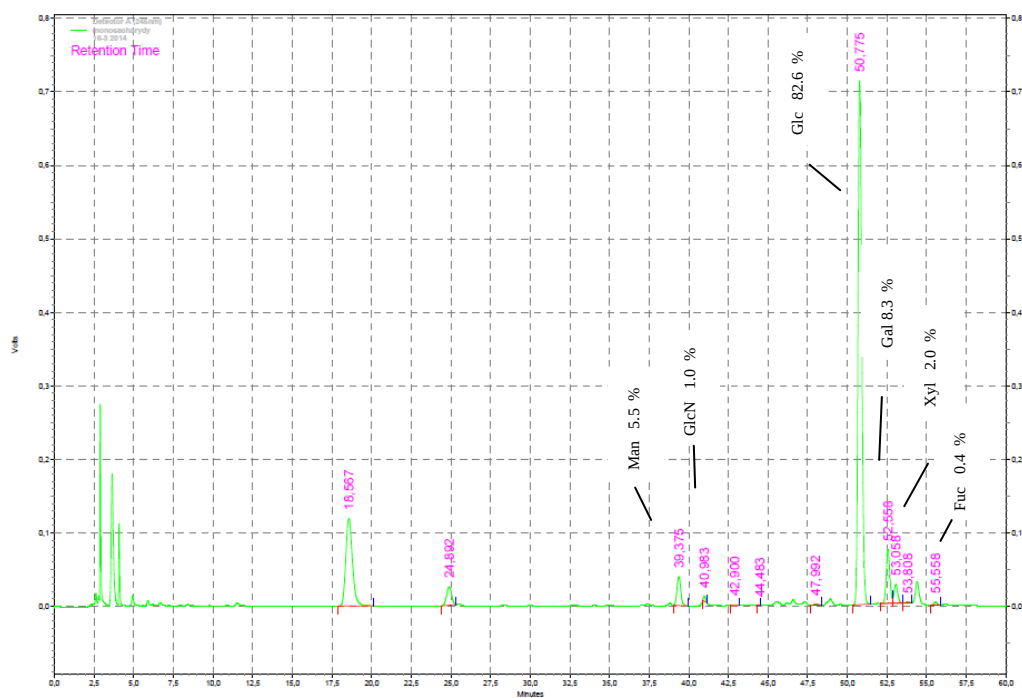
8.1.13. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta P80 K



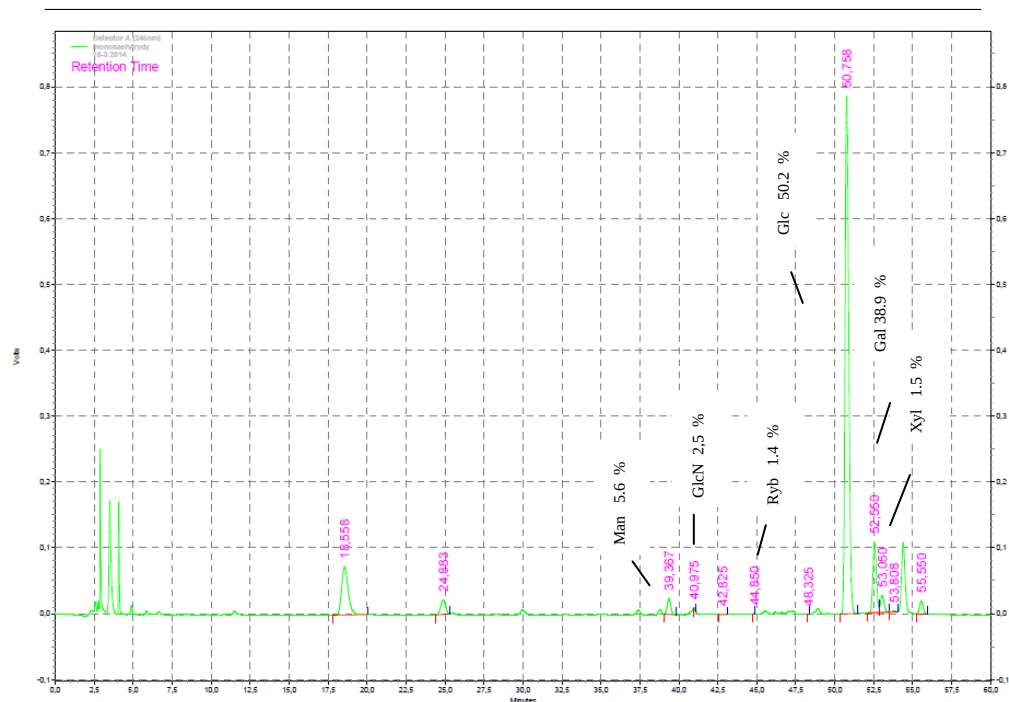
8.1.14. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta P80 SP



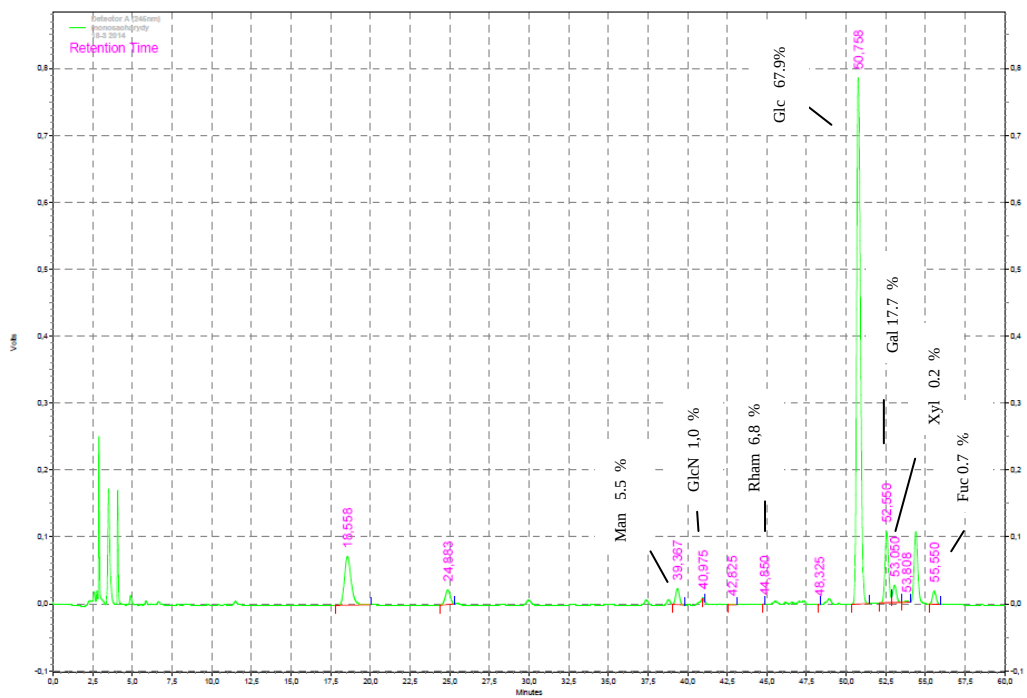
8.1.15. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta P80 K



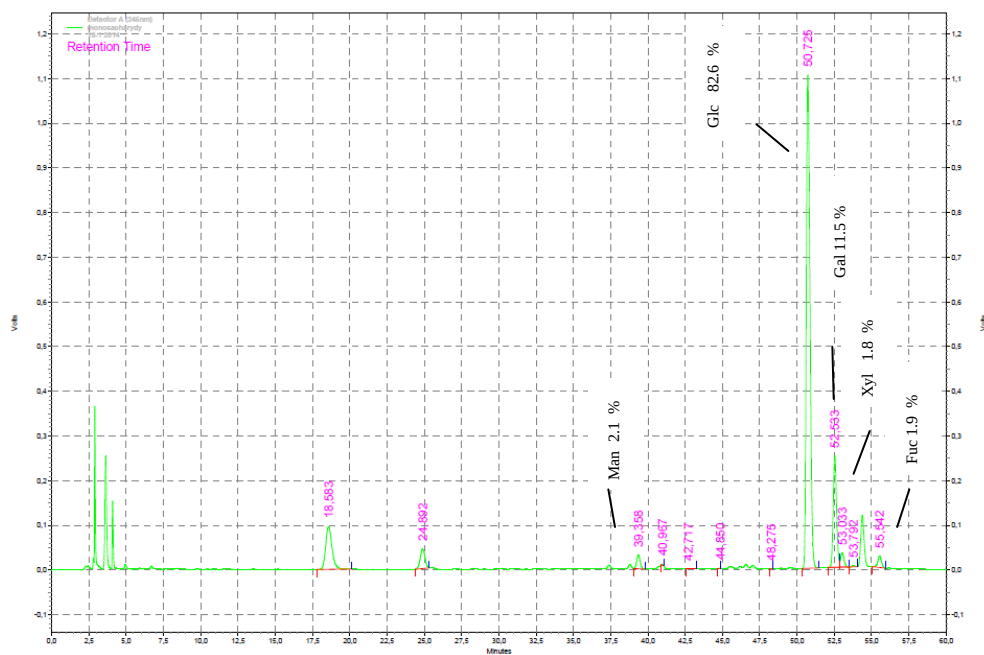
8.1.16. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta P80 SP



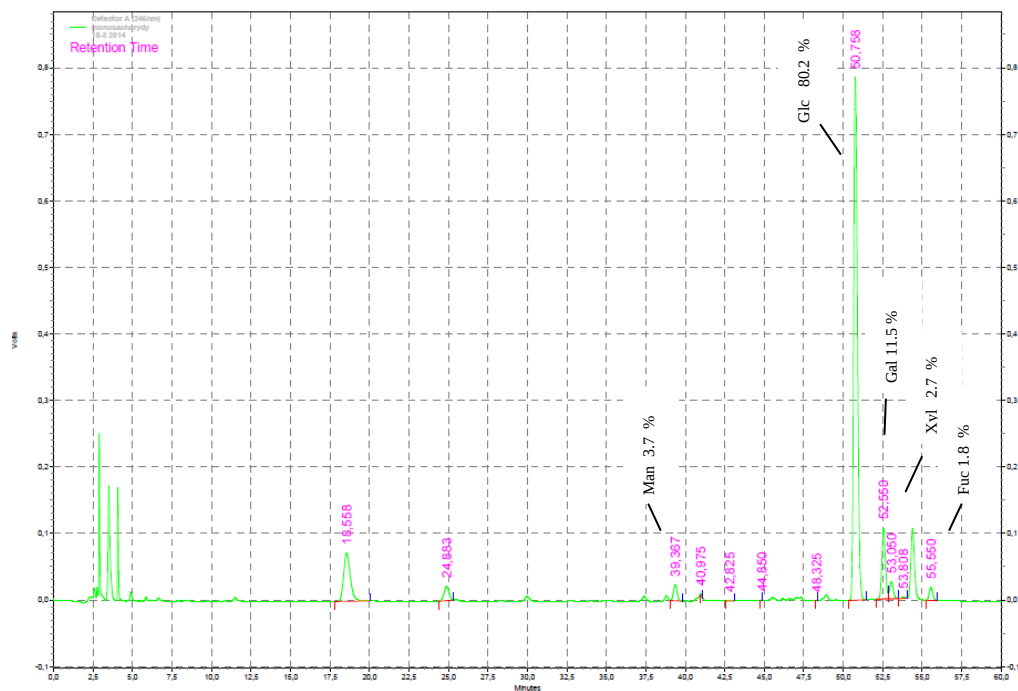
8.1.17. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PC K



8.1.18. Monosaharidni sastav vrelog vodenog ekstrakta PC SP



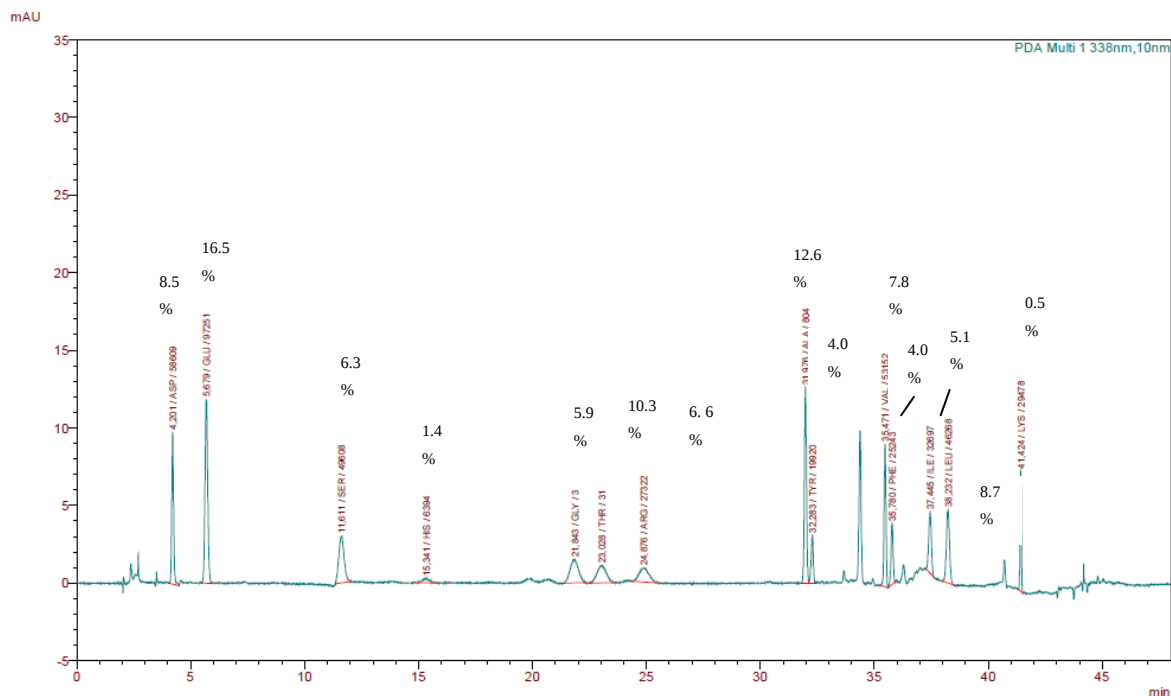
8.1.19. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PC K



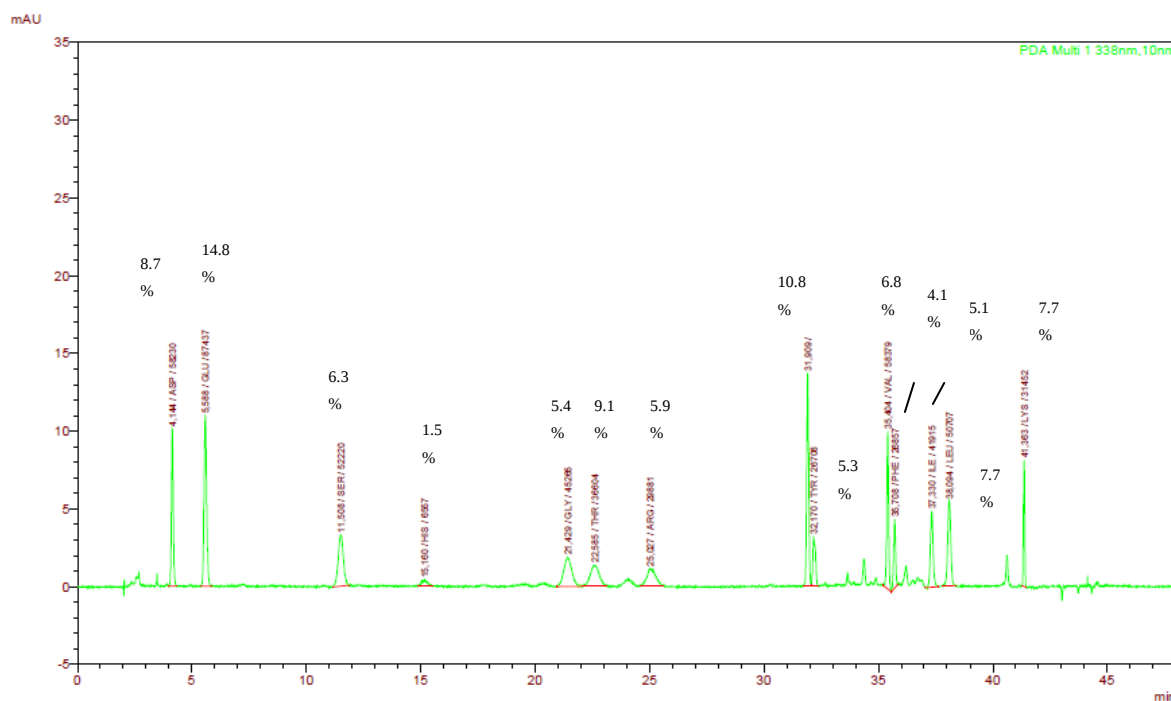
8.1.20. Monosaharidni sastav vrelog alkalnog ekstrakta PC SP

8.2. PRILOG B

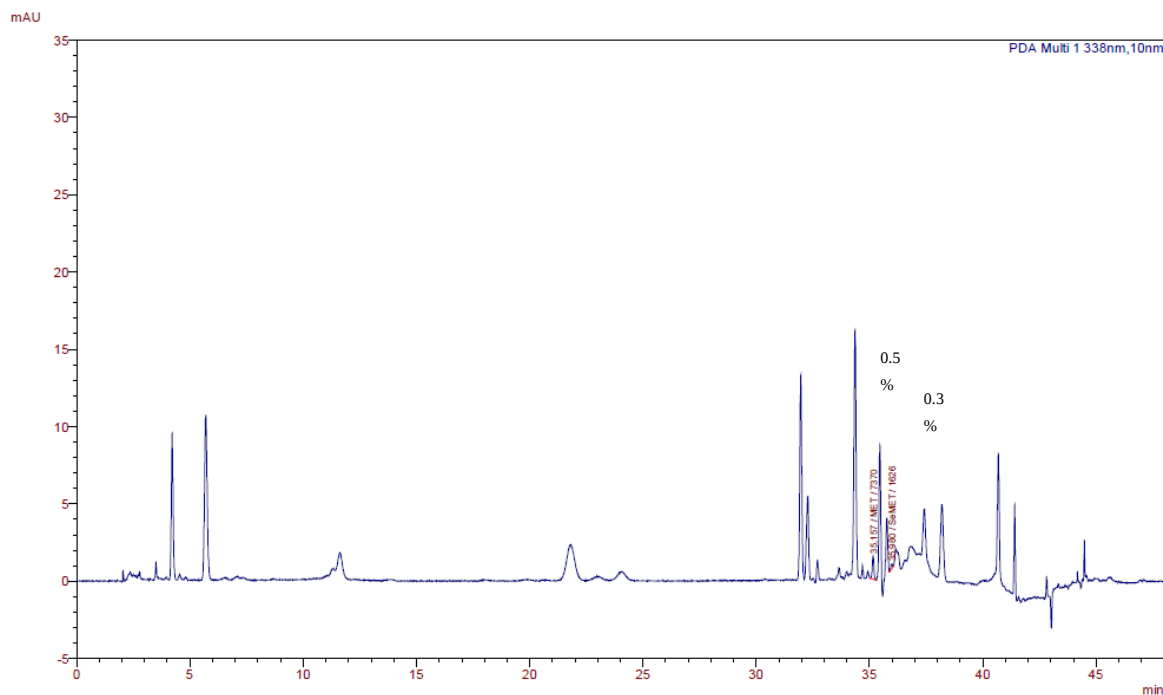
Hromatogrami aminokiselinskog sastava plodonosnih tela *Pleurotus spp.*



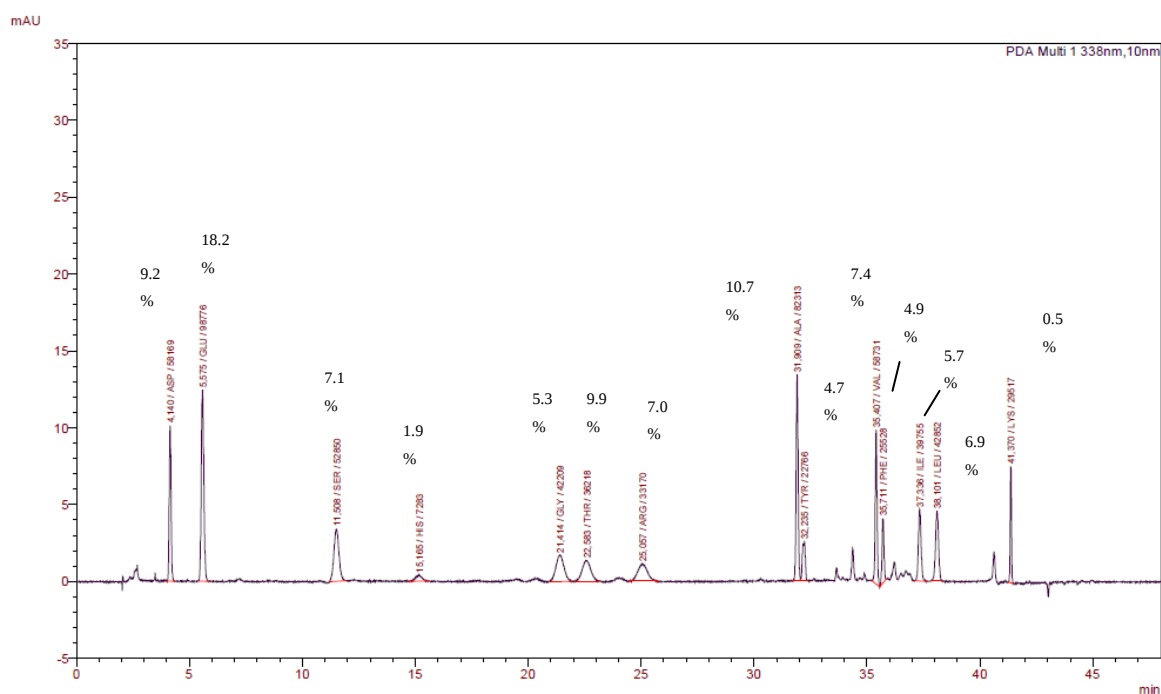
8.2.1. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P70, K



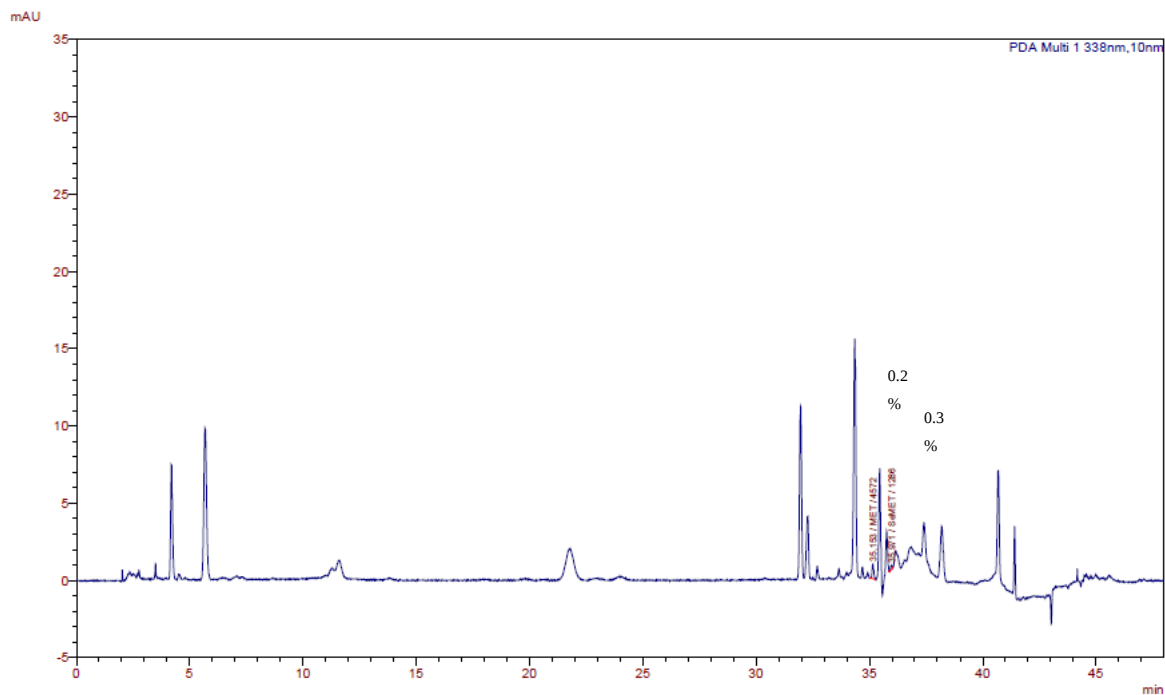
8.2.2. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P70, SP



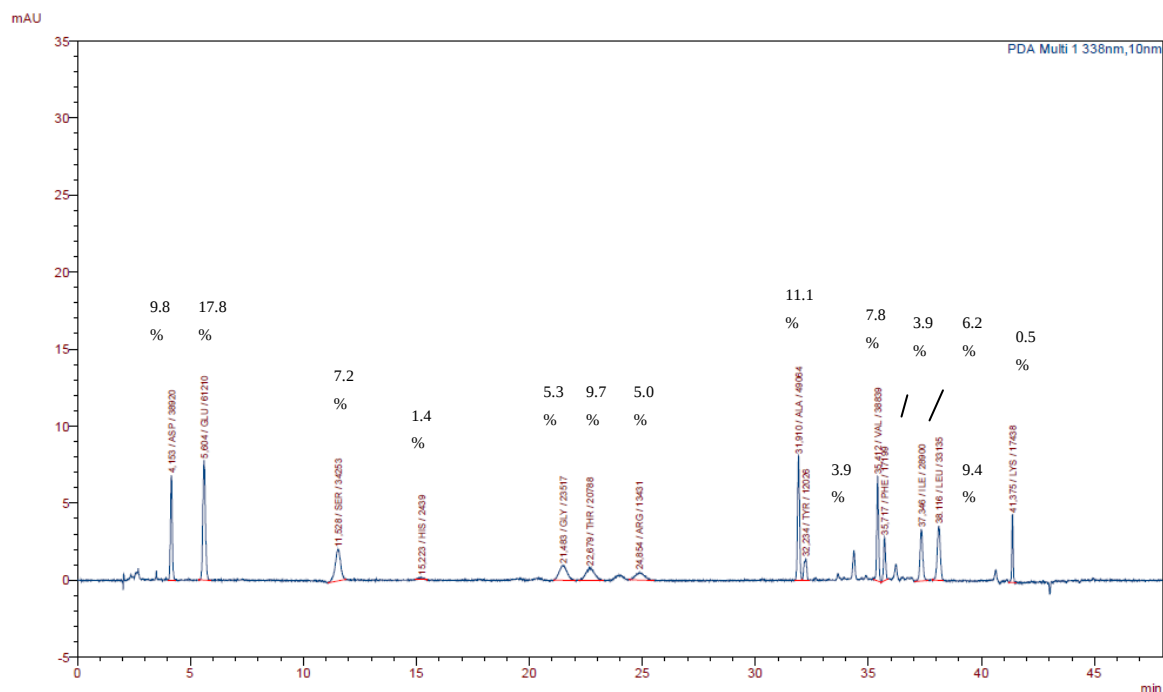
8.2.3. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P.ostreatus* P70, SP



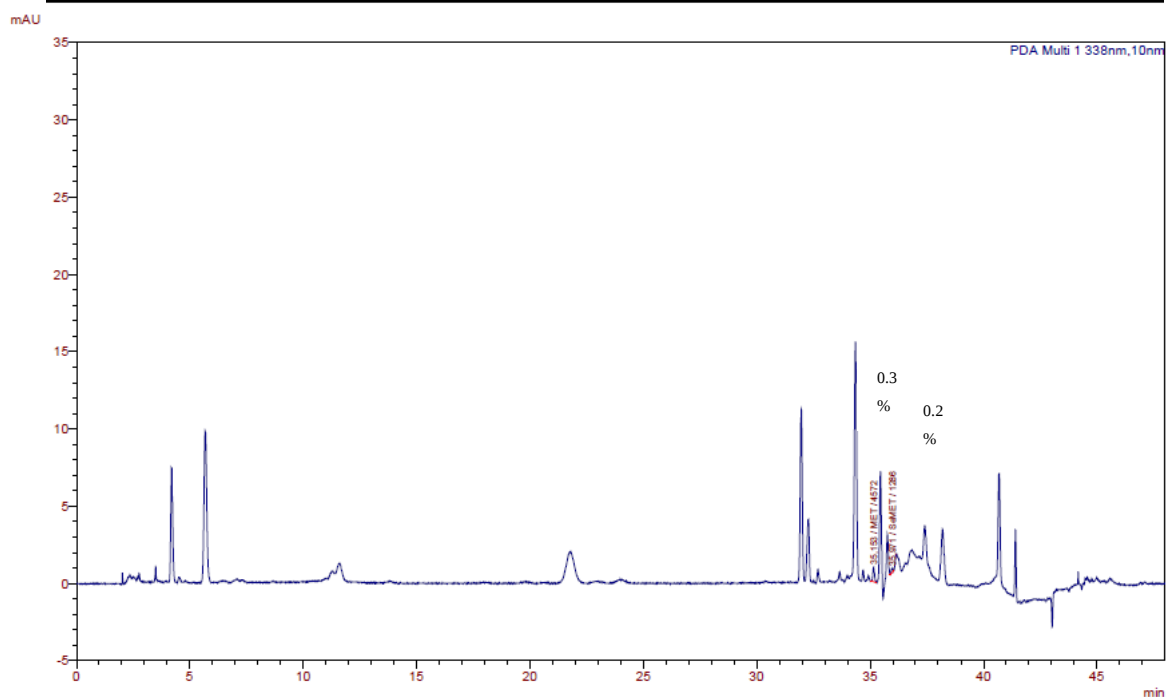
8.2.4. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P70, Zn(dapsesc)



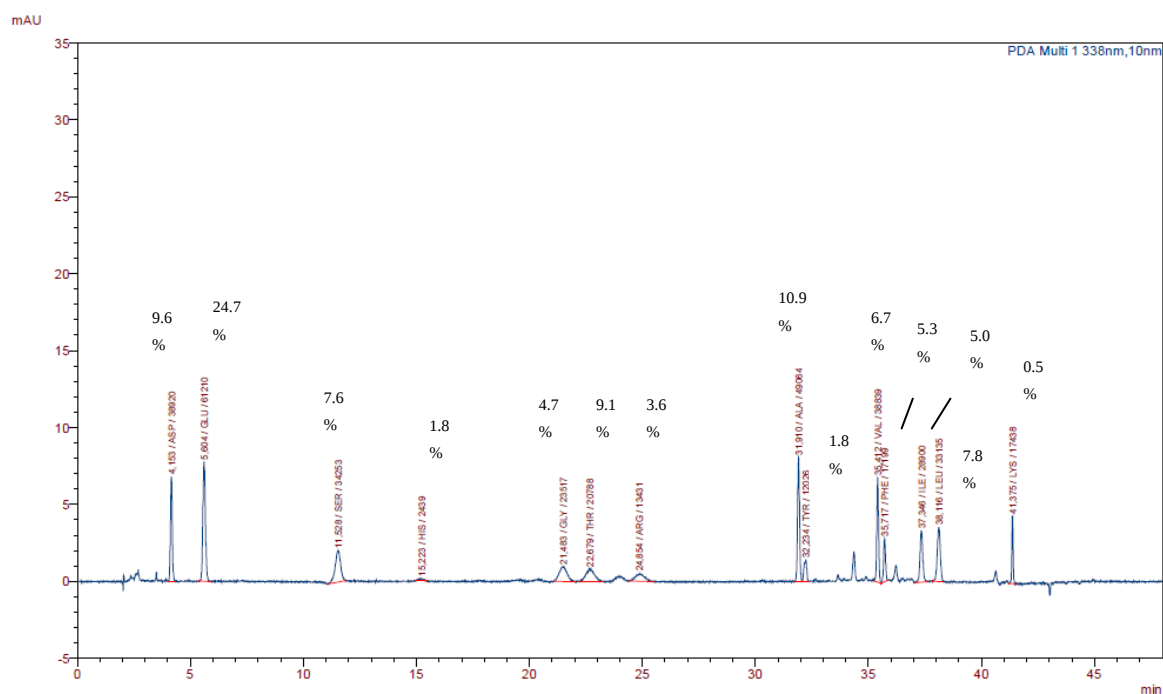
8.2.5. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P.ostreatus* P70, Zn(dapsesc)



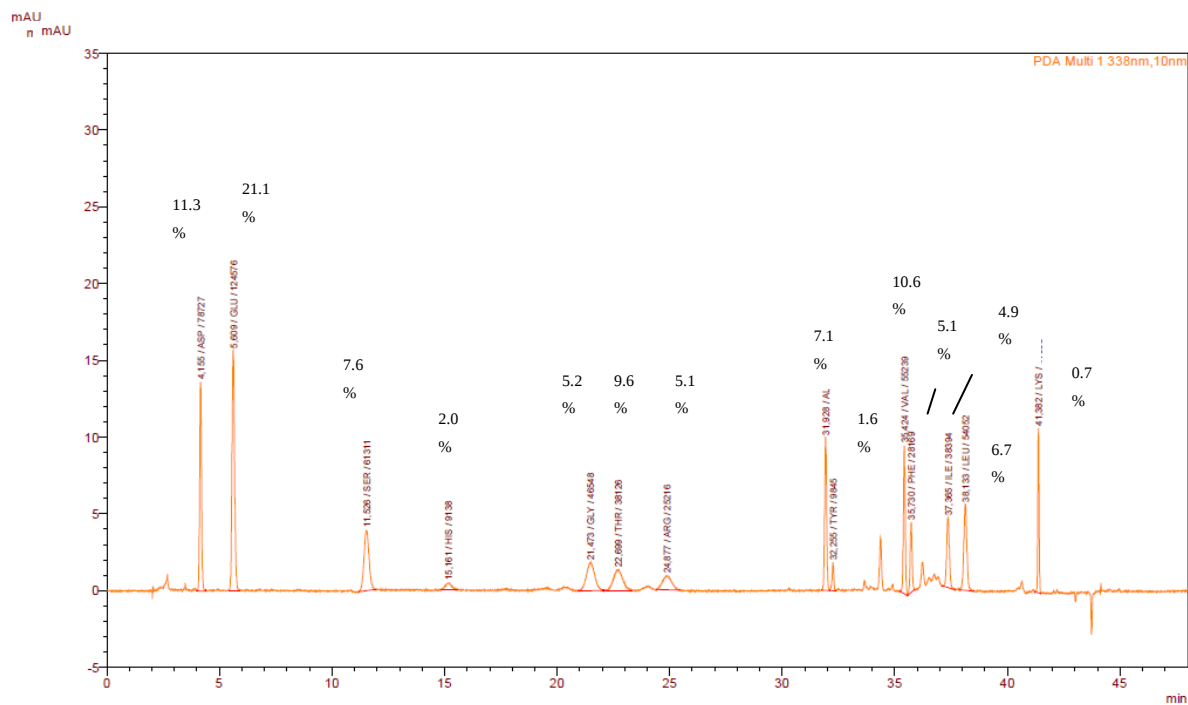
8.2.6. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P70, SeO_3^{2-}



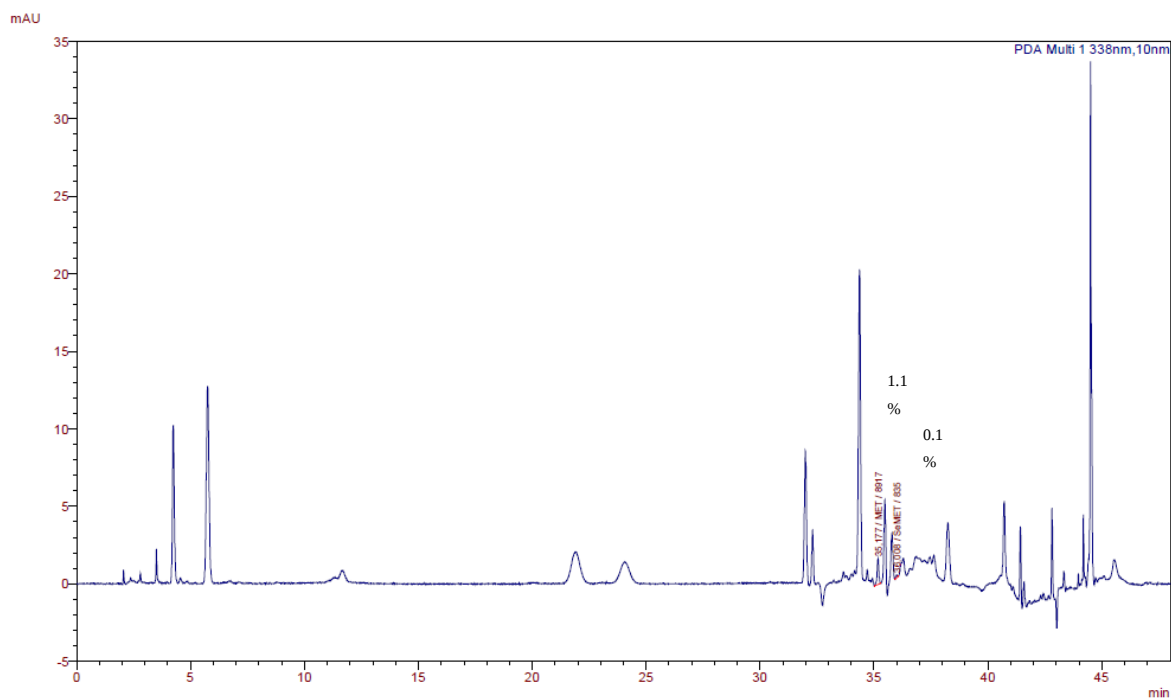
8.2.7. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P.ostreatus* P70, SeO_3^{2-}



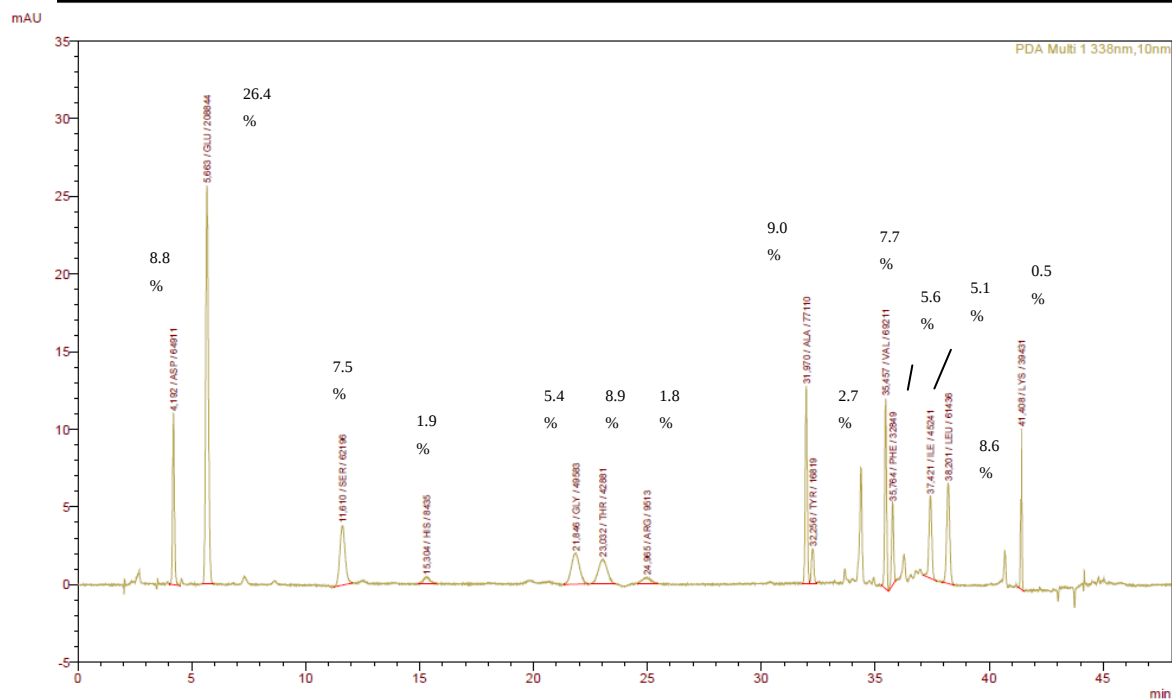
8.2.8. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P80, K



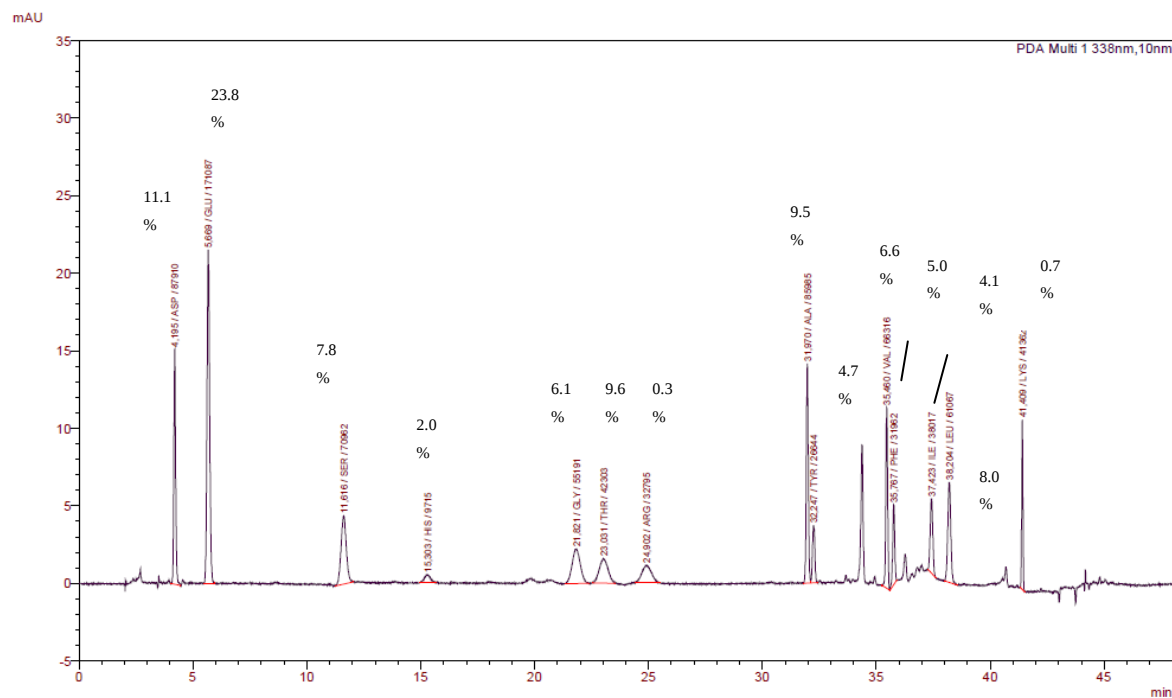
8.2.9. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.ostreatus* P80, SP



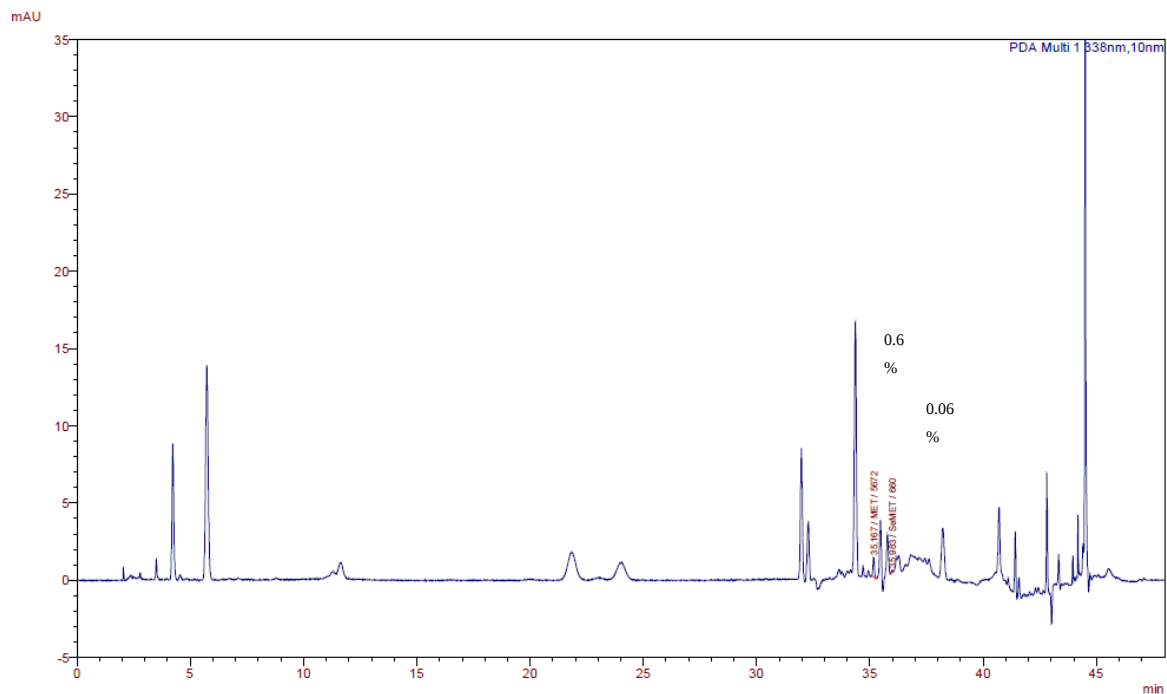
8.2.10. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P.ostreatus* P80, SP



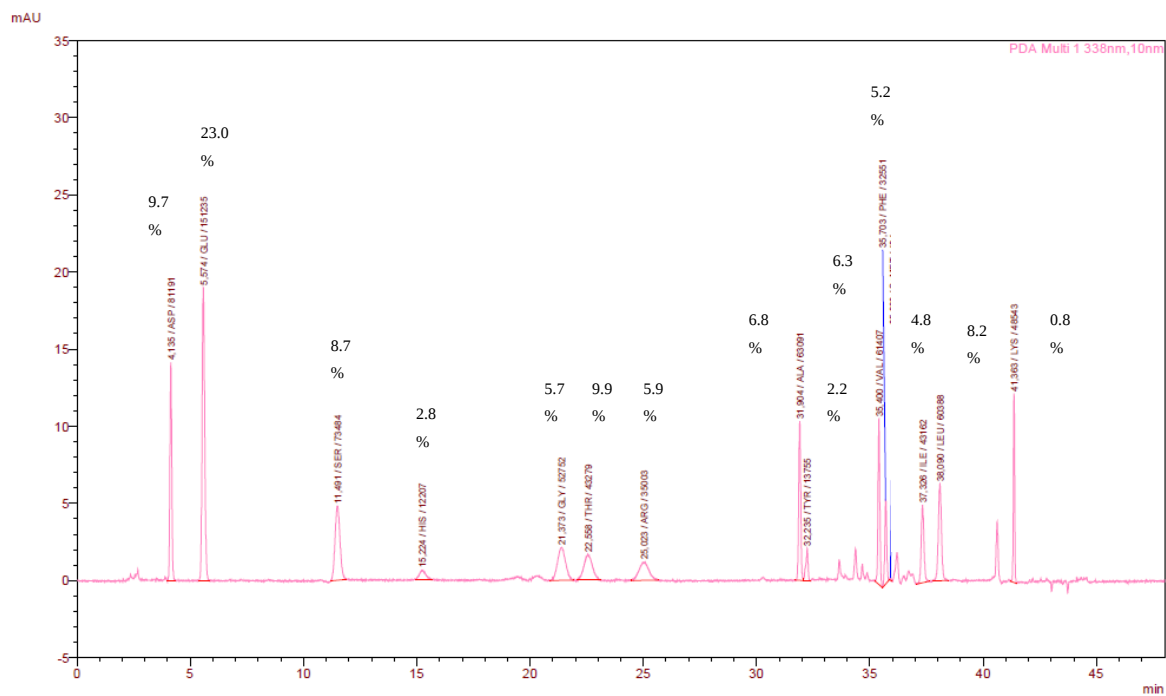
8.2.11. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.salmoneastreus*, K



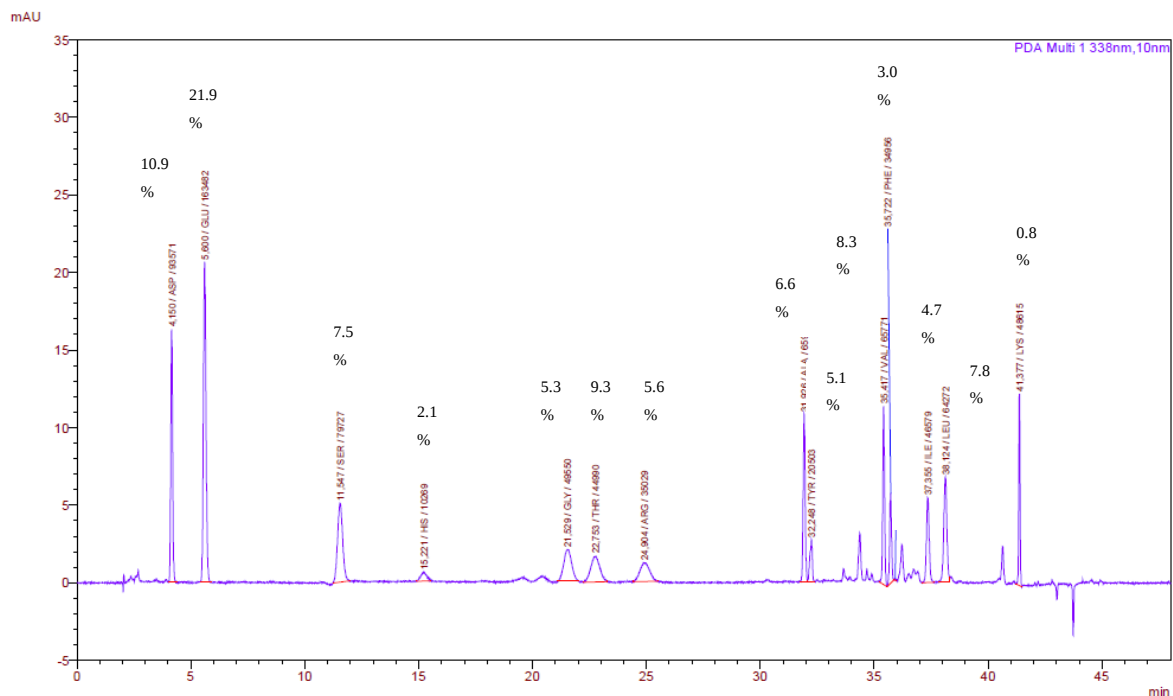
8.2.12. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P.salmoneastreus*, SP



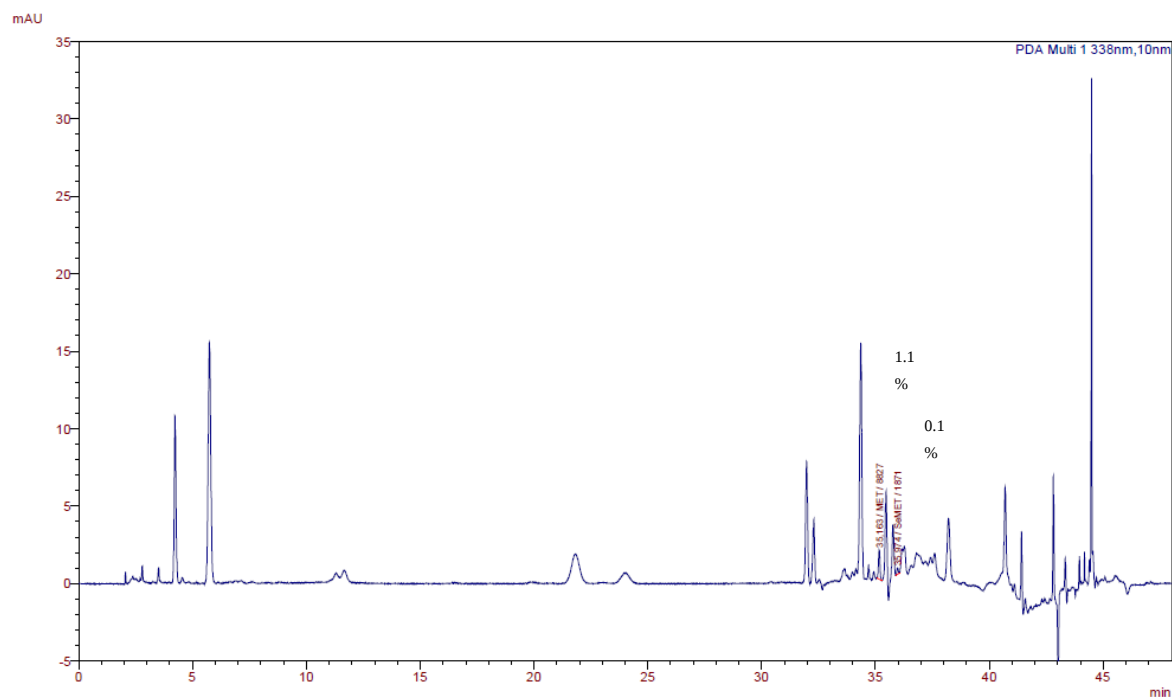
8.2.13. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P. salmoneastreus*, SP



8.2.14. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P. cornucopiae*, K



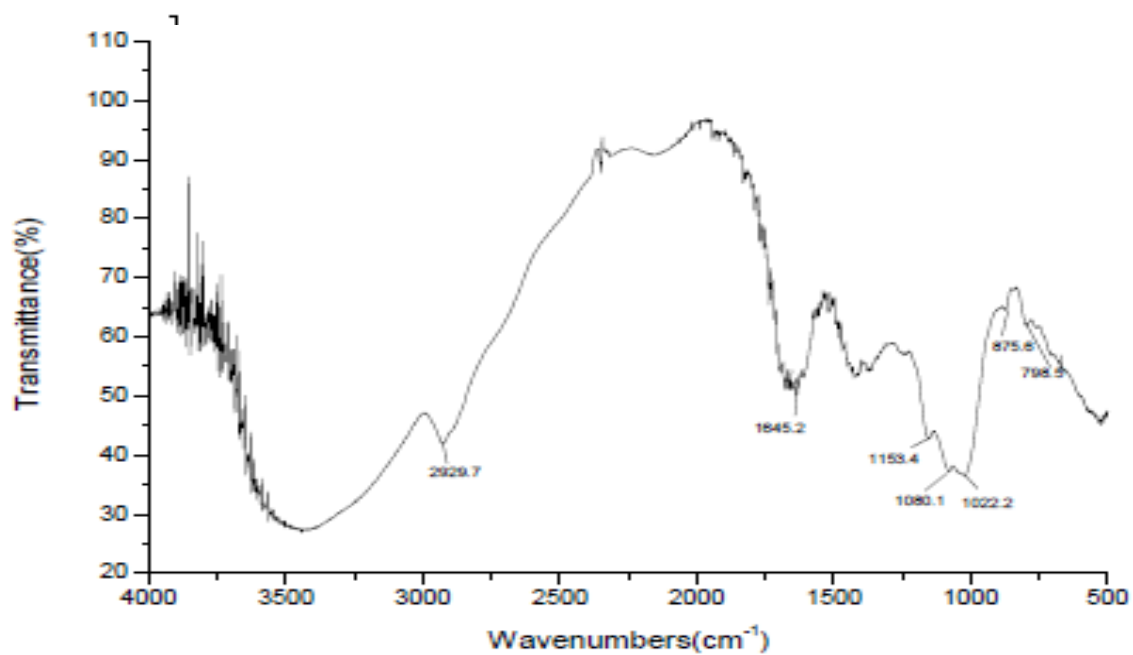
8.2.15. Aminokiselinski sastav plodonosnog tela *P. cornucopiae*, SP



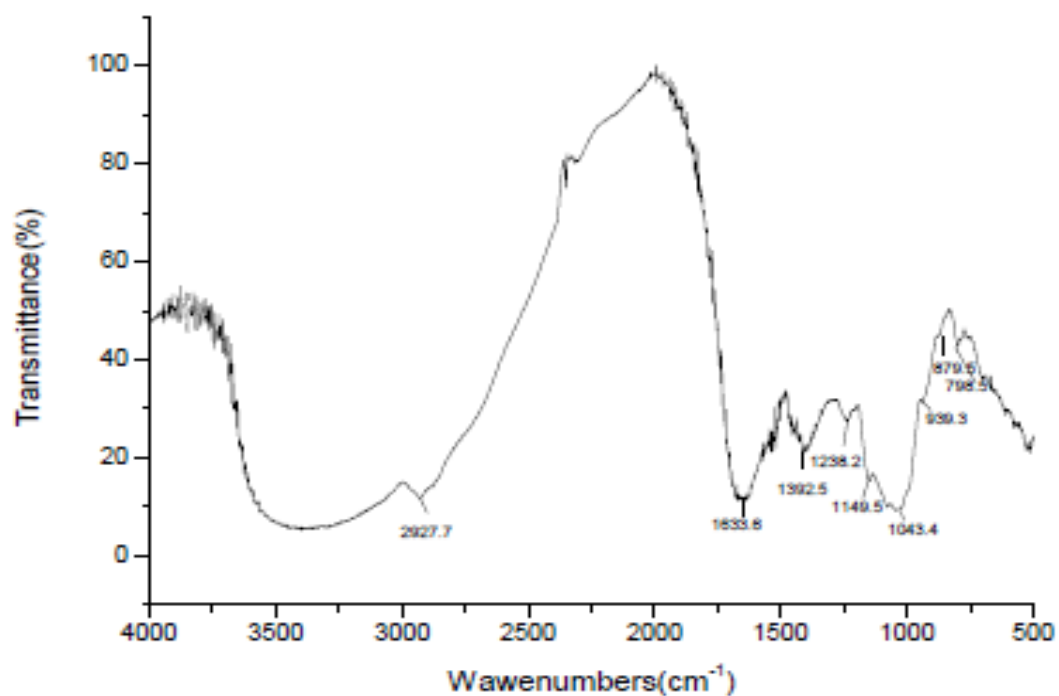
8.2.16. Met i Se-Met u plodonosnom telu *P. cornucopiae*, SP

8.3. PRILOG C

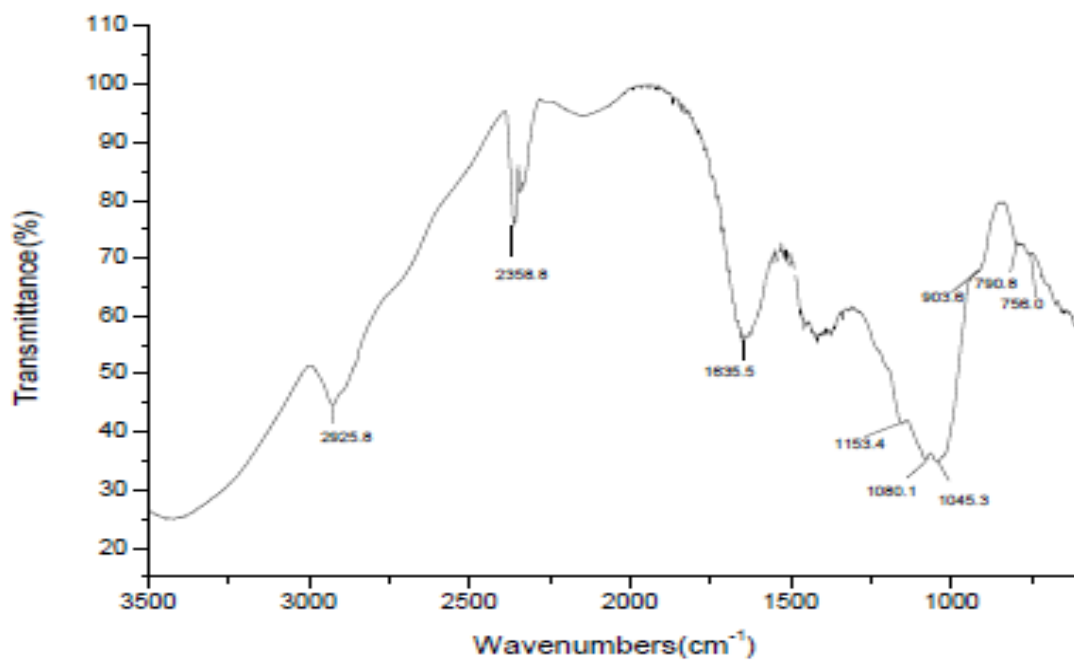
FT-IR spektri dobijeni snimanjem polisaharidnih ekstrakt gljiva *Pleurotus spp.*



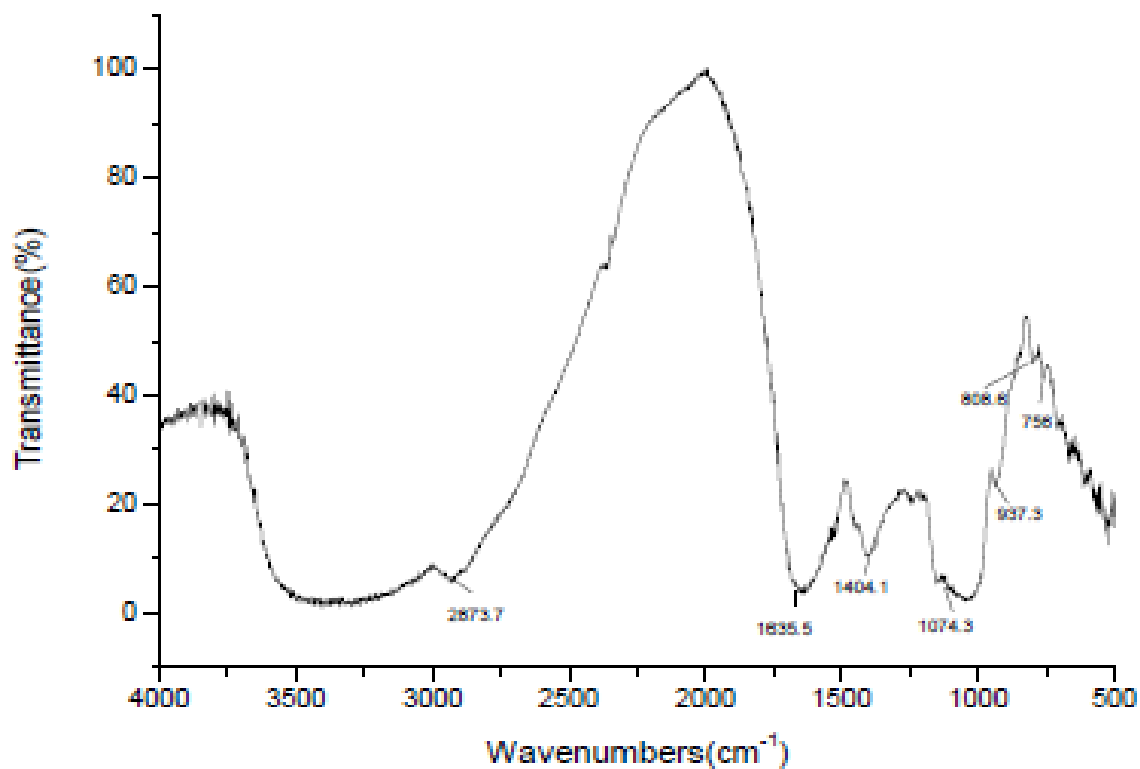
8.3.1. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P70 K



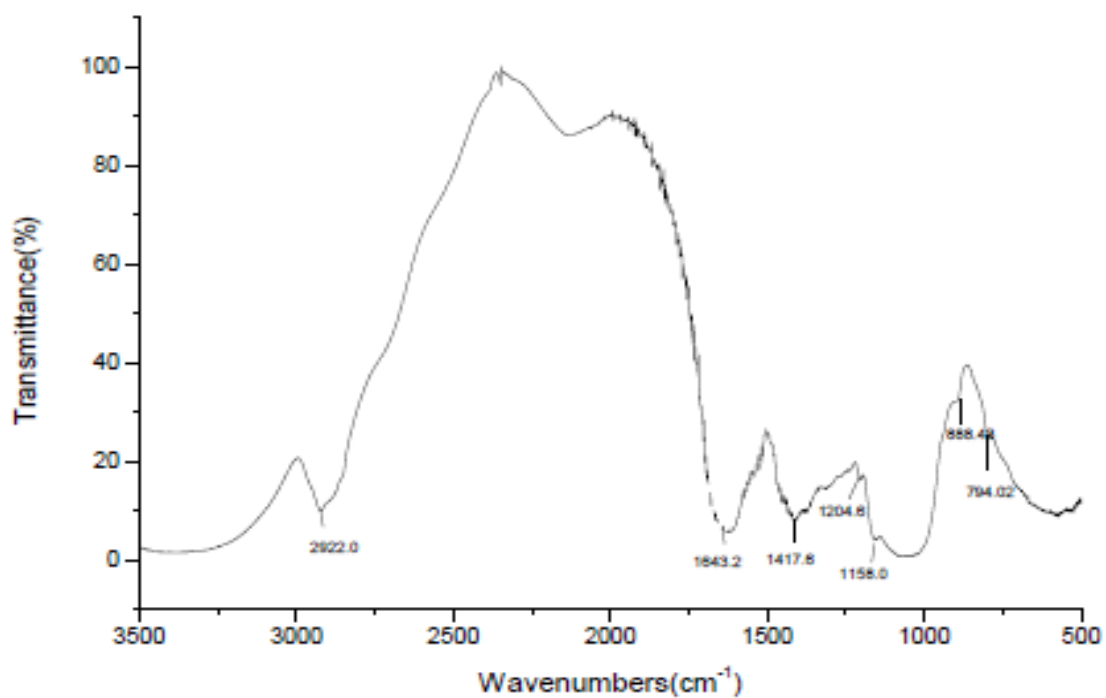
8.3.2. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P70 SP



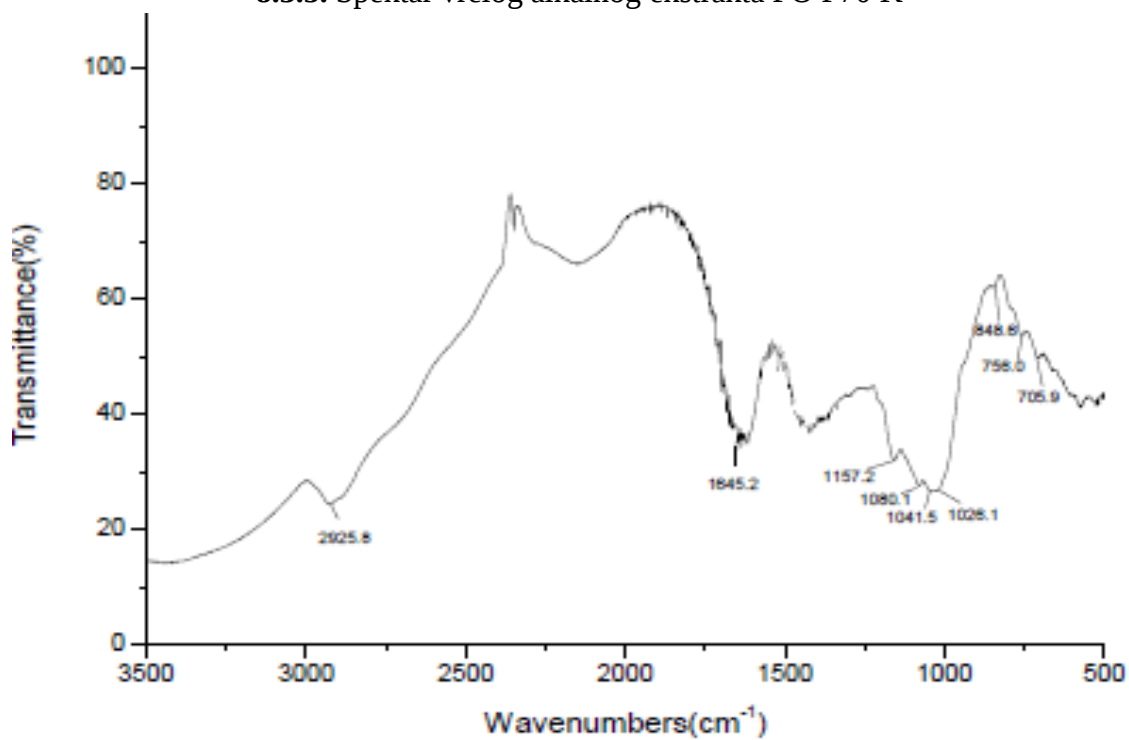
8.3.3. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P70 Zn(dapsesc)



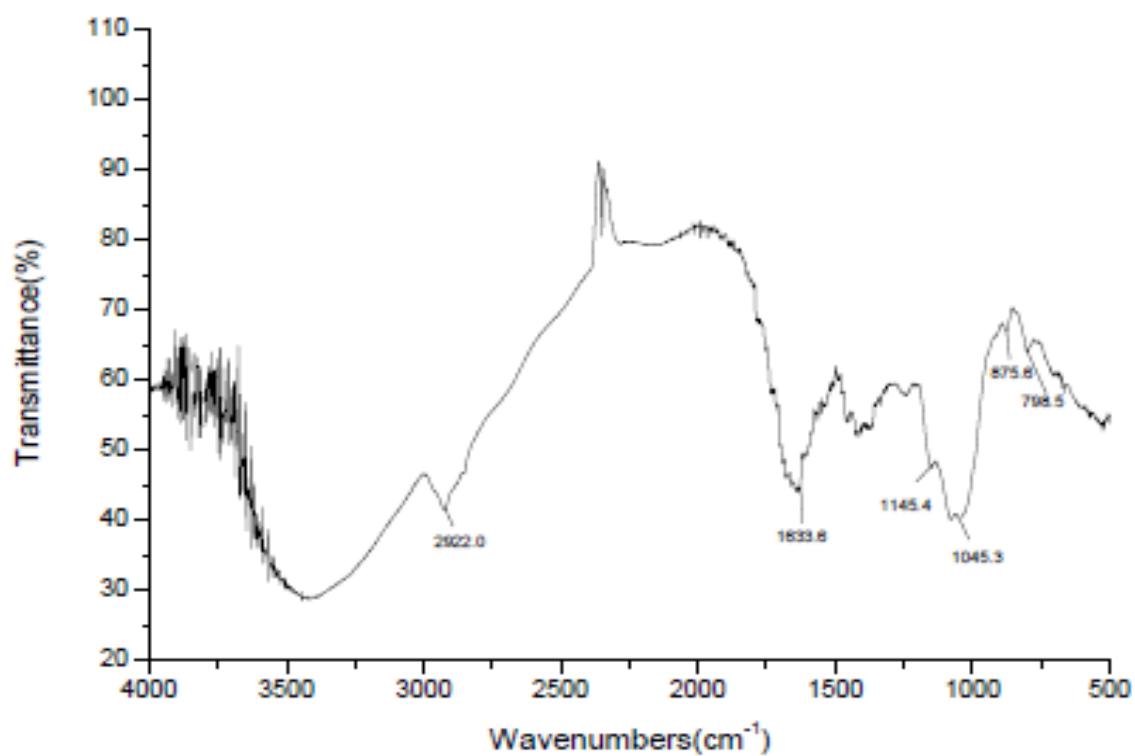
8.3.4. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P70 SeO₃²⁻



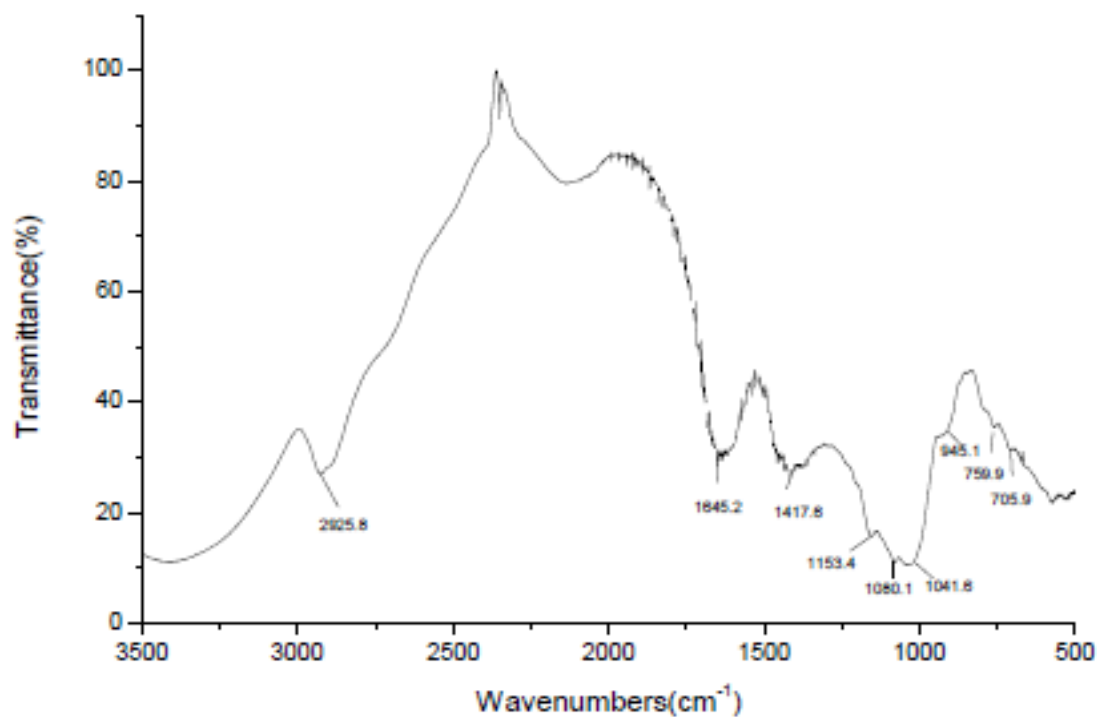
8.3.5. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 K



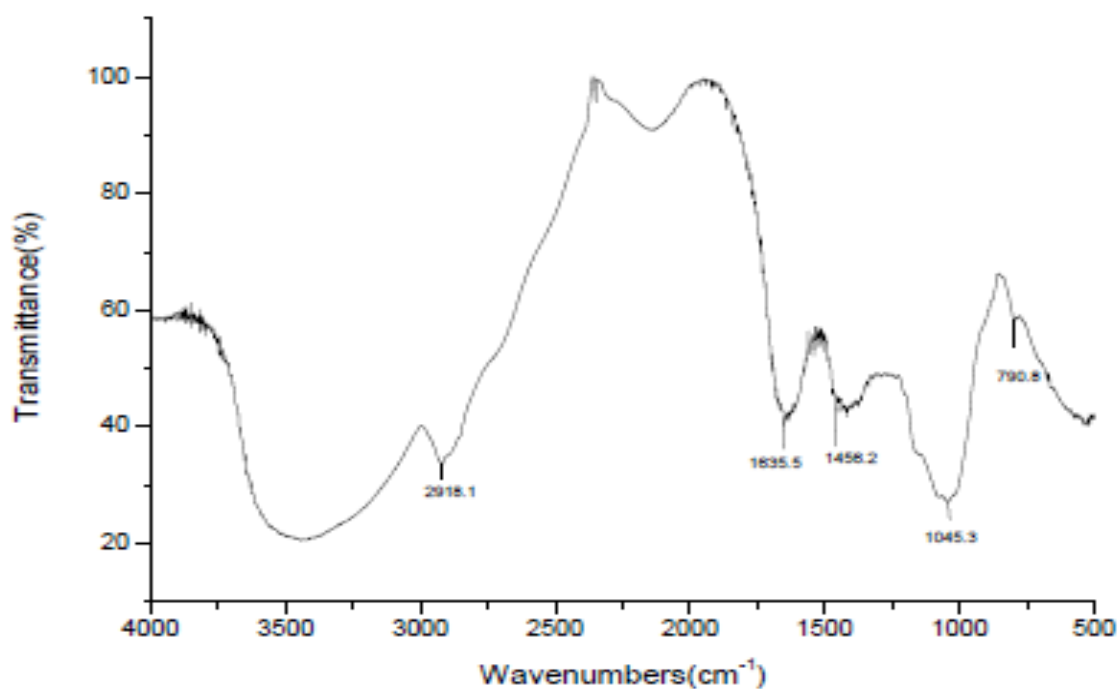
8.3.6. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 SP



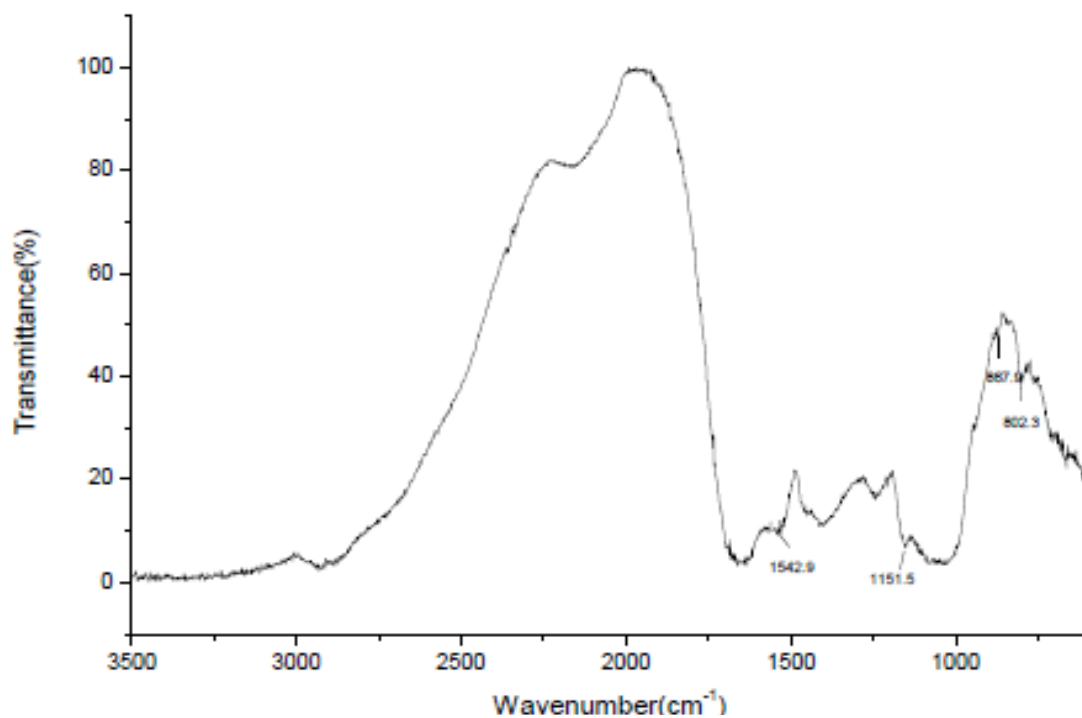
8.3.7. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 Zn(dapsesc)



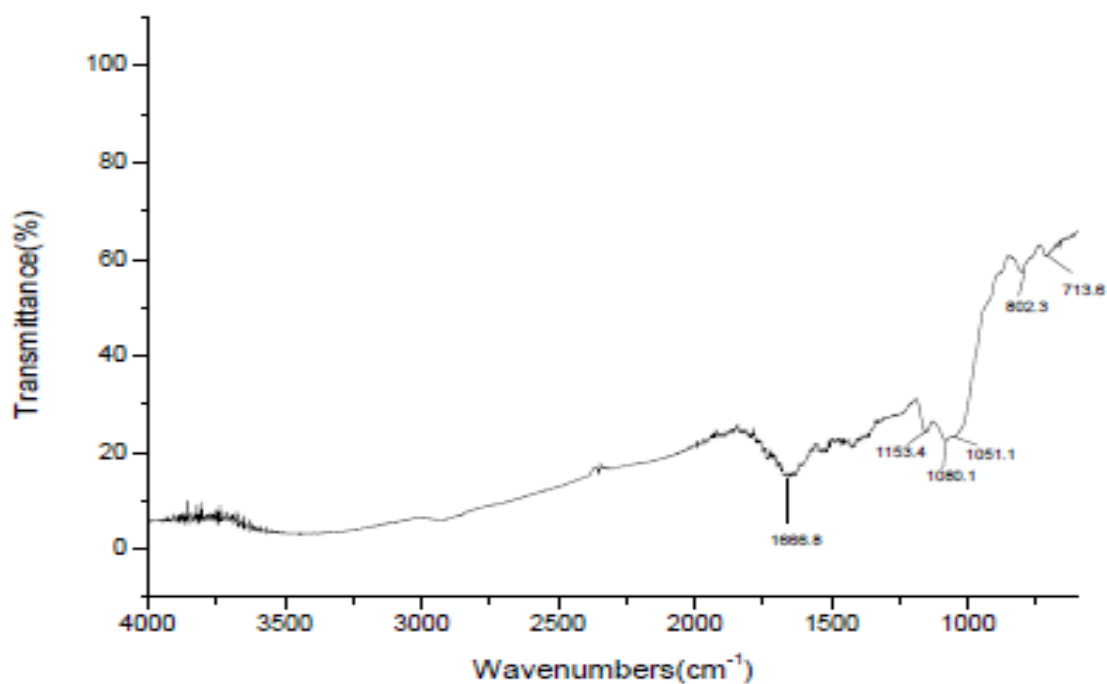
8.3.8. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P70 SeO₃²⁻



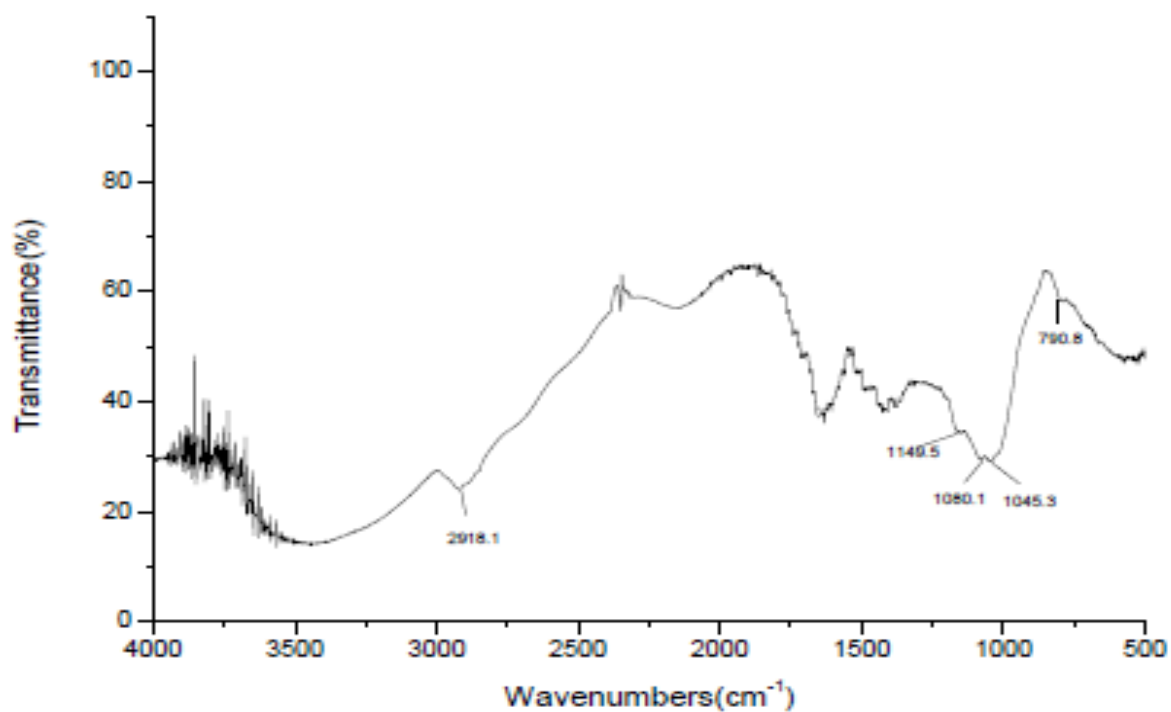
8.3.9. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P80 K



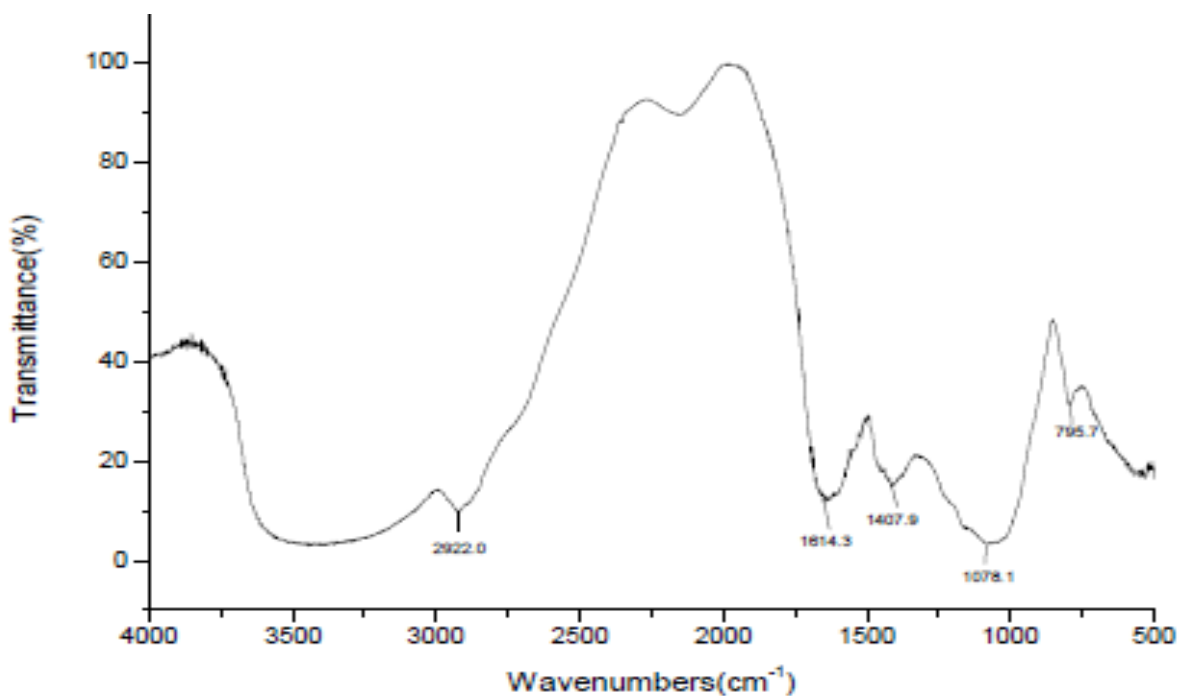
8.3.10. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PO P80 SP



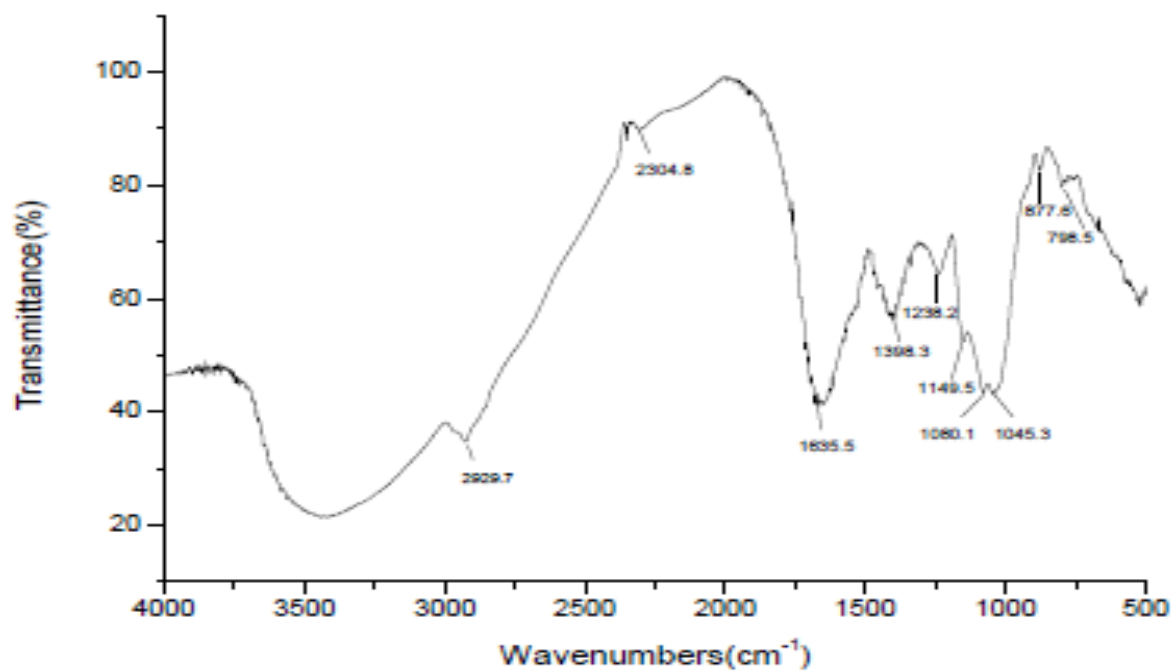
8.3.11. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P80 K



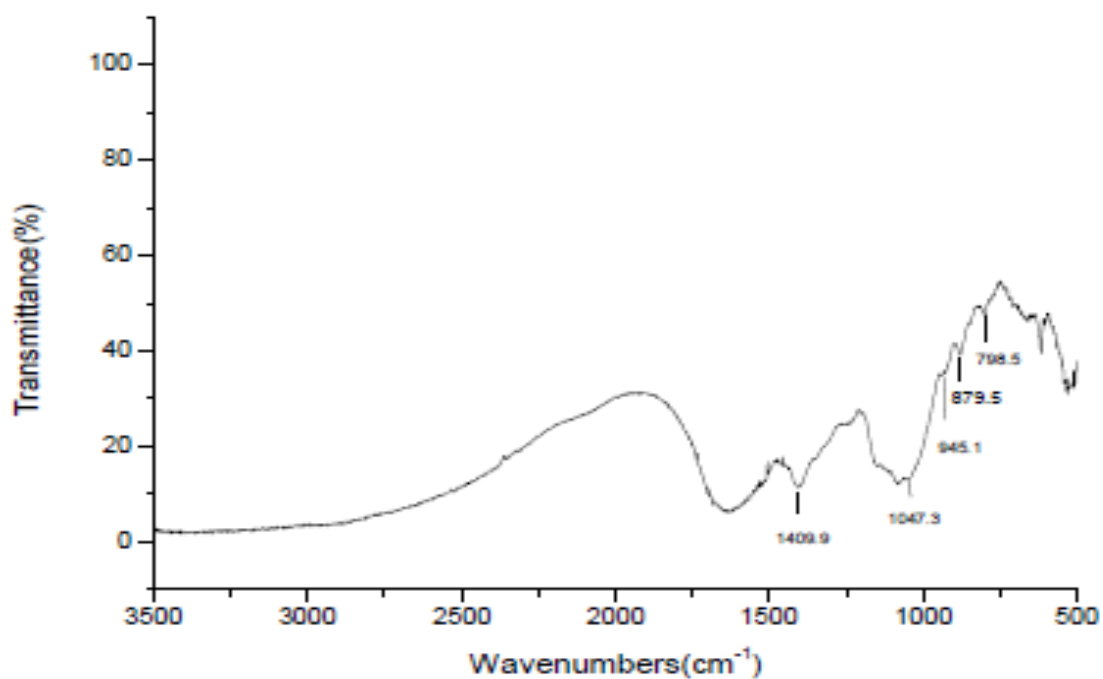
8.3.12. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PO P80 SP



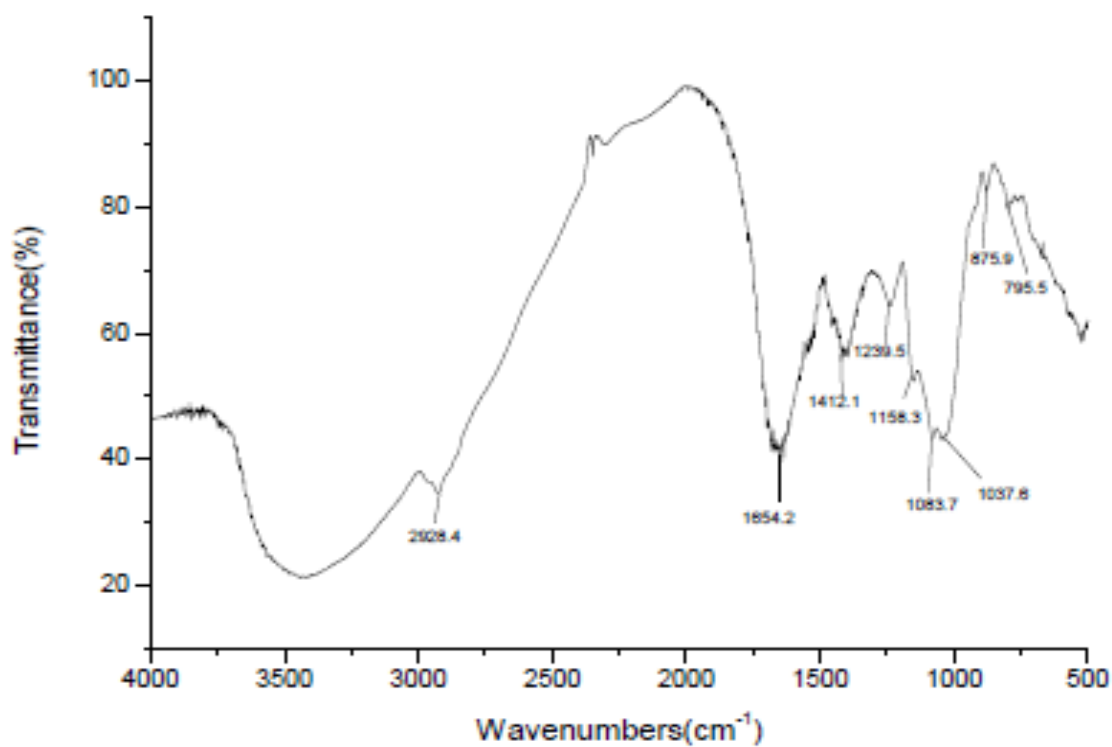
8.3.13. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PC K



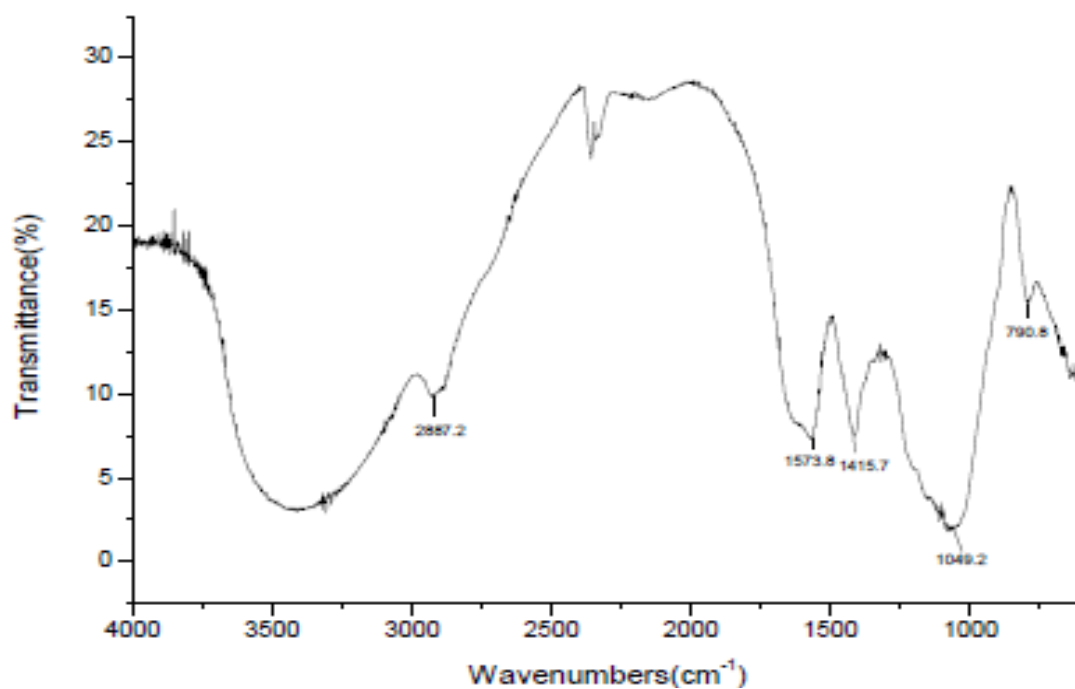
8.3.14. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PC SP



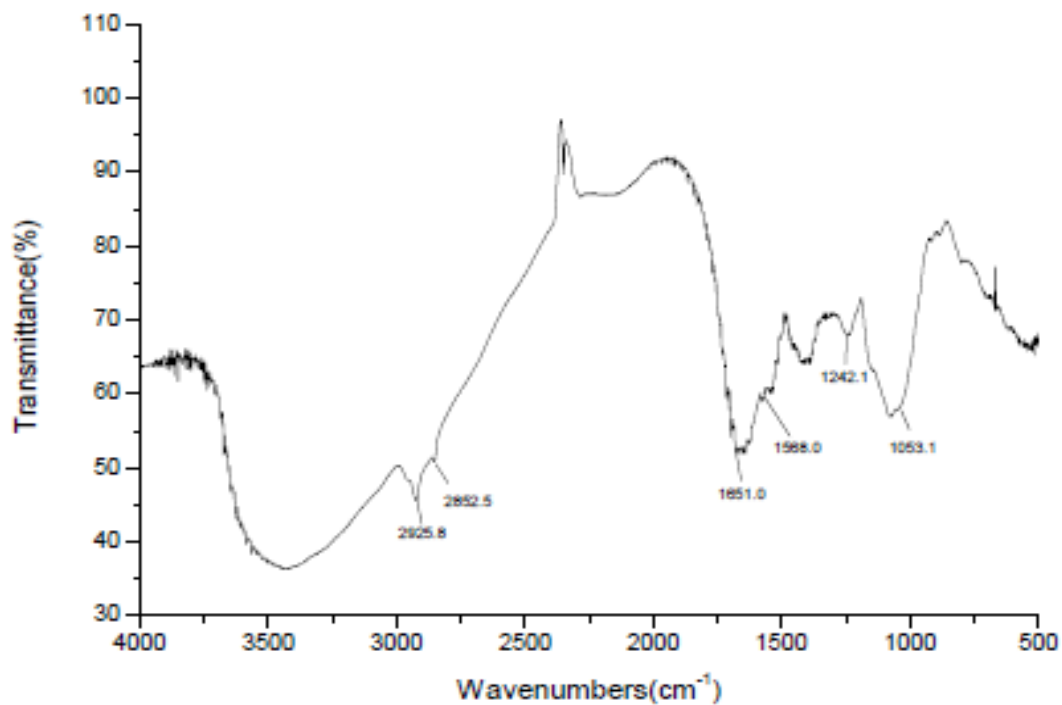
8.3.15. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PC K



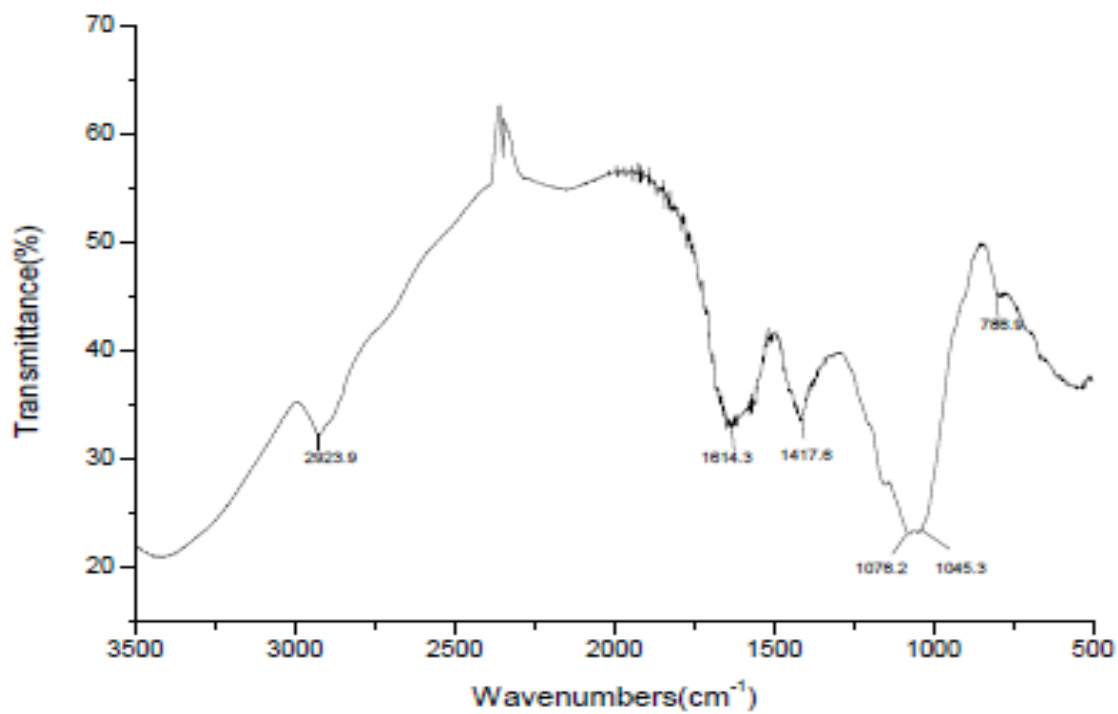
8.3.16. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PC SP



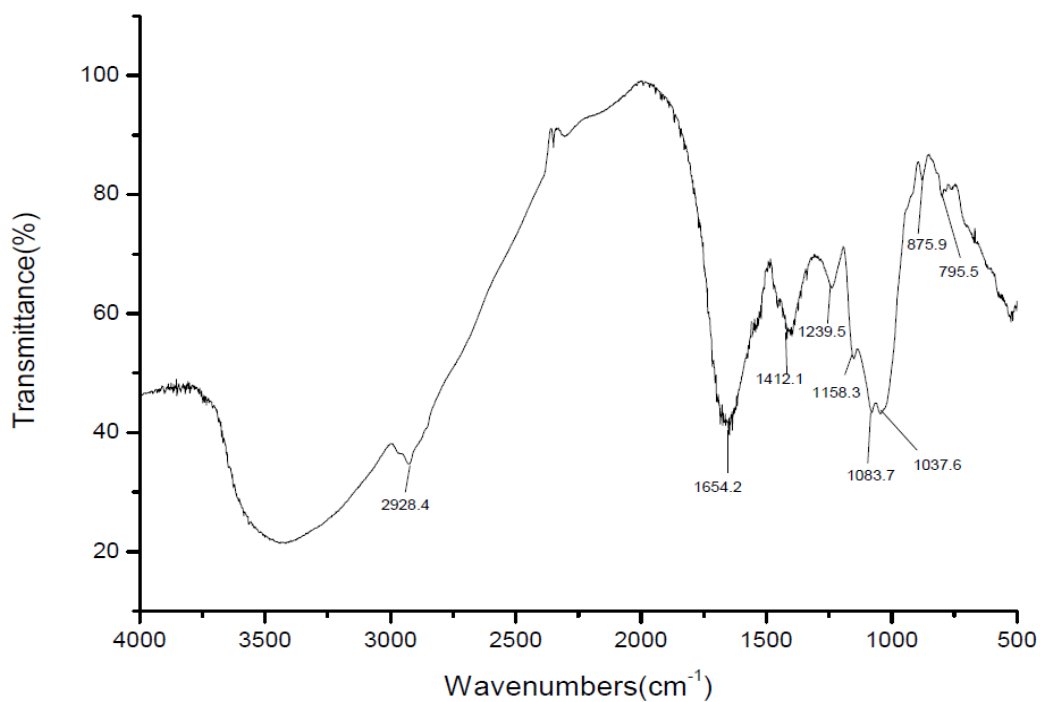
8.3.17. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PS K



8.3.18. Spektar vrelog vodenog ekstrakta PS SP



8.3.19. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PS K



8.3.20. Spektar vrelog alkalnog ekstrakta PS SP

BIOGRAFIJA AUTORA

Milena D. Savić je rođena 30.09.1983. godine u Požarevcu, Republika Srbija. Diplomirala je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2007. godine sa opštim uspehom 9,83 (devet osamdeset tri) u toku studija i ocenim 10 (deset) na diplomskom ispitu. Diplomski rad "Gajenje *Lentinus edodes* i sojeva *Ganoderma lucidum* na supstratu obogaćenom selenom", odbranila je na Katedri za Tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu.

Doktorske akademske studije na istom fakultetu upisala je 2007. godine, smer Prehrambena tehnologija, uža oblast istraživanja Tehnološka mikrobiologija. Zaposlena je na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu na kome je 2010. godine izabrana u zvanje i na radno mesto asistenta u nastavi za užu naučnu oblast Tehnološka mikrobiologija. Učesnik je na dva domaća i jednom internacionalnom projektu.

Autor je i koautor tri naučna rada sa ISI liste objavljenih u uglednim inostranim časopisima i preko 30 naučnih radova u međunarodnim i domaćim časopisima sa recenzijom i u zbornicima radova sa međunarodnih i domaćih skupova.

Dobitnik je FEMS-ove stipendije za mlade naučnike u 2013. godini. U 2014. godini u okviru "COST *Bioflavour*" projekta boravila je na naučnom usavršavanju na Farmaceutskom fakultetu Medicinskog Univerziteta u Varšavi, na Katedri za sintezu lekova i biotehnologiju.

Dobitnik je nagrade zadužbine Nikole Spasića za najbolje diplomiranog studenta Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu 2007.godine, stipendije Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka 2008. godine, stipendije Ministarstva nauke 2008. godine, nagrade "Student of the Year" u organizaciji EFFOST-a 2008. godine, nagrade Alltech Young Scientist Competition za osvojeno drugo mesto, 2011. godine.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije od 2008.godine i Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije od 2012. godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска 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/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора _____

Број индекса или пријаве докторске дисертације _____

Студијски програм _____

Наслов докторске дисертације _____

Ментор _____

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације 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 рада.

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____
