

UNIVERZITET U BEOGRADU
MULTIDISCIPLINARNE DOKTORSKE STUDIJE

Jovana M. Lukičić

**Uticaj vanadata na enzimske i neenzimske
komponente sistema antioksidativne zaštite
filamentozne gljive *Phycomyces*
blakesleeanus (Burgeff) [NRRL 1555(-)]**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
MULTIDISCIPLINARY DOCTORAL STUDIES

Jovana M. Lukičić

**Effects of vanadate on enzymatic and non-
enzymatic components of the antioxidant
defense system in the filamentous fungus
Phycomyces blakesleeanus (Burgeff)
[NRRL 1555(-)]**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentori:

dr Marina Stanić, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Prof. dr Miroslav Živić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

Prof. dr Tijana Cvetić Antić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Milan Žižić, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Milena Dimitrijević, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo doktorske disertacije izveden je na Odseku za nauku o živim sistemima, Instituta za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, kao i u Institutu za botaniku i Botaničkoj bašti "Jevremovac", na Katedri za fiziologiju biljaka Biološkog fakulteta u Beogradu.

Želim da se najpre zahvalim svojim mentorima:

profesoru dr Miroslavu Živiću, koji mi je pružio priliku da budem deo njegovog istraživačkog tima i koji mi je nesebično delio savete – kako naučne, tako i životne.

dr Marini Stanić, koja je bila prva osoba koja me je dočekala u laboratoriji i uvela u eksperimentalni rad, upoznavši me sa mojim budućim eksperimentalnim modelom, koji je neretko bio nepredvidiv. Upravo me ta nepredvidivost naučila strpljenju i istrajnosti, a u tome mi je Marina zaista pomagla – bodrila me je i verovala u moje sposobnosti. Bila je uvek spremna da mi pomogne i da bezuslovno deli svoje znanje i iskustva sa mnom.

Posebno bih se zahvalila **dr Tijani Cvetić Antić**, koja je nesebično podelila svoje znanje sa mnom i pružala mi podršku tokom celog istraživačkog rada. **Dr Milanu Žižiću** i **dr Mileni Dimitrijević**, koji su mi svojim znanjem i savetima pomogli da savladam prepreke, na koje sam naišla prilikom izrade ove disertacije.

Želela bih i da se zahvalim svojim koleginicama **dr Katarini Stevanović**, **dr Tanji Pajić** i **dr Kristini Atlagić**, koje su zaista verovala u mene, ohrabrivale me i nisu dozvolile da odustanem. Takođe, **dr Ljilji Nikolić**, koja je činila svaki dan malo zabavnijim i koja mi je uvek bila moralna podrška. **Dr Jeleni Bogdanović Pristov** i **dr Nataši Todorović** na dobronamernim kritikama i savetima, onda kada mi je to zaista trebalo.

Svojim dragim ljudima, mojim prijateljima (**Mici**, **Dijani**, **Aci**, **Sanji** i **Nataši**) želim da se zahvalim na čuvenim pitanjima „Kada ćeš završiti?“ i „Kako ide?“. Bez vaše podrške i pozitivne energije, ovo iskustvo bi bilo mnogo teže. Bivšim cimerkama i fakultetskim koleginicama, **Joki** i **Nataši**, koje su bile uvek tu da me saslušaju i podrže, takođe dugujem zahvalnost.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj **porodici**, svojim roditeljima, sestri i bratu, koji su bezuslovno verovali u mene, pružali mi podršku i nisu dozvolili da odustanem. Što su bili uvek tu za mene, u ovom iskustvu prepunom padova i uspona.

Svom životnom saputniku **Saši**, koji je bio moj oslonac, želim da se zahvalim za svu podršku i ljubav bez koje nikada ne bih uspela da ostvarim svoje ciljeve.

I na kraju, želim da se posebno zahvalim svojoj **deci**, **Vukašinu** i **Katarini**, sa kojima je ovo iskustvo bilo izazovnije i stresnije, ali i zanimljivije i mnogo lepše. Ovu doktorsku disertaciju posvećujem njima, da budu ponosni na mamu, kao što sam ja ponosna na njih.

Uticaj vanadata na enzimске i neenzimske komponente sistema antioksidativne zaštite filamentozne gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff) [NRRL 1555(-)]

Sažetak

Zadatak ove disertacije je bio ispitivanje dejstva vanadijuma (V), prelaznog metala sa raznovrsnim fiziološkim efektima, na metabolizam končaste gljive *Phycomyces blakesleeanus*. Od ranije je poznato da ova gljiva ima sposobnost usvajanja, redukcije i unutarćelijskog heliranja V u obliku vanadata [V(V)] i vanadila [V(IV)]. Vanadijum je redoks aktivan metal, te je ispitan uticaj inkubacije micelije *P. blakesleeanus* u V(V) na produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i promene u aktivnosti enzimskih, odnosno koncentraciji neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema.

Micelije u tri karakteristične faze rasta – eksponencijalnoj (E), kasnoj eksponencijalnoj (KE) i stacionarnoj (S) - su tretirane 1, 5 ili 10 mM V(V) tokom 1, 5 ili 24 h. U E i KE fazi rasta je udeo V(V) u micelijama nakon 24 h tretmana dostigao 0,8 i 0,7%, što kandiduje ovu gljivu za bioakumulatora V. V(V) je već nakon 30 min. doveo do značajnog povećanja unutarćelijskih ROS kod micelije u E fazi rasta, dok je kod druge dve starosne grupe ovaj porast bio manji. Duža (24 h) izlaganja su dovela do većeg porasta ROS kod KE i S micelija, što ukazuje na najveće antioksidativne kapacitete micelije u E fazi, koji je očuvan zahvaljujući visokim koncentracijama neenzimskih antioksidanata poput GSH i fenola. U S fazi, osnovnu antioksidativnu ulogu nose GSH i peroksidaze, i to POD i GPx. KE faza rasta se pokazala kao najosetljivija na efekte V. Redukujući kapacitet micelije je ovde ostao umanjen i nakon 5 h tretmana i to je jedina faza na čiju vijabilnost je V(V) imao inhibitorski efekat.

Izlaganje mikroorganizama stresu dovodi do sinteze lipida ili ugljenih hidrata, pa je sa tim u skladu FTIR metodom određen relativni sadržaj gradivnih biomolekula u miceliji *P. blakesleeanus*. Kao glavni faktor u povećanju udela lipida u biomasi istaklo se starenje micelije, ali i tretman V(V) je imao jasan uticaj. Analiza lipidnog sastava može ukazati na potencijalnu upotrebnu vrednost *P. blakesleeanus* u proizvodnji biodizela ili nutritivnih ulja.

Ključne reči: vanadat, oksidativni stres, antioksidativna zaštita, *Phycomyces blakesleeanus*, reaktivne kiseonične vrste, biosorpcija, lipidi, kriva rasta

Naučna oblast: Biološke nauke

Uža naučna oblast: Biofizika

Effects of vanadate on enzymatic and non-enzymatic components of the antioxidant defense system in the filamentous fungus *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff) [NRRL 1555(-)]

Abstract

The aim of this dissertation was to investigate the effect of vanadium (V), a transition metal with various physiological effects, on the metabolism of the filamentous fungus *Phycomyces blakesleeanus*. It is known that this fungus can take up, reduce and intracellularly chelate V in the form of vanadate [V(V)] and vanadyl [V(IV)]. Since vanadium is a redox-active metal, the influence of incubation of *P. blakesleeanus* mycelia in V(V) on the production of reactive oxygen species (ROS) and the changes in the activity of enzymatic and non-enzymatic components of the antioxidant system was investigated.

Mycelia in three characteristic growth phases - exponential (E), late exponential (LE) and stationary (S) - were treated with 1, 5 or 10 mM V(V) for 1, 5 or 24 hours. In growth phases E and LE, the proportion of V(V) in the mycelia reached 0.8 and 0.7% after 24 h of treatment, making this fungus a candidate for V bioaccumulation. V(V) led to a significant increase of intracellular ROS in mycelia in the E-growth phase after 30 min, whereas this increase was lower in the other two age groups. Longer exposures (24 h) led to a greater increase in ROS in LE and S mycelia, indicating the highest antioxidant capacities of mycelia in the E phase, which was maintained due to high concentrations of non-enzymatic antioxidants such as GSH and phenolic compounds. In the S phase, GSH and peroxidases, namely POD and GPx, played the most important antioxidant role. The LE growth phase proved to be the most sensitive to the effects of V. The reduction capacity of the mycelium remained reduced even after 5 hours of treatment, and it is the only phase on whose viability V(V) had an inhibitory effect.

Exposure of microorganisms to stress leads to synthesis of lipids or carbohydrates, therefore, the relative content of biomacromolecules in the mycelia of *P. blakesleeanus* was determined using the FTIR method. Ageing of the mycelium was the main factor for the increase in lipid content in the biomass, but V(V) treatment also had a clear impact. The analysis of the lipid composition could give an indication of the potential usefulness of *P. blakesleeanus* for biodiesel or food/feed oils production.

Keywords: vanadate, oxidative stress, antioxidant defense, *Phycomyces blakesleeanus*, reactive oxygen species, biosorption, lipids, growth curve

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biophysics

Lista skraćenica

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

ADP - adenzin-difosfat

APS – amonijum persulfat

ATP- adenzin-trifosfat

BM - biomasa micelije

BSA - (Eng. Bovine Serum Albumin) - goveđi serum albumin

CAT- katalaza

CBB- Commassie Brilliant Blue

CDNB-1-hloro-2,4-dinitrobenzen

DCF- Dihlorofluorescein

DCFH-DA- Dihlorodihidrofluorescein diacetat

DNS - 3,5-Dinitrosalicilna kiselina

DTNB - 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

EDTA - Etilen diamin tetra sirćetna kiselina

EPR- (eng. Electron Paramagnetic Resonance) - elektron paramagnetna spektroskopija

FTIR - (eng. Fourier Transform Infrared Spectroscopy) - infracrvena spektroskopija sa Furijevom transformacijom

G6P- Glukoza-6-Fosfat

GLUT4 - (eng. Glucose transporter type 4) – transporter za glukozu tip 4

GPx - Glutation Peroksidaze

GR- Glutation Reduktaza

GST - Glutation Transferaza

ICP-OES – (eng. Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy) - optička emisna spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom

IR - (eng. infrared) - infracrveno zračenje

NADPH- Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat

NBT - Nitroblue Tetrazolium

NMR- (eng. Nuclear Magnetic Resonance) - nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija

PCA - (eng. Principal Component Analysis) - analiza glavnih komponenti

PMSF - fenilmetilsulfonil fluoride

POD - Peroksidaze

Polyp – (eng. Polyphosphate) - polifosfati

Ppm – (eng. Parts per million) – milioniti deo jedne celine

PUFA – (eng. Polyunsaturated Fatty Acid) - polinezasićene masne kiseline

RF- Radiofrekventni Opseg

RNS - (Eng. Reactive Nitrogen Species) - reaktivne azotne vrste

ROS - (Eng. Reactive Oxygen Species) - reaktivne kiseonične vrste

SOD - Superoksid Dismutaza

SP - (eng. Sugar Phosphate) - fosforilisani šećeri

TEMED - Tetrametiletilendiamin

TI – (eng. Tolerance Index) - indeks tolerancije

TNB - 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina

UN - (eng. unite) - jedinica

UV - (eng. ultraviolet) – ultraljubičasta svetlost

VIS – (eng. visible) – vidljiva svetlost

XRF- (eng. X-ray fluorescence) - rendgenska fluorescentna spektrometrija

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Gljive – položaj i uloga u ekosistemu	1
1.1.1. Primena gljiva.....	2
1.1.2. <i>P. blakesleeanus</i> kao predstavnik končastih gljiva.....	2
1.2. Reaktivne kisonične vrste i njihova uloga u ćelijima.....	3
1.2.1. Gljive i ROS	5
1.3. Oksidativni stres.....	6
1.3.1. Antioksidativni sistemi zaštite gljiva.....	7
1.3.2. Prelazni metali kao izazivači oksidativnog stresa i njihova toksičnost	10
1.4. Vanadijum	11
1.4.1 Rasprostranjenost u prirodi i primena.....	11
1.4.2. Hemija i biohemija vanadijuma.....	13
1.4.3. Uloga vanadijuma u živim sistemima i njegova primena kao terapeutika	15
1.4.4. Mehanizmi generisanja ROS od strane vanadijuma	16
1.4.5. Vanadijum i gljive	17
1.4.6. Vanadijum i <i>P. blakesleeanus</i>	17
2. Ciljevi	20
3. Materijal i metode.....	22
3.1. Eksperimentalni objekat	22
3.1.1 Gajenje na čvrstoj podlozi	22
3.1.2. Gajenje u tečnom medijumu.....	23
3.2. Kriva rasta micelije <i>P. blakesleeanus</i>	24
3.3. Određivanje koncentracije glukoze u medijumu.....	24
3.4. Priprema rastvora vanadata i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat	25
3.4.1. Priprema rastvora vanadata.....	25
3.4.2. Klijanje i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat.....	25
3.5. NMR spektar medijuma sa vanadatom	25
3.6. Postavka tretmana vanadatom i vijabilnost	26
3.7. Određivanje sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta.....	28
3.8. Priprema ekstrakata za enzimске eseje	28
3.9. Određivanje koncentracije proteina.....	30
3.10. Enzimski eseji.....	30
3.10.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza (POD) (EC 1.11.1.7).....	30
3.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) (EC 1.15.1.1)	30
3.10.3. Polarografsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT) (EC 1.11.1.6)	31

3.10.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) (EC 1.11.1.9)	31
3.10.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR) (EC 1.8.1.7)	32
3.10.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation S transferaze (GST) (EC 2.5.1.18)	32
3.11. Nativna elektroforeza i detekcija izoformi CAT i SOD	33
3.11.1. Detekcija izoformi CAT	33
3.11.2. Detekcija izoformi SOD	34
3.12. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka i koncentracije neenzimskih antioksidanasa	35
3.12.1. Ekstrakcija i određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka	35
3.12.2. Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnih fenola	36
3.12.3. Određivanje koncentracije glutationa	36
3.13. Određivanje sadržaja vanadijuma u micelijumu	37
3.14. Određivanje relativnog sadržaja lipida, proteina i ugljenih hidrata u micelijumu primenom infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom	38
3.15. Statistička analiza podataka	38
4. Rezultati	40
4.1. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima tokom rasta micelijuma <i>P. blakesleeanus</i> na pH=4,5	40
4.1.1. Aktivnost CAT	40
4.1.2. Aktivnost POD	42
4.1.3. Aktivnost SOD	42
4.2. Kriva rasta micelijuma gljive <i>Phycomyces blakesleeanus</i> na pH=6,7	43
4.3. Efekat vanadata na klijanje i rast <i>P. blakesleeanus</i>	44
4.3.1. NMR spektroskopija medijuma koji sadrži vanadat	44
4.4. Klijanje i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat	45
4.5. Vijabilnost	47
4.6. Određivanje sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta	48
4.7. Određivanje sadržaja neenzimskih antioksidanasa i aktivnosti enzima u micelijama <i>P. blakesleeanus</i> nakon tretmana vanadatom	51
4.7.1. Ukupna antioksidativna aktivnost uzorka	51
4.7.2. Aktivnost POD	53
4.7.3. Aktivnost CAT	53
4.7.4. Aktivnost SOD	55
4.7.5. Koncentracija ukupnog glutationa	55
4.7.6. Aktivnost GPx	56
4.7.7. Aktivnost GR	58

4.7.8. Aktivnost GST.....	59
4.7.9. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja	59
4.8. Određivanje sadržaja vanadijuma u micelijumu	61
4.9. FTIR analiza.....	62
5. Diskusija.....	67
6. Zaključci.....	76
7. Literatura	78

1. Uvod

1.1. Gljive – položaj i uloga u ekosistemu

Gljive predstavljaju brojnu i heterogenu grupu organizama koji su zahvaljujući američkom biologu Vitakeru, 1969. godine svrstane u posebno carstvo (Whittaker, 1969). Danas postoji više različitih klasifikacija i prema jednoj od njih gljive se mogu svrstati u devet različitih razdela: Opisthosporidia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Ascomycota i Basidiomycota, uz nekoliko grupa gljiva čiji taksonomski položaj, zbog nedovoljne izučenosti, još uvek nije potpuno jasan (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

Gljive su eukariotski organizmi, čije se telo najčešće sastoji od končastih struktura, koje se nazivaju hife i predstavljaju osnovne gradivne jedinice gljiva. Hife rastu vršno i mogu biti podeljene septama na segmente (septirane gljive), a mogu biti i neseptirane odnosno cenocitične. U zavisnosti od broja ćelija razlikujemo jednoćelijske gljive (kvasce) i višećelijske gljive, koje mogu biti filamentozne mikroskopske micelijarne gljive i makroskopske gljive, koja obrazuju plodna tela (Miles & Chang, 2004).

Ekološki gledano, gljive su najraznovidnija grupa živih organizama, koja može opstati u najrazličitijim ekološkim uslovima, na primer u prisustvu (aerobne) ili odsustvu kiseonika (anaerobne), a ima onih koje se prilagođavaju i mogu opstati u sredinama sa i bez kiseonika (fakultativno aerobne). Do danas je opisano oko 150.000 vrsta gljiva, iako se procenjuje da stvaran broj iznosi između 1,5 i 5 miliona, dok savremene metode DNK sekvenciranja ukazuju na moguću raznovrsnost od čak 11,7 do 13,2 miliona vrsta (Hyde, 2022).

Gljive nesumnjivo zauzimaju važno mesto u ekosistemu, pogotovo što učestvuju u različitim procesima, kao što su bioremedijacija i bioakumulacija. U prirodnim ekosistemima, saprotrofne gljive deluju kao razlagači organskih materija (opalo lišće, uginuli organizmi, ekskrementi itd), najčešće uz pomoć različitih enzima kojima razlažu jednostavnije, ali i složenije polimere, kao što su skrob, celuloza, hemiceluloza, pektin, hitin, lignin itd. (Baldrian, 2017). Zahvaljujući razlaganju organskih materija, gljive recikliraju velike količine ugljenika, kao i drugih hranljivih materija i obezbeđuju hranu kako za sebe tako i za biljke, čime dolazi do kruženja materije u prirodi (Baldrian, 2017). Osim saprotrofa, koji se hrane organskom materijom, gljive mogu biti i paraziti i simbionti (Miles & Chang, 2004). I paraziti i simbionti koriste hranljive materije iz domaćina, samo što paraziti štete domaćinu, dok su simbionti korisni za istog, odnosno u pitanju je obostrana korist. Tako određene vrste gljiva koje žive u zemljištu formiraju simbiotsku vezu sa korenima biljaka odnosno mikorizu (Miles & Chang, 2004; Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). Kod takve veze gljive dobijaju ugljene hidrate iz korena biljaka, dok domaćini, odnosno biljke dobijaju neorganske mineralne hranljive materije koje gljiva apsorbira iz zemljišta (Miles & Chang, 2004). Više od 90% kopnenih biljaka je u mikoriznim simbiozama (Volk, 2013) koje su ključne za život na planeti kakav danas poznajemo. S druge strane, gljive paraziti biljaka mogu prouzrokovati ogromnu štetu na usevima, pa čak dovesti i do nestašice hrane (Miles & Chang, 2004). Među parazitskim vrstama razlikuju se biotrofi, koji u bliskim interakcijama sa biljkama koriste hranljive materije iz živih tkiva i nekrotrofi koji dovode do nekroze tkiva biljke, a posledično i njene smrti i potom se hrane njenim hranljivim materijama (Doehlemann et al., 2017).

Mnoge gljive iz nekadašnjeg razdela Zygomycota su saprotrofi, koji prvi naseljavaju organske supstrate i u svojoj ishrani koriste proste šećere, pošto ne mogu razložiti složene polimere. Nakon molekularno-filogenetske analize, razdeo Zygomycota je rasformiran, i ove gljive su raspoređene u tri nova razdela: jedan čine parazitske gljive iz razdela Zoopagomycota, dok drugi i treći čine biljni simbionti i saprotrofi, odnosno gljive iz razdela Glomeromycota i Mucoromycota (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019).

1.1.1. Primena gljiva

Značaj gljiva ogleda se u njihovoj primeni u brojnim industrijskim granama. Kada se govori o **prehrambenoj industriji**, poznato je da gljive zauzimaju značajno mesto u ishrani ljudi, pogotovo u kineskoj kuturi. Njihova nutritivna svojstva se razlikuju u zavisnosti od vrste, a prinos zavisi od uslova sredine u kojima se uzgajaju. Promene optimalnih uslova gajenja (u pogledu zemljišta, temperature, vlažnosti) dovodi i do promena njihovog prinosa. Gljive su dobar izvor proteina, vitamina, vlakana, minerala i antioksidansa (Kozarski et al., 2015). Naime, one imaju sposobnost sinteze brojnih jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima, zbog čega se mogu koristiti u medicinske svrhe i ne postoji jasna granica između jestivih i terapijskih gljiva, jer mnoge jestive gljive mogu delovati protektivno i pozitivno na ljudsko zdravlje (Valverde et al., 2015). Danas se sve veći akcenat stavlja na korišćenje prirodnih antioksidansa, te ne čudi povećano interesovanje za gajenje micelija gljiva i izolaciju odgovarajućih jedinjenja.

U **farmaceutskoj industriji** značajno je korišćenje *Penicillium* vrsta za dobijanje antibiotika; *Penicillium chrysogenum* se najčešće koristi u industrijskoj proizvodnji penicilina, koji je neophodan za sintezu β -laktamskih antibiotika, koji se primenjuju širom sveta za lečenje bakterijskih infekcija (García-Rico et al., 2007).

Sa aspekta **poljoprivrede**, značajno je proučavanje biljnih patogena, odnosno fitopatogena. Fitopatogeni svojim delovanjem utiču na rast biljaka, samim tim i na prinos. Veliki problem za svetsko tržište hrane predstavlja njena kontaminacija mikotoksinima, a čak 25% svetske proizvodnje žita je ugroženo usled prisustva mikotoksina (Skoneczny, 2018). Mikotoksini su molekuli malih masa, koji su sekundarni metaboliti određenih vrsta gljiva i izuzetno su toksični. Jedan od najpoznatijih mikotoksina je aflatoksin koji produkuju *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* (Kumar et al., 2017). Sa druge strane, određene vrste mogu biti protektivne za biljke, kao na primer različite vrste iz roda *Trichoderma* koje mogu delovati kao biokontrolni agensi. U studiji Singa i saradnika (B. N. Singh et al., 2011) utvrđeno je da *Trichoderma harzianum* ima protektivno dejstvo pri infekciji korena suncokreta patogenom gljivom *Rhizoctonia solani*, pri čemu su uočene promene u sastavu i koncentraciji pro- i antioksidanasa u biljnim ekstraktima i ublaženi efekti infekcije u odnosu na biljku koja je bila izložena samo patogenu, što je ukazalo na potencijal za korišćenje *T. harzianum* kao biokontrolnog agensa. Određene vrste *Trichoderma* se mogu koristiti i za bioremedijaciju zemljišta zagađenih organofosfatnim pesticidima. Izlaganjem *Trichoderma atroviride* organofosfatnom pesticidu dolazi do indukovanja oksidativnog stresa i povećanja ekspresije proteina uključenih u antioksidativnu zaštitu (Tang et al., 2010).

Otpornost velikog broja gljiva prema različitim stresorima čini ih dobrim kandidatima za upotrebu u bioakumulaciji i bioremedijaciji, ne samo organskih zagađivača-pesticida, već i jona metala koji su široko rasprostranjeni zagađivači i uzročnici oksidativnog stresa.

1.1.2. *P. blakesleeanus* kao predstavnik končastih gljiva

Končaste gljive su heterogena grupa gljiva koja naseljava gotovo sve ekosisteme i naziv su dobile po svojim izduženim ćelijama - hifama, koje rastu kao filamenti, izduživajem vrha i formirajući micelijum. Ove gljive su izuzetno prilagodljive različitim uslovima sredine. Iako su često zanemarene i slabije proučavane u odnosu na kvasce, uočeno je da ove gljive imaju veliki komercijalni značaj. Zbog svog jednostavnog uzgoja, mogu se koristiti u biotehnološkim industrijama, odnosno za proizvodnju različitih proizvoda: od lekova do različitih enzima i organskih kiselina (Kim et al., 2007).

P. blakesleeanus je saprotrofna končasta gljiva, striktno aerobna, iz reda Mucorales, razdela Mucoromycota. Ovu filamentoznu gljivu karakteriše brz rast, kratak životni ciklus i velika produkcija

spora (Cerdá-Olmedo E., 1987). Čelijski zid je izgrađen od hitina i hitozana, a hife su cenocitične, odnosno bez septi. Može da se razmnožava polno i vegetativno. Do polnog razmnožavanja dolazi kada dođe do kontakta micelije dva „pola“ što dovodi do formiranja zigospore. Vegetativno razmnožavanje je češće i dešava se tako što se iz micelijuma razvijaju specijalizovane hife - sporangiofori. U normalnim uslovima, sporangiofora raste u visinu, pri čemu se na vrhu formira sporangija, loptasta struktura, koja je ispunjena sporama. Postoje mikro i makrosporangiofori, koji se razlikuju po veličini, ponašanju, kao i razvoju (Cerdá-Olmedo, 2001). Sama micelija je izgrađena od cilindričnih razgranatih hifa koje se mogu gajiti kao površinske kulture ili u aerisanom tečnom medijumu na šejkeru (Cerdá-Olmedo, 2001). Razvoj sporangiofora je moguće sprečiti primenom centrifugalne sile koja utiče na negativni gravitropski odgovor micelije, odnosno gajenjem micelije na šejkeru, čime se dobija i veća biomasa.

Više od jednog veka je *P. blakesleeanus* predmet interesovanja biologa i drugih naučnika, pre svega zbog gigantskih hifa – sporangiofora i njihovih izuzetnih karakteristika, dok je stadijum micelijuma u daleko manjoj meri ispitan. Max Delbrück i njegovi saradnici su koristili ovu gljivu kao model za ispitivanje fototropizma (Varjú et al., 1961), odnosno osobine da raste ka izvoru svetlosti. Različiti stimuli mogu dovesti do tropizma. Tako na primer vetar, plava svetlost i pritisak dovode do pozitivnog tropizma, dok gravitacija, UV zračenje i različite prepreke izazivaju negativni tropizam (Cerdá-Olmedo, 2001). Plava svetlost utiče na još jedan važan proces kod ove gljive, a to je sinteza β -karotena. Prag za fotokarotenogenezu (sintezu karotena indukovanu delovanjem svetlosti) je manji nego za fototropizam i to se objašnjava time što β karoten ima ulogu kao fotoprotektant (Cerdá-Olmedo, 2001).

Pored karotena *P. blakesleeanus* produkuje i velike količine galne kiseline, koja se u najvećim koncentracijama nalazi u sporangioforama. Produkcija galne kiseline zavisi od brojnih faktora, kao što su soj, sastav medijuma, svetlost i drugo (Rivero & Cerdá-Olmedo, 1994). I galna kiselina i β karoten su antioksidansi, a pored njih Baroja-Mazo i saradnici su uvideli da ova gljiva produkuje i D-eritroaskorbat i D-eritroaskorbat monoglukozid, koji imaju značajni antioksidativni potencijal (Baroja-Mazo et al., 2005). Pored toga, *P. blakesleeanus* se može smatrati oleaginoznom gljivom sa sadržajem lipida od 20-28% (Chenouda, 1970) koji u neutralnim pH uslovima može dostići i ~ 40% (Cerdá-Olmeda & Avalos, 1994) ali do sada nije bilo pokušaja da se *P. blakesleeanus* koristi za komercijalnu proizvodnju lipida. Zbog svega navedenog, kao i zbog jednostavnih uslova gajenja i relativno visokog prinosa biomase u laboratorijskim uslovima, ova gljiva se može potencijalno smatrati dobrim kandidatom za širu industrijsku upotrebu.

U industriji se međutim, najčešće koriste transformisani mikroorganizmi, a sa *P. blakesleeanus* do sada nije postignuta stabilna transformacija. Ovu prepreku je možda moguće zaobići primenom stresora subletalne koncentracije koji preusmerava metaboličke puteve u željenom smeru. Većina stresora ispoljava svoje delovanje kroz povećanje unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. reactive oxygen species - ROS), te je neophodno ispitati i sam antioksidativni kapacitet micelijuma *P. blakesleeanus* u odsustvu i prisustvu odabranog stresora.

1.2. Reaktivne kiseonične vrste i njihova uloga u ćelijama

Kiseonik je jedan od najvažnijih elemenata i čini skoro 21% zemljine atmosfere (Skoneczny, 2018) i jedan je od najzastupljenijih elemenata u zemljinoj kori (53,8%) (Halliwell & Gutteridge, 1985). Pojava kiseonika u atmosferi datira još od pre 2,2 milijarde godina i povećanje njegove koncentracije u istoj je dovelo do evolutivnih promena, pošto su prvi organizmi bili anaerobi, koji su morali da se prilagode novonastalim životnim uslovima (Halliwell & Gutteridge, 1985). Dok je povećana koncentracija kiseonika u atmosferi dovela do izumiranja velikog broja anaeroba, deo organizama je izbegao izumiranje povlačenjem u specifična staništa koja su ostala anoksična, dok je deo organizama razvio aerobni metabolizam (Halliwell & Gutteridge, 1985). Toksičnost kiseonika, pogotovo kod anaeroba, se

ogleda u oksidaciji važnih ćelijskih komponenti, različitih proteina, lipida i drugih važnih biomolekula (Imlay, 2002). Kiseonik, sam po sebi može delovati toksično i inaktivirati neke enzime anaeroba, kao na primer određene nitrogenaze (Gallon, 1981), ali najčešće njegova toksičnost potiče od toga što u prisustvu molekulskog kiseonika dolazi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta. ROS, takođe normalno nastaju i kao nus-produkti metabolizma aerobnih organizama i imaju signalnu ulogu, ali ukoliko se nađu u povećanoj koncentraciji, ili ukoliko ćelija nema sposobnost da uklanja ove molekule, oni dovode do oštećenja bioloških makromolekula. Bilo koji procesi u kojima O₂ učestvuje, bilo da se radi o respiraciji, oksidaciji organskih supstrata, redoks metaboličkim reakcijama ili reakcijama imunskog sistema mogu dovesti do nastanka ROS. Pod pojmom ROS podrazumevaju se sve vrste koje sadrže kiseonik i koje su reaktivne, bilo da jesu ili nisu radikali (Halliwell & Gutteridge, 1985; Skoneczny, 2018). Glavni izvor ROS u ćeliji su mitohondrije, a ROS nastaju i delovanjem različitih enzima među kojima su najvažnije NADPH oksidaze, ksantin oksidaze i mnoge druge oksidoreduktaze (Bindoli & Rigobello, 2013). Najvažnije ROS koje se proizvode u ćelijama su superoksid anjon radikal (O₂^{•-}), hidroksil radikal (•OH), singlet kiseonik (¹O₂) i vodonik peroksid (H₂O₂).

Superoksid anjon radikal (O₂^{•-}) može nastati u mitohondrijama tokom respiracije, gde se deo kiseonika (2 do 5%), ne redukuje u potpunosti (Belozerskaya & Gessler, 2007). Zbog svog negativnog naelektrisanja, on jedino putem anjonskih kanala može proći membranu, međutim u kiselim uslovima (pH<7) može da se protonuje, pri čemu nastaje hidroperoksid radikal (HO₂•), koji je slaba kiselina (Fridovich, 1978) i može pasivno difundovati kroz membranu-lipidni dvosloj. U ćeliji se O₂^{•-} veoma brzo neutrališe delovanjem superoksid dismutaza (SOD) pri čemu nastaje H₂O₂. Udruživanjem O₂^{•-} sa drugim radikalima i protonovanjem nastaju potentnije vrste (Skoneczny, 2018).

Hidroksil radikal (•OH) najčešće nastaje delovanjem UV zračenja na O-O vezu u H₂O₂ (O'Neill, 1987) ili Fentonovom reakcijom (Fridovich, 1998). Može nastati i ultrazvučno, odnosno sonikacijom vodenih rastvora (Riesz et al., 1990), a neki od brojnih načina njegovog nastanka, su prikazani u tabeli 1.2. Ono što je karakteristično za ovaj radikal je da je on izuzetno reaktivan, njegov poluživot je svega 10⁻⁹ s (Sies, 1993), a redoks potencijal •OH /H₂O iznosi + 2,32 V, što ga čini najjačim biološkim relevantnim oksidansom koji veoma brzo reaguje sa drugim jedinjenjima, poput DNK, proteina i lipida (Ransdell-Green et al., 2025). Potentnost •OH se smanjuje njegovom reakcijom sa drugim neradikalnim jedinjenjima, pri čemu nastaju novi, manje potentni radikali.

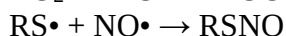
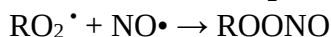
Tabela 1.2. Primeri nastanka hidroksil radikala (Folkes et al., 1995; Fridovich, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1985; O'Neill, 1987; Skoneczny, 2018).

Nastanak hidroksil radikala	
UV zračenje	$\text{H-O-O-H} \xrightarrow{UV} 2 \cdot\text{OH}$
Reakcija H ₂ O ₂ i jona metala	<u>Fentonova reakcija:</u> $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$ $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{2+} + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$ <u>Haber-Weiss-ova reakcija:</u> $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Fe}^{2+}} \text{O}_2 + \cdot\text{OH} + \cdot\text{OH}$
Jonizujuće zračenje	$\text{H-O-H} \xrightarrow{\gamma} \cdot\text{OH} + \text{H}\cdot$
Reakcija O ₂ ^{•-} i hipohlorne kiseline	$\text{HOCl} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Cl}^- + \cdot\text{OH}$

Singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$) nastaje enzimskom, termalnom, hemijskom ili fotohemijskom aktivacijom O_2 . On nije radikal, ali jeste izuzetno reaktivan oksidujući agens, koji veoma brzo oksiduje lipide, proteine i druge komponente unutar ćelija (Halliwell & Gutteridge, 1985).

Vodonik peroksid (H_2O_2) je među prvim opisanim ROS, koji je prisutan u fiziološkim uslovima u koncentraciji oko 1–100 nmol/L (Sigler et al., 1999). Pri fiziološkim pH on nije naelektrisan molekul i može nesmetano da se kreće kroz membrane. Zahvaljujući delovanju enzima koji učestvuju u njegovoj razgradnji kao što su katalaze i peroksidaze, u ćeliji se održava niska koncentracija (Sigler et al., 1999). Nastaje dismutacijom $\text{O}_2^{\cdot-}$, spontano ili delovanjem SOD (Herrero et al., 2008). Njegova toksičnost se ogleda u tome što u prisustvu jona metala, dolazi do njegove razgradnje i nastanka potentnog $\cdot\text{OH}$ (Fridovich, 1998).

Osim ROS u ćelijama dolazi i do nastanka **reaktivnih azotnih vrsta** (eng. reactive nitrogen species - **RNS**). Jedna od najjačnijih RNS jeste azotni monoksid radikal ($\text{NO}\cdot$). $\text{NO}\cdot$ je potentan radikal koji reaguje sa drugim radikalima kao što su $\cdot\text{OH}$, sa peroksil radikalom ($\text{RO}_2^{\cdot}$) i tiil radikalom ($\text{RS}\cdot$), pri čemu nastaju manje potentna jedinjenja (Halliwell & Gutteridge, 1985).



Jedna od važnijih interakcija $\text{NO}\cdot$ jeste sa $\text{O}_2^{\cdot-}$ pri čemu nastaje peroksinitril radikal, $\text{ONOO}\cdot$, koji je potentan oksidans. Sposobnost $\text{NO}\cdot$ da brzo reaguje sa drugim radikalima, može imati protektivne efekte *in vivo*, jer se na taj način reaktivne vrste međusobno poništavaju. Isto važi i za ROS, gde takođe reakcijom između dva radikala nastaju manje reaktivna jedinjenja.

Dugo je smatrano da su ROS zbog svoje reaktivnosti nepovoljne za ćeliju, a danas se zna da su oni značajni posrednici u redoks signalizaciji. Još je sredinom 19. veka švajcarski hemičar F. Šonbajn uvideo da je aktivacija O_2 , neophodna da bi se odigrali biološki oksidacioni procesi (Rubin, 2001). Pod pojmom redoks signalizacije podrazumevamo proces u kome ROS dovode do reverzibilne promene specifičnih proteina ili drugih jedinjenja u cilju regulacije različitih procesa (Bindoli & Rigobello, 2013). Kako bi ROS imali regulacionu ulogu, njihov nivo u ćelijama se mora odžavati u fiziološkim koncentracijama, odnosno u onoj koncentraciji koja omogućava normalno funkcionisanje organizma i ne nanosi mu štetu. Zbog svoje reaktivnosti i nespecifičnog delovanja, singlet kiseonik, kao i $\cdot\text{OH}$, nisu značajni za redoks signalizaciju. $\cdot\text{OH}$ je izuzetno potentan i veoma brzo reaguje sa različitim biomolekulima te se ne može smatrati dobrim signalnim molekulom, dok s druge strane $\text{O}_2^{\cdot-}$ može biti značajan u redoks regulaciji, a pogotovo H_2O_2 , koji slobodno prolazi ćelijsku membranu i pokazuje selektivnost u reakcijama sa biološkim molekulima (Bindoli & Rigobello, 2013) a nastaje dismutacijom $\text{O}_2^{\cdot-}$.

1.2.1. Gljive i ROS

Gljive su izuzetno heterogena grupa organizama, kod kojih, kao i kod ostalih eukariota, dolazi do formiranja ROS, koji mogu imati ulogu signalnih molekula. ROS regulišu različite fiziološke procese gljiva, kao što su germinacija, intracelularna komunikacija, razvoj, diferencijacija i drugo (Aguirre et al., 2005; Belozerskaya & Gessler, 2007; Skoneczny, 2018). Da li će ROS delovati kao signalni molekul ili toksično, zavisi pre svega od tipa, kao i koncentracije reaktivnih vrsta. U ćelijama gljiva najčešći izvor ROS su mitohondrije, gde nepotpuna redukcija kiseonika za vreme oksidativne fosforilacije dovodi do njihovog nastanka. Mitohondrije proizvode male, ali konstantne količine $\text{O}_2^{\cdot-}$, koji može imati ulogu signalnog molekula ili može da se razgradi i od strane mitohondrijalne SOD (Aguirre et al., 2005).

Drugi izvor ROS su NADPH oksidaze, koje proizvode $O_2^{\bullet -}$ u reakciji NADPH i O_2 . Ono što su Aguirre i suradnici uočili jeste da broj gena za NADPH oksidazu zavisi od složenosti građe same vrste, odnosno što je vrsta organizaciono složenija i formira kompleksnije morfološke strukture poput plodonosnog tela, to eksprimira više gena za NADPH oksidazu (Aguirre et al., 2005). Tako na primer kod *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* nije pronađen ni jedan, dok su kod *Magnaporthe grisea* i *Fusarium graminearum* pronađena tri gena za NADPH oksidaze (Aguirre et al., 2005). Pored NADPH oksidaza i drugi enzimi kao što su NO-sintaze i ksantin oksidaze, mogu dovesti do nastanka ROS, a takođe i autooksidacija malih molekula (Bindoli & Rigobello, 2013). Osim endogenih, uzrok formiranja ROS može biti dejstvo spoljašnjih (egzogenih) faktora. Pošto su kvasci i filamentozne gljive u bliskom kontaktu sa okruženjem, ne čudi to što brojni faktori mogu uticati na njihov razvoj, pa su oni razvili različite mehanizme kojima neutrališu i/ili smanjuju efekte stresora iz sredine u kojoj se razvijaju. Spoljni faktori koji mogu dovesti do produkcije ROS i samim tim do promena u rastu i razvoju ćelija gljiva, su brojni: promena pH zemljišta, promena temperature, mehanička oštećenja, promena u dostupnosti hranljivih materija, apsorpcija različitih metala i drugo (Skoneczny, 2018).

Sve dok se nivo ROS održava u fiziološkim granicama, omogućeno je nesmetano funkcionisanje ćelija odnosno hifa gljiva. ROS koji najčešće učestvuju u signalizaciji kod gljiva su H_2O_2 i $O_2^{\bullet -}$. H_2O_2 dovodi do aktivacije sinteze keratina kod *Neurospora crassa* (Gessler et al., 2008), dok kod gljive *Aspergillus nidulans* zajedno sa $O_2^{\bullet -}$ utiče na ekspresiju gena koji su važni za sporulaciju, sintezu amino kiselina, sintezu proteina koji su uključeni u transport i drugo (Pócsi et al., 2005). Promena u nivou ROS takođe predstavlja signal za formiranje spora, sintezu konidija i sintezu karotenoida kod *N. crassa* (Yoshida & Hasunuma, 2004), dok je prelazak *Dictyostelium discoideum* u narednu fazu razvoja praćen oslobađanjem $O_2^{\bullet -}$ (Bloomfield & Pears, 2003). Takođe, poznato je da ROS imaju direktnu ulogu u polnoj reprodukciji gljiva (Aguirre et al., 2005). Pored ROS i RNS mogu učestvovati u redoks signalizaciji, tako je poznato da $NO^{\bullet}$ učestvuje u sporulaciji kod *Physarum polycephalum* (Axelrod, 2001), a njegova produkcija je zabeležena i kod *D. discoideum* i *N. crassa* (Aguirre et al., 2005). Kod *P. blakesleeana* uočeno je da je neophodna aktivnost NO-sintaze, kako bi došlo do razvoja sporangiofora (Maier et al., 2001).

Određeni antioksidativni enzimi, takođe učestvuju u regulaciji različitih fizioloških procesa. Tako je aktivnost SOD povećana kod *Colletotrichum graminicola* tokom formiranja spora (Fang et al., 2002), dok je i kod *P. polycephalum* tokom jedne od faza razvoja takođe uočena povećana aktivnost ovog enzima (Allen et al., 1985). Povećane aktivnosti SOD su zabeležene i u stacionarnoj fazi razvoja kod *S. cerevisiae* (Longo et al., 1996), a i katalaze se mogu u različitom nivou ekspimirati tokom različitih faza razvoja gljiva (Aguirre et al., 2005).

1.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje u ćeliji kao rezultat poremećaja ravnoteže između prooksidanasa i antioksidanasa, odnosno kada se koncentracija ROS poveća toliko da prevazilazi antioksidativne kapacitete ćelija. ROS kao reaktivni molekuli oksiduju različite makromolekule, pre svega proteine, lipide i nukleinske kiseline (Halliwell & Gutteridge, 1985). Proteini su glavna meta ROS i njihova oksidacija može biti reverzibilna (redoks signalizacija), u kojoj učestvuju proteini koji sadrže tiol grupu, odnosno koji u svom sastavu imaju cistein i metionin; ili ireverzibilna. Ireverzibilna oksidacija proteina podrazumeva karbonilaciju proteina, oksidaciju različitih aminokiselina, nitraciju, stvaranje ditirozina, različitih intermedijera itd (Skoneczny, 2018). Te oksidativne promene mogu dovesti do agregacije, fragmentacije, oligomerizacije i degradacije proteina (Dahl et al., 2015). Pored proteina, lipidi su takođe izloženi oksidaciji i to najpre polinezasićene masne kiseline, u kojima oksidansi deluju na dvostruku vezu

između dva C atoma (Skoneczny, 2018). Ćelijske membrane, koje su bogate polinezasićenim masnim kiselinama, su često meta ROS i u njima dolazi do lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je proces oksidacije masnih kiselina od starne ROS, pre svega $\bullet\text{OH}$, koji je dovoljno reaktivan da ukloni proton u susedstvu dvostruke veze, pri čemu nastaju lipidni radikal i voda. Ovo dovodi do lančane reakcije, jer lipidni radikal reaguje sa O_2 i nastaje lipid hidroperoksil radikal ($\text{LOO}\bullet$) koji dalje reaguje sa nezasićenim masnim kiselinama. (Bai et al., 2003). Malondialdehid (MDA) je najčešće korišćeni marker lipidne peroksidacije membrana.

Nukleinske kiseline su stabilnije od proteina i lipida i njihova oksidacija je moguća delovanjem potentnijih radikala kao $\bullet\text{OH}$, dok H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne dovode do oksidacije nukleinskih kiselina. Guanin je najskloniji oksidaciji, od svih purinskih i piramidinskih baza i njegovom oksidacijom nastaje 8-okso-7,8-dihidroguanin, koji se može koristiti kao marker oksidativnog oštećenja nukleinskih kiselina (Skoneczny, 2018).

Od pomenutih makromolekula 70% oksidacija se dešava na proteinima, a izmenjeni proteini se moraju ukloniti iz ćelije ili autofagijom ili uz pomoć proteazoma, kako bi se omogućilo dalje nesmetano funkcionisanje ćelija (Dahl et al., 2015). Ukoliko ćelija ne uspe da uspostavi ponovnu ravnotežu između prooksidansa i antioksidanasa i ne oporavi se od pretrpljenih promena, dolazi do njene smrti.

Gljive, kao i svi organizmi, se suočavaju sa oksidativnim stresom koji može biti manje ili više izražen - zavisno od brojnih faktora. Pre svega zavisi od samog stresora, odnosno njegovog delovanja (intenzitet/koncentracija, dužine delovanja, itd), a i od vrste gljive i odgovora njenog antioksidativnog sistema.

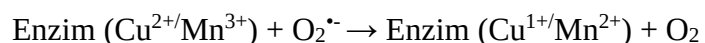
1.3.1. Antioksidativni sistemi zaštite gljiva

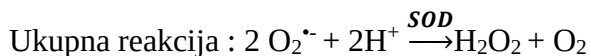
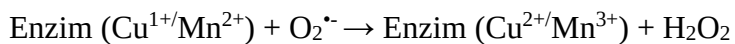
Kako ne bi došlo do razvoja oksidativnog stresa značajnu ulogu imaju antioksidativni sistemi zaštite. Delovanje oksidanasa se može sprečiti na različite načine, bilo delovanjem enzima ili neutralizacijom, odnosno vezivanjem i/ili oksidacijom drugih molekula, čime se sprečava oksidacija ciljanih molekula. Pod pojmom antioksidansa se podrazumeva bilo koja supstanca koja sprečava, odlaže i otklanja oksidativna oštećenja ciljanog molekula (Halliwell & Gutteridge, 1985). Ne postoji jedan savršeni antioksidans i nesmetano funkcionisanje organizama zavisi od brojnih enzima i neenzimskih jedinjenja koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani.

Najznačajniji enzmi koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani su SOD i katalaze, kao i različiti tipovi peroksidaza (glutation peroksidaze, tiol peroksidaze i druge).

SOD (EC 1.15.1.1) je metalo-protein, odnosno enzim koji u svom aktivnom centru sadrži metal. U zavisnosti od vrste metala, koji imaju ulogu katalizatora, razlikujemo različite forme SOD; tako postoje FeSOD, MnSOD i CuZnSOD (Bai et al., 2003). CuZnSOD je izolovana još 1938. godine iz krvi govečeta, kao protein koji sadrži bakar (Cu), a 1969. McCord i Fridovich su uvideli da ovaj protein deluje kao enzim (McCord & Fridovich, 1969). Danas se zna da je prisutna kod gotovo svih eukariota. Kod životinja je lokalizovana u citosolu, ali se može naći i u lizozomima, jedru i u prostoru između spoljašnje i unutrašnje mitohondrijalne membrane (Halliwell & Gutteridge, 1985). MnSOD je pronađena kod životinja, gljiva i biljaka i uglavnom je veliki protein, lokalizovan u mitohondrijama (Fridovich, 1995). FeSOD nije pronađena kod životinja, ali jeste prisutna kod brojnih bakterija, nekih algi i viših biljaka (Halliwell & Gutteridge, 1985).

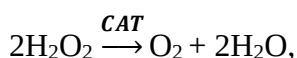
Kod gljiva je opšte prihvaćeno da se CuZnSOD nalazi u citosolu, dok se MnSOD nalazi u mitohondrijama (Ito-Kuwa et al., 1999). Uloga SOD se ogleda u dismutaciji $\text{O}_2^{\bullet-}$, pri čemu nastaje H_2O_2 .





Ova reakcija je specifična i brza, čime se omogućava brzo uklanjanje $\text{O}_2^{\bullet-}$ i nesmetano funkcionisanje ćelije. Ekspresija SOD je različita i razlikuje se između vrsta. Kao što je napomenuto SOD može imati ulogu u redoks signalizaciji, a smatra se da je O_2 glavni regulator njegove ekspresije (Aguirre et al., 2005; Bai et al., 2003). Pored O_2 , prisustvo bakra i drugih metala, ali takođe i uslovi u kojima se gljiva razvija, kao što je dostupnost ugljenika/drugih nutrijenata utiču na ekspresiju SOD (Gralla & Kosman, 1992). Tako na primer, *Candida albicans* pod određenim uslovima rasta eksprimira citosolnu MnSOD (Lamarre et al., 2001). Takođe, uslovi rasta gljive mogu uticati na udeo aktivnosti MnSOD i CuZnSOD. Kod gljive *Dactylium dendroides*, udeo aktivnosti MnSOD iznosi 20%, dok je udeo aktivnosti CuZnSOD 80%, ali u nedostatku bakra, dolazi do povećane sinteze MnSOD kako bi se nadomestila ukupna aktivnost SOD, a novonastala MnSOD se javlja u citosolu (Shatzman & Kosman, 1979).

Nastali H_2O_2 , kao rezultat delovanja SOD, se iz ćelija uklanja uz pomoć **katalaza (CAT)** i **peroksidaza (POD)**. Katalaze su enzimi koji katalizuju disproporcionaciju dva H_2O_2 na O_2 i H_2O ,



dok su peroksidaze enzimi koji razlažu H_2O_2 do H_2O , pri čemu oksiduju drugi supstrat



Katalaze (EC 1.11.1.6) pripadaju grupi hem peroksidaza. Kod životinja su katalaze tetrameri, gde svaki monomer sadrži Fe^{3+} u okviru hema (Reid et al., 1981). Katalaze gljiva su takođe homotetrameri koji su izgrađeni iz dva homodimera, pri čemu i dimer i tetramer imaju katalitičku aktivnost, dok su monomeri neaktivni (Hansberg et al., 2012). Interesantna karakteristika katalaza je da ne prate Michaelis-Mentenovu kinetiku i da do saturacije ne dolazi čak ni pri visokim koncentracijama H_2O_2 (Switala & Loewen, 2002). Kod kvasaca se razlikuju dva izoenzima CAT, CAT T koja se nalazi u citosolu i CAT A koja se nalazi u peroksizomima i mitohondrijama (Ventsislava Y Petrova 1, Diane Drescher, Anna V Kujumdzieva, 2004). Nekoliko gena za CAT je otkriveno kod *Aspergillus nidulans* (cat A–D) (Kawasaki & Aguirre, 2001), a takođe i kod *Neurospora crassa* (CAT 1-3) (Michán et al., 2002), koji se ekspimiraju u različitim uslovima i u različitim odeljcima ćelija. Kao i SOD i one se ekspimiraju u različitim fazama razvoja gljiva. Postojanje značajnog broja različitih izoenzima ukazuje na veliku sposobnost filamentoznih gljiva za razgradnju H_2O_2 (Bai et al., 2003).

Peroksidaze (EC 1.11.1.X) predstavljaju veliku familiju oksidoreduktaza koje katalizuju razgradnju različitih peroksida, najčešće H_2O_2 , uz oksidaciju organskog ili neorganskog supstrata (De Oliveira et al., 2021). Peroksidaze su podeljene na dve velike grupe – hem peroksidaze, koje kao prostetičnu grupu sadrže hem i ne-hem peroksidaze koje nemaju prostetičnu grupu. Hem peroksidaze su daleko brojnije i zastupljenije u živim organizmima, u aktivnom centru sadrže hem u visoko konzerviranom aminokiselinskom okruženju i imaju jedinstven mehanizam katalize. Ova grupa peroksidaza obuhvata dve suprefamilije: peroksidaze-ciklooksigenaze i peroksidaze-katalaze, koje su najzastupljenije i obuhvataju klase I, II i III. Klasa I obuhvata citohrom c peroksidazu kvasaca, askorbat-peroksidaze i bakterijske peroksidaze-katalaze, dok je klasa II peroksidaza pretežno zastupljena među gljivama i obuhvata lignin i mangan peroksidaze (Marcel Zamocky, 2010).

Klasa III peroksidaza predstavlja veoma dobro proučene biljne peroksidaze koje katalizuju oksidaciju širokog spektra supstrata uz potrošnju vodonik peroksida, a kao supstrate mogu da koriste različite organske molekule - fenole, aromatične amine, policiklične aromatične ugljovodonike (De Oliveira et

al., 2021). Za kvantifikaciju i karakterizaciju aktivnosti peroksidaza klase III najčešće se kao supstrati koriste gvajakol i pirogalol koji omogućavaju spektrofotometrijsko praćenje reakcije. Različite izoforme peroksidaza mogu pokazivati različite kinetičke karakteristike sa ovim supstratima, što je od pomoći pri karakterizaciji enzima, naročito kada se planira primena u industriji. Peroksidaze se koriste uglavnom u industriji papira i tekstilnoj industriji kao izbeljivači, kao i u tretmanu otpadnih industrijskih voda.

Peroksidaze koje u svom aktivnom centru ne sadrže hem, već tiol ili selenol, imaju drugačiji mehanizam katalize, a struktura aktivnog mesta omogućava korišćenje različitih supstrata. Ova grupa peroksidaza obuhvata veći broj familija enzima (Koua et al., 2009). Kod biljaka je utvrđeno prisustvo samo za tiol peroksidaze, koje obuhvataju mnoge enzime značajne za održavanje redoks homeostaze i redoks signalizaciju: glutathion peroksidaze, peroksiredoksine i tioredoksin peroksidaze (Bela et al., 2022).

GPx su prvo otkrivene u životinjskim tkivima 1957. godine, gde su veoma rasprostranjene i do danas je poznato najmanje četiri različita tipa ovog enzima (Halliwell & Gutteridge, 1985). Ove peroksidaze su takođe otkrivene i u biljkama, nekim aerobnim bakterijama i gljivama. Dok sisari poseduju GPx izoforme koje u aktivnom centru imaju visoko reaktivni selenocistein i izoforme koje imaju cistein, kod biljaka i gljiva nisu do sada otkrivene forme sa selenocisteinom, već se u aktivnom centru nalazi uvek cistein (do Carmo Santos et al., 2025; Missall et al., 2005). Kod *S. cerevisiae* su pronađena tri gena, homologna animalnim, koji kodiraju GPx (Belozerskaya & Gessler, 2007). Pored glutathion peroksidaza važnu ulogu u ćelijama gljive imaju i drugi proteini sa peroksidaznom aktivnošću, kao što su tioredoksini, glutaredoksini, peroksiredoksini i sulforedoksini, čije je prisustvo potvrđeno u brojnim vrstama eukariota i prokariota. To su proteini male molekulske mase, koji u svom sastavu sadrže jednu ili više SH grupa cisteina, zahvaljujući kojoj reaguju sa ROS (Belozerskaya & Gessler, 2007). Peroksiredoksini redukuju hidroperoksido do alkohola, dok glutaredoksini učestvuju u reakcijama redukcije glutathiona u prisustvu NADPH od strane glutathion reduktaze (Herrero et al., 2008). U kvascima i filamentoznim gljivama, ovi proteini su široko rasprostranjeni i imaju važnu antioksidativnu ulogu.

Pored pomenutih enzima, kod gljiva su izuzetno značajni i neenzimski antioksidansi u koje se ubrajaju različita jedinjenja. Kvasci i gljive sadrže brojne antioksidanse, kao što su: trehaloza, glutathion (GSH), karotenoidi, melanini, ubihinon, L-askorbinska kiselina (vitamin C), tokoferol (vitamin E), fenoli i drugi (Dawes, 2002; Gessler et al., 2007).

Glutathion u redukovanom obliku (GSH) je jedan od najvažnijih nenezimskih antioksidanasa kod kvasaca i filamentoznih gljiva. Može reagovati sa brojnim ROS, kao što su $\bullet\text{OH}$, $\text{RO}_2^\bullet$, $\text{RO}^\bullet$, $^1\text{O}_2$, HOCl , ali i sa RNS, pri čemu se može formirati tiol radikal ($\text{GS}^\bullet$), koji se dalje može neutralizovati, ako stupi u reakciju sa drugim $\text{GS}^\bullet$ pri čemu nastaje GSSG, ili u reakcijama sa drugim aktivnim vrstama, pri čemu nastaju novi manje ili više potentni radikali (Halliwell & Gutteridge, 1985). S-tiolacija proteina smatra se važnim antioksidativnim procesom, jer se sprečava ireverzibilno i nasumično oštećenje enzima formiranjem S-S veza (Halliwell & Gutteridge, 1985). Takođe, glutathion može reagovati sa produktima lipidne peroksidacije i na taj način delovati protektivno (Gupta et al., 1999; Turton et al., 1997). Glutathion je tripeptid, koji sadrži -SH grupu koja učestvuje u redoks reakcijama. GSH se sintetise u citosolu, gde je i lokalizovan, i upravo ta rezerva glutathiona, predstavlja prvu liniju odbrane, kada se deluje nekim egzogenim oksidansom. Takođe, ima ga i u mitohondrijama i smatra se da su te rezerve (eng. "pool"), značajne za normalno funkcionisanje mitohondrija (Gostimskaya & Grant, 2016). Formiranjem veze između dva GSH molekula nastaje glutathion disulfid odnosno oksidovana forma (GSSG) glutathiona. Koncentracija GSH u kvascima iznosi oko 2–10 mM (Penninckx, 2002), dok je GSSG zastupljena u mnogo manjoj koncentraciji, oko 4 μM (Østergaard et al., 2004). Odnos GSH/GSSG kod kvasaca varira između 30 i 100, što svakako ukazuje na veći sadržaj GSH u ćelijama, u odnosu na GSSG (Schafer & Buettner, 2001) i ovaj odnos se u ćelijama održava zahvaljujući delovanju enzima glutathionskog sistema, pre svega pomenutih GPx i glutathion reduktaza (GR). GSH se može oksidovati nenezimski ili enzimski

u reakciji koju katalizuju GPx, ako su oksidansi H_2O_2 ili organski hidroperoksidi, pri čemu nastaje GSSG, koji se delovanjem GR redukuje nazad do GSH. GSH ima veliki značaj u uklanjanu ksenobiotika, koji se mogu samostalno vezati za SH grupu ili pak enzimski u reakciji koju katalizuje glutathion S transferaza (GST), a nastali konjugati se transportuju ili u vakuole ili van ćelije (Ządziński et al., 1996). Pošto je GSH jedan od glavnih antioksidanasa kod gljiva (Kobayashi et al., 2002; Pócsi et al., 2004) i njegova koncentracija je značajno veća od GSSG, uglavnom kad se govori o smanjenju ukupnog glutathiona misli se na smanjenje GSH.

Fenolna jedinjenja predstavljaju veliku i raznovrsnu grupu sekundarnih metabolita koji pokazuju značajne biološke aktivnosti: antitumorsku, protivupalnu, antioksidativnu, antimikrobnu i druge (Abdelshafy et al., 2022). Ona mogu biti jednostavnije ili složenije strukture i mogu se svrstati u više grupa, među kojima su najznačajnije fenolne kiseline i flavonoidi. Među fenolnim kiselinama najčešće identifikovanim kod gljiva ubrajaju se p-hidroksibenzojeva, p-kumarinska, cimetna, protokatehinska i galna kiselina (Alkan et al., 2020), dok se od flavonoida posebno izdvajaju naringenin, hesperetin, kempferol i kvercetin (Abdelshafy et al., 2022).

Povećana sinteza fenolnih jedinjenja je kod gljiva indukovana različitim faktorima spoljašnje sredine, kako stupanjem u interakcije sa biljkama, tako i različitim stresnim faktorima. U antioksidativnom metabolizmu imaju značajnu ulogu u neutralizaciji ROS čime sprečavaju ili ublažavaju oksidativni stres (Dinesh, 2021).

1.3.2. Prelazni metali kao izazivači oksidativnog stresa i njihova toksičnost

Većina prelaznih metala se može svrstati u generatore radikala, s obzirom na njihovu sposobnost da prime ili otpuste elektron (Halliwell & Gutteridge, 1985). Brojne studije ukazuju da metali poput gvožđa, bakra, kadmijuma, hroma, žive, nikla i vanadjuma mogu izazvati oksidativni stres (Valko et al., 2005). Prisustvo ovih metala može dovesti do produkcije ROS i drugih toksičnih metabolita i/ili dovesti do inaktivacije enzima i utroška neenzimskih antioksidanasa male molekulske mase. Za metale kao što su gvožđe, hrom, kobalt, vanadijum i nikl se zna da produkuju ROS, putem Fentonove reakcije, dok za metale poput žive, arsena i kadmijuma se zna da njihovo vezivanje za SH grupe proteina i glutathiona može dovesti do nastanka oksidativnog stresa (Valko et al., 2005). Delovanje prelaznih metala, može dovesti i do lipidne peroksidacije, oštećenja DNK, karboksilacije proteina, narušavanja homeostaze kalcijuma i drugih promena (Stohs & Bagchi, 1995). Metali utiču na brojne signalne puteve u organizmu, oksidujući različite regulatorne i signalne proteine, koji učestvuju u rastu ćelija, regulaciji ćelijskog ciklusa, ćelijskoj diferencijaciji, reparaciji DNK i apoptozi (Valko et al., 2005).

Toksičnost metala zavisi od njegovih osobina, poput rastvorljivosti, apsorptivnosti, hemijske reaktivnosti, načina transporta i kompleksa koje formiraju u organizmu (Stohs & Bagchi, 1995).

Gljive imaju izuzetnu sposobnost da interaguju sa metalima u životnoj sredini, čime značajno utiču na njihovu bioraspoloživost i biogeochemijske cikluse. One produkuju organske kiseline i druga jedinjenja, kojima učestvuju u biotransformaciji metala i minerala (Y.-H. Xu et al., 2019), a osim toga određene vrste poseduju sposobnost bioakumulacije metala, što ih čini i potencijalnim kandidatima u procesima bioremedijacije zagađenih staništa (Ceci et al., 2012, 2015; Y.-H. Xu et al., 2019). Posebno su značajne mikorizne gljive, koje u simbiozi sa biljkama, omogućavaju prenos esencijalnih, ali i toksičnih metala iz zemljišta u biljne ćelije (Gutjahr et al., 2015; Kapahi & Sachdeva, 2017). Za mnoge gljive, metali su neophodni mikronutrijenti, ali njihove visoke koncentracije i različite strukturne forme mogu delovati nepovoljno na isti, a posledično dovesti i do smrti ćelija gljiva (Das et al., 2009).

Toksičnost metala kod gljiva se ogleda u onemogućavanju normalnog funkcionisanja ćelija, tako što se vezuju za funkcionalne grupe biološki važnih molekula, poput enzima i transportnih proteina, gde dolazi

do zamene esencijalnih metala u aktivnim centrima enzima usled kompeticije sa metalima kojima je gljiva izložena, pa čak i do ruptura ćelijskih membrana i membrana organela (Das et al., 2009; G. M. Gadd, 1993). Delovanjem peroksida nastalog u procesu transformacije jona metala, može doći do lipidne peroksidacije i narušavanja njihovog integriteta (G. M. Gadd, 1993). Osim toga može doći i do nastanka drugih ROS i niza promena u pogledu inaktivacije enzima i snižavanja koncentracije neezimskih antioksidanasa (De Castro et al., 2013; Michalak, 2006), što dalje dovodi do promena u rastu (Knauert & Knauer, 2008) i drugih promena.

Odgovor hifa gljive na prisustvo viška metala zavisi pre svega od njenih biohemijskih i strukturnih osobina, fiziološke i/ili genetske adaptacije, kao i same životne sredine koja utiče na oblik prisutnih metala, njihovu dostupnost i toksičnost (G. Gadd, 1992). Kako bi prevazišle toksičnost metala, gljive su razvile različite mehanizme, kao što su vanćelijsko vezivanje metala, vezivanje metala za ćelijske zidove, vezivanje za proteine, taloženje itd (Fomina et al., 2005; G. M. Gadd, 1993).

1.4. Vanadijum

1.4.1 Rasprostranjenost u prirodi i primena

Vanadijum (V) je prelazni metal, koji se nalazi u 5B grupi periodnog sistema. Otkriven je 1801. godine, od strane naučnika Andres Manuel del Ria, koji je pronašao ovaj element u smeđoj olovnoj rudi, za koju se danas zna da je mineral vanadinit ($Pb_5[VO_4]_3Cl$). Element je najpre nazvao panhromijum (što znači „sličan hromu“), a kasnije je ime promenio u eritronijum, od grčke reči „*erythros*“ što znači crveno, jer je uvideo da većina soli (izdvojenih iz minerala), kada se zagreva postaje crvene boje (Cardarelli, 2000). Međutim, del Rio nije dobio zaslužen priznanje za svoje otkriće, jer se smatralo da je u pitanju nečisti hrom, te je vanadijum „ponovo“ otkriven 1830. godine, od strane naučnika Sefstroma, koji mu je i dodelio današnje ime, koje potiče od imena skandinavskog boga lepote Vanadisa (Moskalyk & Alfantazi, 2003). Naziv vanadijum je dat zbog niza upadljivih i lepih boja, koje se javljaju sa promenom oksidacionog stanja. Tako je u vodenim rastvorima V(II) ljubičaste boje, dok je V(III) zelene, V(IV) plave, a V(V) žute boje.

Vanadijum je široko rasprostranjen element, prisutan u vodi, zemljištu i vazduhu. Drugi je najzastupljeniji metal u morskoj vodi, iza molibdena, sa koncentracijom od 30 nM (Rehder, 2008b). Prisutan je takođe i u slatkim vodama, podzemnim vodama i vodi za piće, gde njegova koncentracija iznosi 10 nM (Rehder, 2015), dok u vodama u vulkanskim oblastima, njegova koncentracija može dostići i 2,5 μ M (Rehder, 2015). Zajedno sa drugim metalima sa toksičnim efektom prisutan je u zemljištima vulkanskog porekla (Ceci, et al., 2012). Jedinjenja vanadijuma su široko rasprostranjena u Zemljinoj kori, gde ovaj element zauzima 22. mesto po zastupljenosti (Mukherjee et al., 2004), sa prosečnom koncentracijom od 100 mg/kg (Rudnick & Gao, 2003). Nalazi se u oko 152 različita minerala (Cardarelli, 2000), a posebno je prisutan u uljnim škriljcima i sirovoj nafti, u obliku VO^{2+} -porfirinskih kompleksa, a njegova koncentracija može dostići i do 0,12% (Rehder, 2015). Poreklo vanadijuma u sirovoj nafti najčešće se vezuje za proces ekstrakcije iz uljnih škriljaca, koji predstavljaju osnovnu sirovinu u industrijskoj proizvodnji nafte. Vanadijum i nikl su dva najzastupljenija metala u nafti, čije koncentracije mogu dostići i do 1.600 mg/kg (za V), odnosno 340 mg/kg (za Ni) (Barwise, 1990). Visoke koncentracije vanadijuma zabeležene su i u ugljenom pepelu, gde mogu dostići do 0,7 g/kg suvog materijala (Rehder, 2015).

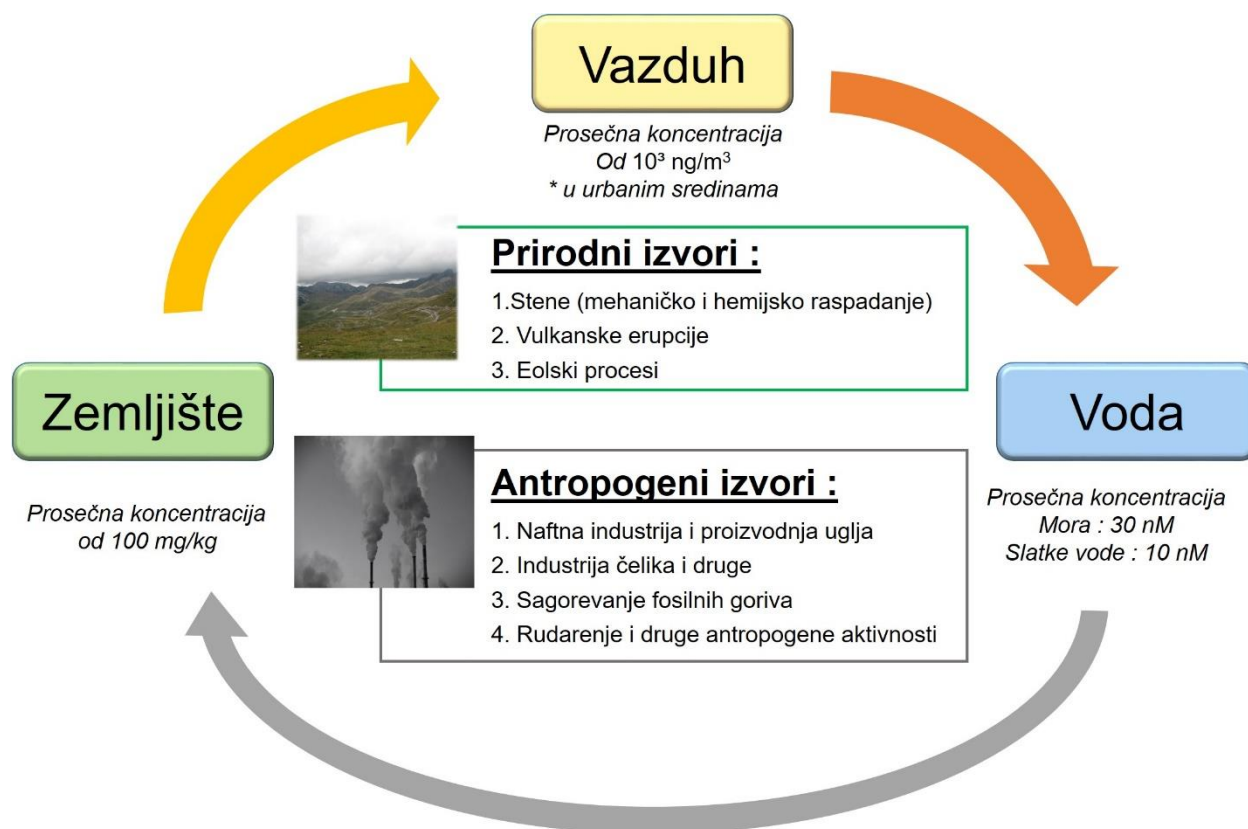
Sadržaj vanadijuma u hrani je direktno povezan sa njegovom koncentracijom u zemljištu (Priya et al., 2006). Iako nije prisutan u velikim koncentracijama, vanadijum se može naći u mnogim namirnicama, u

žitaricama, ribi, voću i povrću, gde njegov sadržaj može biti i viši od 40 µg/g, a posebno bogate namirnice su pečurke i školjke (Barceloux and Barceloux 1999).

Ljudi su izloženi vanadijumu i udisanjem aerosola u urbanim sredinama, gde sadržaj vanadijuma može dostići do 10^3 ng/m³, što je dva do tri puta više nego u ruralnim područjima (Rehder, 2015). Glavni izvor ovakvog zagađenja je nepotpuno sagorevanje fosilnih goriva, pri čemu nastaju vanadijum-oksidi koji se vezuju za čestice prašine i dospevaju u disajne puteve. Radnici koji su profesionalno izloženi vanadijumu su pod zdravstvenim rizikom, jer čestice vanadijuma mogu da prodru duboko, do plućnih alveola (Z. Zhang et al., 2001) i da dovedu do akutnih i/ili hroničnih oboljenja.

Zahvaljujući svojim jedinstvenim fizičko-hemijskim osobinama, posebno sposobnosti da poveća čvrstoću i otpornost materijala, vanadijum se danas koristi u metalurgiji, energetici i hemijskoj industriji. Vanadijum, najčešće u obliku ferovanadijuma, se koristi u proizvodnji čelika i čeličnih legura, gde i male količine vanadijuma povećavaju tvrdoću i čvrstoću čelika (K. Yadav et al., 2014). U hemijskoj industriji se koristi kao industrijski katalizator, a takođe ima primenu i u tekstilnoj industriji gde se koristi kao fiksator boje u bojenju i štampanju tkanina (Cardarelli, 2000). Postojanje vanadijuma u 4 oksidativne forme i njihova senzitivnost na promene u karakteristikama rastvora u kojem se nalaze predstavljaju značajan kapacitet u korišćenju različitih oblika jednog elementa u proizvodnji baterija, kao alternativa litijum-jonskim baterijama (Schlesinger et al., 2017) i proizvodnji superprovodnih magneta (vanadijum-galijum trake) (Cardarelli, 2000). Vanadijum ima značaj i u avio industriji, pošto se dodaje titanijumu, kako bi poboljšao njegova svojstva. Od ukupno proizvednog vanadijuma, 85% se koristi u proizvodnji čelika, 10% se koristi za legure titanijuma, a preostalih 5% u druge svrhe (Cardarelli, 2000).

Iako je široko rasprostranjen, vanadijum nije još prepoznat kao značajan zagađivač, ali povećana upotreba nafte, bitumena i drugih naftnih derivata, kao i uglja i petrol koksa, dovodi do povećanja njegove koncentracije u životnoj sredini. Tako su Šlesinger i saradnici u svojoj studiji zaključili da kada se govori o antropogenim izvorima, proizvodi od nafte čine najveći globalni izvor vanadijuma (56%), zatim sledi ugalj (26%) i rudarenje vanadijuma (18%). Prirodni izvori vanadijuma su stene, gde njihovim mehaničkim i hemijskim raspadanjem dolazi do oslobađanja vanadijuma, čime se omogućava njegov ulazak u zemljište, površinske i podzemne vode, dok manji deo vanadijuma dospeva u životnu sredinu putem vulkanskih erupcija i eolskih procesa (Schlesinger et al., 2017) (slika 1.4.1).

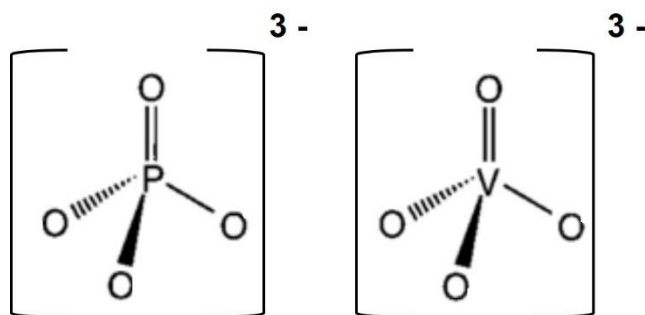


Slika 1.4.1. Izvori vanadijuma i njegova zastupljenost u životnoj sredini.

1.4.2. Hemija i biohemija vanadijuma

U prirodi se vanadijum nalazi u različitim jedinjenjima i u oksidacionim stanjima od -1 do +5, među kojima su od biološkog značaja +4 (najčešće u formi oksida -vanadila) i +5 (vanadat), a u manjoj meri i +3. U fiziološkim uslovima su najčešći oblici vanadatni anjoni (H_2VO_4^- i HVO_4^{2-}) i vanadilni katjon (VO_2^+) (Rehder, 1992). Fiziološki najstabilniji vanadat - V(V) privlači naročitu pažnju zbog izraženih metaboličkih efekata u mnogim živim sistemima (Aureliano, 2016), a njegova biološka aktivnost je u korelaciji sa njegovim oligomernim oblikom. U zavisnosti od pH, koncentracije i jonske jačine, V(V) je prisutan najčešće kao monomer, dimer ili tetramer (Rehder, 2008a).

Vanadijum (IV), u prisustvu različitih oksidanasa se lako oksidiše u vanadijum (V) (Zhang et al., 2001), tako da se može reći da je **vanadat** najrasprostranjeniji oblik ovog elementa u prirodi. Najvažnija osobina vanadatnog anjona je njegova sličnost sa fosfatnim anjonom, u pogledu naelektrisanja i strukture. Upoređivanjem strukture fosfata i vanadata, najviše sličnosti se uočava kod tetraedarskih struktura, odnosno troanjonskih oblika, VO_4^{3-} i PO_4^{3-} (slika 1.4.2.1), dok slične vrednosti pK za vanadat (3,5; 7,8 i 12,5) i fosfat (2,1; 7,2 i 12,7) ukazuju na njihove slične elektronske osobine (Crans et al., 2004).



Slika 1.4.2.1. Prikaz strukture monomera fosfata i vanadata, odnosno anjonskih oblika, PO_4^{3-} i VO_4^{3-} .

Zahvaljujući strukturnoj analogiji sa fosfatima, vanadati mogu uticati na određene fiziološke procese, pre svega delujući na enzime koji učestvuju u metabolizmu fosfata kao i one čija aktivnost je regulisana fosforilacijom/defosforilacijom. Mehanizmi delovanja vanadata su višestruki (Rehder, 1992):

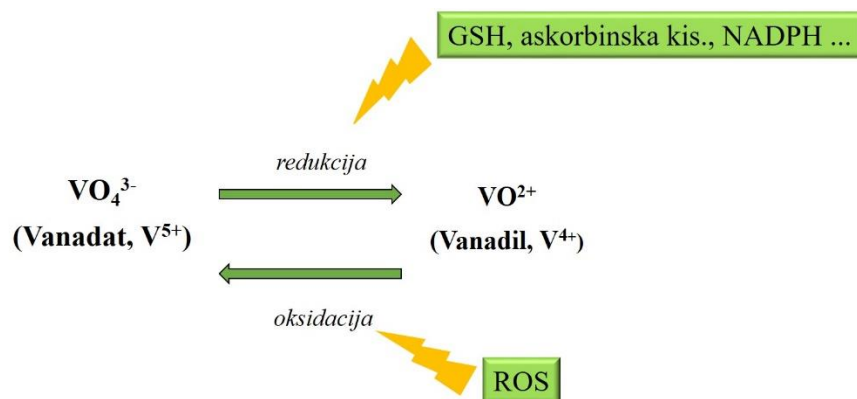
- 1) Vanadat može dovesti do inhibicije fosforilacije enzima vezivanjem za njih umesto fosfata. Petoligandni fosfor postoji samo u prelaznim stanjima visoke energije, dok vanadijum lako formira stabilne komplekse u oktaedarskoj ili bipiramidalnoj simetriji. Kada se jednom ugradi u aktivno mesto fosfat-zavisnog enzima zauzimajući mesto fosfata, aktivnost tog enzima može biti trajno inhibirana (Costa Pessoa et al., 2015).
- 2) Vanadat i njegova jedinjenja, mogu biti prepoznati od strane enzima kao alternativni kofaktori.
- 3) Vanadat može da zameni druge metale, koji deluju kao katalizatori u aktivnim centrima enzima (mismetalcija).

Vezivanje vanadata za enzime, umesto fosfata, može dovesti i do stimulacije enzimске aktivnosti, kao što je slučaj sa 2,3-bisfosfoglicerat fosfatazom (Mendz et al., 1990), acetilholinesterazom (Catalán et al., 1985), adenilat ciklazom (Schwabe U, Puchstein C, Hannemann H, 1979) i drugim, ali u većini slučajeva, vanadat deluje kao inhibitor enzima. Poznato je da vanadat deluje kao inhibitor Na^+/K^+ -ATPaze (Karlsh et al., 1979), plazmamembranskih H^+ -ATPaza, mnogih fosfataza (Crans et al., 2004; J. Singh et al., 1981), kao i mnogih protein kinaza, oksidoreduktaza, ribonukleaza i drugih (Scior et al., 2005).

Iako vanadat pokazuje sličnosti sa fosfatom, postoje određene razlike u stabilnosti, redoks osobinama i hemijskoj reaktivnosti između njih. Pri neutralnim pH vanadat se uglavnom nalazi kao monoanjon (H_2VO_4^-), dok se fosfat pretežno nalazi u obliku dianjona (HPO_4^{2-}) (Crans et al., 2004). Takođe, pri neutralnim pH dolazi do oligomerizacije H_2VO_4^- i HVO_4^{2-} u dimerne, tetramerne i pentamerne strukture, što se takođe dešava i sa fosfatom koji polimerizuje formirajući oligofosfate i polifosfate, ali su ova jedinjenja znatno stabilnija nego vanadatova (Crans et al., 2004). U vodenim rastvorima vanadat se može naći u obliku monomera, dimera, tetramera, pentamera i dekamera, a oblik zavisi pre svega od njegove koncentracije, kao i pH rastvora (Aureliano & Crans, 2009).

Vanadati su podložni oksidoredukcionim procesima, što je još jedna od razlika u odnosu na fosfate. U ćeliji se vanadat može redukovati do vanadila pomoću različitih redukujućih jedinjenja poput glutationa, askorbinske kiseline, katehola, NADPH i drugih, dok se vanadil reoksiduje do vanadata, najčešće od strane ROS (Scior et al., 2005). Pomenuta reakcija se odvija konstantno u ćelijama (slika 1.4.2.2), a koji će produkti nastati, zavisi pre svega od koncentracije oksidujućih i redukujućih agenasa, kao i koncentracije vanadata, dužine izloženosti ćelije istom, kao i uslovima unutar ćelija. Ova ciklična

reakcija ima važnu ulogu u ćelijskoj redoks ravnoteži, delujući ili kao generator ili kao eliminator ROS (Rehder 2013).



slika 1.4.2.2. Šematski prikaz oksidoredukcionih procesa kojima podleže vanadijum u ćelijama.

1.4.3. Uloga vanadijuma u živim sistemima i njegova primena kao terapeutika

Vanadijum je prisutan u brojnim eukariotskim organizmima, i za mnoge od njih je esencijalan u mikromolarnim koncentracijama (Rehder, 2015). Međutim, njegova uloga kao mikronutrijenta kod ljudi još uvek nije potvrđena, pri čemu se zna da se u organizam najčešće unosi putem hrane, dok je unos putem vazduha znatno manji (Scior et al., 2005). Nakon unosa, vanadijum u oksidacionim stanjima +4 i/ili +5 se najčešće vezuje za transportne proteine, poput transferina (Butler & Eckert, 1989), preko kojih dospeva do različitih tkiva i organa, uključujući srce, jetru i bubrege, gde ostvaruje svoje efekte. Iz organizma se relativno brzo eliminiše, ali se može akumulirati, u masnom tkivu, u kostima i u manjoj meri u bubrezima (Priya et al., 2006).

U određenim mikroorganizmima, gljivama i algama, vanadijum ima jasno definisanu biohemijsku funkciju, jer se javlja kao kofaktor u specifičnim enzimima. **Vanadat-zavisne haloperoksidaze** se nalaze u morskim makroalgama, poput smeđe alge *Ascophyllum nodosum* i crvene alge *Corallina pilulifera*, kao i kod nekih gljiva i lišajeva (Costa Pessoa et al., 2015). **Vanadijum-zavisne nitrogenaze** su detektovane kod bakterijskih vrsta iz roda *Azotobacter*, kao i kod cijanobakterija iz rodova *Anabaena* (Baran, 2008), dok su **vanadijum peroksidaze** uočene kod određenih vrsta gljiva, smeđih, crvenih i zelenih algi (Rehder, 2008a). **Nitrat-reduktaze** sa vanadijumom umesto molibdena u aktivnom centru su pronađene u bakterijama *Thioalkalivibrio nitratreducens* i *Pseudomonas isachenkovii* (Rehder, 2008b).

Sposobnost vanadijuma da lako menja oksidaciona stanja, strukturna i funkcionalna sličnost vanadata sa fosfatima, prisustvo u različitim hemijskim oblicima (kao katjona ili anjona), kao i sve veći broj dokaza o njegovim biološkim efektima, doveli su do značajnog porasta interesovanja za njegovo proučavanje i za potencijalnu primenu njegovih jedinjenja u medicinske svrhe.

Među brojnim biološkim efektima, najviše proučavano dejstvo vanadijuma je njegovo hipoglikemijsko, odnosno insulin-mimetičko delovanje. Ovo svojstvo ispoljavaju vanadijumova jedinjenja kako u +4 tako i u +5 oksidacionom stanju, kroz više različitih mehanizama (Scior et al., 2005; Soriano-Agueda et al., 2016). Vanadati deluju pre svega u citoplazmi, funkcionišu kao fosfatni analozi i mogu da interferiraju sa brojnim enzimskim sistemima koji koriste fosfatne grupe, uključujući enzime u insulinskoj signalizaciji i ispoljavaju više povoljnih efekata na metabolizam glukoze i lipida (Rehder, 2015). S druge strane, vanadili primarno deluju tako što stimulišu unos glukoze u ćelije, delujući na nivou ćelijske

membrane i povećavajući ekspresiju ili translokaciju transportera glukoze (GLUT4) (Rehder, 2015; Scior et al., 2005).

Brojna jedinjenja vanadijuma ispoljavaju značajan potencijal u lečenju parazitskih tropskih bolesti, kao i u terapiji virusnih i bakterijskih infekcija (Rehder, 2015). Osim toga, jedinjenja vanadijuma pokazuju potencijalnu primenu u lečenju hiperlipidemije i hipertenzije, kao i u terapiji malignih oboljenja (Kioseoglou et al., 2015). U lečenju tumora, vanadijumova jedinjenja mogu indukovati apoptozu i inhibirati proliferaciju ćelija malignih tumora.

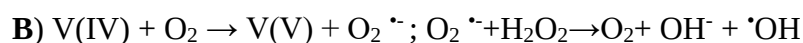
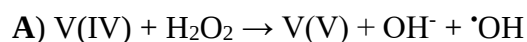
Mnoga vanadijumova jedinjenja ispoljavaju i neželjena biološka dejstva, uključujući mutagenost, teratogenost (Faría de Rodríguez et al., 1998; Morgan & El-Tawil, 2003), spermicidno delovanje (D'Cruz et al., 1999), pa čak i potencijalnu kancerogenost (Rondini et al., 2010). Efekti vanadijumovih jedinjenja su rezultat njihovih hemijskih osobina, kao što su sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu, kao i generisanje ROS-a (Narla et al., 2000).

Oksidativni stres predstavlja jedan od ključnih mehanizama kako toksičnih, tako i terapijskih efekata vanadijuma. U tumorskim ćelijama, povišen nivo ROS-a može doprineti indukciji apoptoze, što je osnova antikancerogenog delovanja određenih vanadijumovih kompleksa (Kowalski et al., 2020). S druge strane, u zdravim tkivima, prekomerna produkcija ROS-a može imati štetne posledice (Di Meo et al., 2019).

I pored brojnih eksperimentalno potvrđenih bioloških aktivnosti i izraženog terapijskog potencijala, klinička upotreba vanadijuma i njegovih jedinjenja ostaje znatno ograničena, pre svega zbog njihove toksičnosti, neselektivnog mehanizma delovanja i kompleksne farmakokinetike (Scior et al., 2016).

1.4.4. Mehanizmi generisanja ROS od strane vanadijuma

Kao što je već napomenuto, vanadijum ima sposobnost da učestvuje u redoks reakcijama u kojima dolazi do nastanka ROS-a. Nastanak ROS-a može biti putem mehanizama sličnih Fentonovoj (A) i/ili Haber-Weiss-ovoj reakciji (B) (Halliwell & Gutteridge, 1985; Soriano-Agueda et al., 2016).



Nakon ulaska vanadatnih jona u ćeliju, dolazi do njihove redukcije od strane različitih redukujućih agenasa (Halliwell & Gutteridge, 1985; Soares et al., 2007; Soriano-Agueda et al., 2016; Valko et al., 2005; Z. Zhang et al., 2001) i ukoliko se vanadilni joni nađu u prisustvu H_2O_2 , dolazi do nastanka jednog od najpotentnijih radikala, $\cdot OH$, koji dovodi do oksidativnih promena biološki važnih molekula. Pored hidroksil radikala, može nastati i superoksidni anjon radikal, koji se delovanjem superoksid dismutaze prevodi u H_2O_2 . Superoksidni anjon može takođe reagovati sa vanadatom, pri čemu dolazi do formiranja peroksivanadila ($V(IV)-OO^{\cdot}$) i vanadil hidroperoksida ($V(IV)-OH^{\cdot}$) (Valko et al., 2005). Uzimajući u obzir navedene mehanizme, može se zaključiti da su za intracelularno dejstvo vanadata odgovorne različite reaktivne vrste kiseonika, uključujući $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 .

Promene u nivou ROS-a, naročito njihovo povećanje, direktno utiču na aktivnosti antioksidativnih enzima, kao i na koncentraciju neenzimskih antioksidanasa. Vanadijum može izazvati promene u aktivnostima antioksidativnih enzima, koje se manifestuju kao njihova inhibicija ili stimulacija, zavisno od brojnih faktora. Tokom procesa redukcije vanadijuma dolazi do trošenja neenzimskih molekula male mase, što dodatno utiče na antioksidativni status ćelije.

1.4.5. Vanadijum i gljive

Gljive imaju sposobnost usvajanja i akumulacije vanadijuma, te predstavljaju jedan od osnovnih puteva kojima vanadijum ulazi u biosferu (M. Anke, H. Illing-Günther, 2005). Vanadijum dospeva u ove organizme primarno iz zemljišta ili putem površinskih i podzemnih voda bogatih ovim elementom. Većina kvasaca i filamentoznih gljiva ima visoku toleranciju na vanadat (Ceci et al., 2012), a određene vrste imaju i izraženu sposobnost akumulacije, te se mogu koristiti kao potencijalni bioakumulatori (Y.-H. Xu et al., 2019). Gljiva *Amanita muscaria* je poznata po sposobnosti da akumulira vanadijum u plodnom telu u obliku organskog ne-okso-vanadijum (IV) jedinjenja, amavadina (Rehder, 2008b). Vanadil u amavadinu može biti oksidovan do vanadata i u ovoj formi ispoljava aktivnosti slične peroksidazama i katalazama (Da Silva et al., 2013). U ovoj gljivi, sadržaj amavadina može dostići i 1 g /kg suve mase (Rehder, 2015).

Određene vrste gljiva poput *Aspergillus niger* i *Penicillium simplicissimum* mogu da usvajaju vanadijuma i nikl iz pepela bogatog vanadijumom, koji nastaje kao rezidualni otpad u termoelektranama i na taj način da učestvuju u njegovoj bioremedijaciji (Rasoulnia & Mousavi, 2016). Xu i saradnici su pokazali da su vrste *Armillaria cepistipes* i *Xerocomus badius* posebno efikasne u uklanjanju rastvorljivih oblika vanadijuma, pri čemu je proces bioremedijacije efikasniji što je veća koncentracija vanadijuma u rastvorljivoj formi (Y.-H. Xu et al., 2019).

Što se transporta vanadijuma kroz membranu tiče, prethodna istraživanja su pokazala da i V(V) i V(IV) mogu ući u ćeliju *S. cerevisiae*. Vanadat ulazi u ćeliju fosfatnim transporterima i u citoplazmi se redukuje do vanadila pomoću redukujućih sistema kao što su tioli (Willsky et al., 1984), a usvajanje putem fosfatnih transportera je pokazano i za *N. crassa* (Bowman, 1983; Bowman et al., 1983). Druga studija je pokazala da inkubacija ćelija kvasaca sa V(V) dovodi do pojave V(IV) vezanog za ćelijski zid, a autori su predložili mehanizam vanćelijske redukcije praćene sporijim unosom V(IV) (Bode et al., 1990).

1.4.6. Vanadijum i *P. blakesleeanus*

U okviru grupe Živića i saradnika, u prethodnoj deceniji je publikovano više studija koje su se bavile interakcijom vanadata i micelijuma filamentozne gljive *P. blakesleeanus*. Svi eksperimenti su urađeni na 24-28 h starom micelijumu, odnosno micelijumu u eksponencijalnoj fazi rasta. Pokazano je da je *P. blakesleeanus* osetljivija na delovanje vanidila nego vanadata, što se ogledalo u smanjenom prinosu biomase micelijuma tokom rasta u medijumu koji je sadržao V(IV) ali ne i V(V) (Žižić et al., 2013).

U studiji Žižića i saradnika (Žižić et al., 2014), praćen je efekat vanadijuma na fosfatne metabolite u micelijumu putem ^{31}P NMR spektroskopije. Aplikacija V(V) je dovela do značajnih promena u fosfatnom spektru, koje se pre svega odnose na povećanje signala fosforilisanih šećera (SP) i dugolančanih polifosfata (PolyP), smanjenje signala ortofosfata (Pi), i smanjenje odnosa $\text{ATP}/(\text{ATP}+\text{ADP})$, odnosno utrošak osnovnog „energetskog“ molekula ATP. V(V) je poznati inhibitor mnogih enzima koji učestvuju u metabolizmu fosforilisanih šećera, pre svega u procesu glikolize i sinteze glikogena, te ne iznenađuju intenzivne promene u indikatorima energetskog statusa ćelije. Primena metode tačne hromatografije visokih performansi (engl. High Performance Liquid Chromatography HPLC) je ukazala na glukozu-6-fosfat (G6P) kao glavnu komponentu povećanja signala SP. On je prvi produkt metabolizma glukoze u glikolizi, ali može biti i intermedijer u sintezi glikogena. Aplikacija V(IV) nije pokazala značajne efekte na ^{31}P NMR spektar, pa je postulirano da se u hife micelije *P. blakesleeanus* vanadijum transportuje kao vanadat i u tom obliku dovodi do primećenih fizioloških efekata (Žižić et al., 2014).

Druga studija Žižića i saradnika (Žižić et al., 2013) je bila usmerena na ispitivanje redukcije i transporta vanadijuma metodom elektron paramagnetne spektroskopije (engl. Electron Paramagnetic Resonance, EPR) koja detektuje samo V(IV). Već nakon 5 minuta od dodavanja V(V) pojavile su se karakteristične linije V(IV) i to i u slobodnoj i u vezanoj formi, što je pokazalo da u interakciji sa micelijumom *P. blakesleeanus* dolazi do redukcije V(V). Ova redukcija je pretežno enzimsko, dok se deo može pripisati neenzimskoj unutarćelijskoj redukciji koja se manifestovala kao smanjenje u sadržaju tiola. Do enzimске redukcije dolazi usled aktivnosti enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću koji se nalazi na ćelijskoj površini *P. blakesleeanus* (Baroja-Mazo et al., 2004), a kinetika rasta EPR signala V(IV) ukazuje na dvofazni proces. Redukcija V(V) do V(IV) je praćena vezivanjem V(IV) za komponente ćelijskog zida, najverovatnije hitozan, a nakon zasićenja mesta vezivanja u zidu dolazi do transporta V(IV) u samu hifu. Vanadil katjon se transportuje kroz membranu katjonskim transporterima, što je pokazano primenom lantana, inhibitora ovih transportera. Ovaj deo eksperimenata ukazuje na ulazak V(IV) u hifu, za koji je pokazano da ne dovodi do promena u ^{31}P NMR spektru, tako da rezultati deluju kontradiktorno. Dilemu je rešio eksperiment u kom je u sistem dodat askorbat koji je u stanju da redukuje V(V) i u unutarćelijskoj i vanćelijskoj sredini. Nakon ispiranja, signal slobodnog V(IV) je zabeležen samo u micelijumu koji je tretiran visokom koncentracijom V(V) (70 $\mu\text{mol/g}_{\text{SM}}$), ukazujući da pri višim koncentracijama dolazi i do usvajanja V(V), što je dodatno dokazano primenom blokatora fosfatnih transportera, koji su ovo usvajanje sprečili.

Na osnovu dobijenih rezultata predložen je put detoksikacije od vanadijuma u micelijumu *P. blakesleeanus* koji se sastoji od nekoliko koraka:

1. Obe redoks forme V mogu da se vezuju za ćelijski zid koji predstavlja prvu barijeru njegovom transportu u ćeliju.
2. Kada dodje do zasićenja, V(V) se redukuje do V(IV) koji ulazi u hifu katjonskim kanalima.
3. Pri višim koncentracijama V(V) koje premašuju kapacitet vanćelijske redukcije, on se unosi u hifu fosfatnim transporterima i dovodi do već opisanih metaboličkih promena.

Lokalizacija vanadijuma u hifi je ispitivana u studiji Žižića i saradnika (Žižić et al., 2015) mikro-XRF oslikavanjem hemijskih elemenata, i utvrđeno je da se signal vanadijuma poklapa većinski sa signalom P i Ca, čija je primarna lokalizacija u vakuoli, a manji deo V je u samim izduženim delovima hife. Fosfati su u vakuoli prisutni u obliku PolyP koji heliraju deo prisutnog vanadijuma u oksidacionom stanju V(IV).

Kao što je već napomenuto, fiziološki efekti vanadijuma zavise ne samo od njegove oksidacione forme, već i od toga da li je u obliku monomera, dimera, tetramera ili dekamera. Tako dimer i dekamer imaju toksičnije dejstvo na kvasce nego monomer (Wong et al., 1984). Prisustvo različitih formi V(V) u micelijumu je ispitano u studiji Žižića i saradnika (Žižić et al., 2016) metodom ^{51}V NMR spektroskopije kojom se registruje samo V(V). Utvrđeno je prisustvo monomera, dimera, tetramera, pentamera i nepoznate V(V) vrste na -532 ppm. Vremenom se smanjuje intenzitet spektra što ukazuje na izuzetne redukujuće sposobnosti micelijuma ove gljive, a to se naročito odnosi na signal tetramera. Kako inhibitor enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću anulira ovo smanjenje, zaključeno je da je vanćelijska redukcija V(V) prevashodno usmerena na tetramer. Sa druge strane, signal nepoznate V(V) vrste je sa vremenom rastao. Dodatak vanćelijskog Pi je ovaj rast anulirao, što ukazuje da se monomer unosi u ćeliju gde formira kompleks sa nepoznatim unutarćelijskim molekulom, najverovatnije citratom ili laktatom, za koje je pokazano da mogu formirati kompleks sa monomerom V(V) čiji se signal pojavljuje upravo na -532 ppm (Andersson et al., 2005; Gorzsás et al., 2004). Upravo formiranje ovih kompleksa može biti razlog tolerancije *P. blakesleeanus* na visoke koncentracije V(V).

Navedene studije su dale odgovore na veliki broj pitanja o interakciji vanadijuma i *P. blakesleeanus*, a odnose se na transport, redukciju, lokalizaciju i delimično mehanizme tolerancije. U njima je međutim,

izlaganje V(V) kratkotrajno i samo u ekspanencijalnoj fazi rasta micelijuma. Kako je utvrđeno da u samom micelijumu dolazi do redoks transformacija vanadijuma za koje je poznato da utiču na redoks status micelijuma, jedan od ciljeva ove disertacije je upravo da utvrdi promene u samom redoks statusu kao i da ispita odgovor različitih, enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativnog sistema *P. blakesleeanus* na te promene. Poznato je da komponente antioksidativnog sistema imaju različit sadržaj odnosno aktivnost u različitim fazama krive rasta te će shodno tome i antioksidativni odgovor biti ispitan u tri različite faze rasta – ekspanencijalnoj, kasnoj ekspanencijalnoj/ranoj stacionarnoj i stacionarnoj fazi i to sa rastućim koncentracijama V(V).

U prethodnim studijama je utvrđeno da *P. blakesleeanus* usvaja vanadijum, a jedan od ciljeva ove disertacije je utvrđivanje kapaciteta tog usvajanja. Potencijalno visok kapacitet usvajanja može kandidovati ovu gljivu za dalja ispitivanja njene industrijske primene kao bioakumulatora vanadijuma u vanadijumom kontaminiranim vodama.

Pokazano je da izlaganje gljiva prelaznim metalima predstavlja stres koji može dovesti do sinteze potencijalno korisnih sekundarnih metabolita, ili preusmeravanja metabolizma u smeru povećanja sadržaja lipida ili skladišnih ugljenih hidrata (glikogen, trehaloza) (Dzurendova et al., 2020). Jedan od ciljeva je i utvrđivanje ovakvih metaboličkih promena.

2. Ciljevi

Cilj ove doktorske disertacije je da se ispita uticaj prelaznog metala – vanadijuma na enzimске i neenzimске komponente sistema antioksidativne zaštite filamentozne gljive *P. blakesleeanus*, da se utvrdi potencijal usvajanja vanadijuma, kao i uticaj istog na relativni sadržaj gradivnih biomolekula u različitim fazama razvića.

Da bi se ostvario glavni istraživački cilj, izdvojeni su konkretni podciljevi za koje su formulisani odgovarajući istraživački zadaci:

1. Praćenje promena ključnih parametara tokom razvića gljive *P. blakesleeanus*
 - Praćenje promena biomase gljive tokom rastenja radi dobijanja krive rasta i određivanja starosnih tačaka micelije karakterističnih za osnovne faze razvića u kojima će se vršiti dalji eksperimenti.
 - Određivanje relativnog sadržaja osnovnih klasa biomolekula: lipida, proteina i ugljenih hidrata u miceliji gljive u različitim fazama razvića.
2. Ispitivanje efekata različitih koncentracija vanadijuma u medijumu na njegov sadržaj u miceliji, njen rast, vijabilnost i sadržaj osnovnih klasa biomolekula u miceliji.
 - Određivanje sadržaja vanadijuma u različitim fazama razvića micelije nakon inkubacije od 24h.
 - Ispitivanje hroničnog uticaja različitih koncentracija vanadata na rast i vijabilnost micelije u različitim fazama razvića.
 - Ispitivanje uticaja različitih koncentracija vanadata na relativni sadržaj osnovnih klasa biomolekula: lipida, proteina i ugljenih hidrata u miceliji gljive.
3. Ispitivanje delovanja vanadata, kao potencijalnog stresora, na produkciju ROS i aktivnost sistema antioksidativne zaštite
 - Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta pod dejstvom različitih koncentracija vanadata u različitim fazama razvića micelije.
 - Praćenje uticaja različitih koncentracija vanadata na neenzimске antioksidanse u različitim fazama razvića određivanjem:
 - ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka
 - koncentracije ukupnih fenola
 - koncentracije ukupnog glutaciona

- Praćenje delovanja različitih koncentracija vanadata na aktivnost enzima antioksidativne zaštite, i to:
 - katalaze, peroksidaze i superoksid dismutaze
 - glutacion peroksidaze, glutacion reduktaze i glutacion-S-transferaze

Prvi deo istraživanja biće usmeren na utvrđivanje osnovnih parametara rasta i biohemijskog sastava micelije u različitim fazama razvića, što omogućava definisanje eksperimentalnih tačaka za dalja merenja. Drugi deo obuhvatiće ispitivanje interakcija vanadijuma sa micelijom i njegovog uticaja na gradivne biomolekule i vijabilnost micelije. Treći deo će biti posvećen rasvetljavanju mehanizama odgovora na oksidativni stres izazvan prisustvom vanadata kroz analizu produkcije ROS i aktivnosti antioksidativnog sistema. Na ovaj način, objedinjavanjem eksperimentalnih podataka dobijenih primenom različitih fizickohemijskih metoda, kao i biohemijskih testova, biće omogućeno sveobuhvatno sagledavanje uloge vanadijuma kao faktora stresa u miceliji gljive *P. blakesleanus*.

3. Materijal i metode

3.1. Eksperimentalni objekat

Kao eksperimentalni objekat u ovom radu je korišćen divlji soj („wildtype“-wt), *NRR1555* (-) gljive *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff). Micelija gljive je gajena u komori za uzgoj u kontrolisanim uslovima, na temperaturi od 22°C, izložena kontinuiranom belom fluorescentnom osvetljenju jačine 10 W/m².

Gajenje je vršeno:

- a) na čvrstoj podlozi / medijumu
- b) u tečnom medijumu

3.1.1 Gajenje na čvrstoj podlozi

Ovakav način gajenje je imao za cilj prikupljanje spora za dalje eksperimente. Za dobijanje 1 L čvrstog medijuma je bilo neophodno pripremiti:

- a. Krompir (200 g)
- b. Agar (15 g)
- c. D+ glukozu (20 g)
- d. Tiamin hidroklorid - Vitamin B1 (1 mg)

Priprema samog medijuma se ogledala u tome da se krompir iseckan na kocke, skuva u destilovanoj vodi (kuva se oko 1 h), zatim se procedi kroz dvoslojnu gazu, a potom se sve ostale supstance dodaju u rastvor, jedna po jedna do potpunog rastvaranja, uz mešanje na magnetnoj mešalici. Nakon njihovog rastvaranja, dodaje se 1 mL rastvora koncentracije 1 mg/mL vitamina B1 i medijum se dopuni destilovanom vodom do zapremine od 1 L. Medijum se zatim raspodeli u posude i sterilise u autoklavu pod pritiskom na 114°C, 25 min. Nakon sterilizacije, medijum je spreman za razlivanje u petri kutije prečnika 90 mm. Medijum se razliva, tako da ispunji oko 2/3 dubine petri kutije i postepeno se hladi i steže. Na čvrst medijum se dodaje po 100 µL 10²/mL aktiviranih spora, koje se aktiviraju u vodenom kupatilu na 48-50°C, 15 minuta. Zasejane petri kutije se drže u sterilisanim i navlaženim plastičnim prozirnim kutijama ispod fluorescentne lampe, dva dana poklopljene, za širenje micelije i dva dana otklopljene, za rast sporangiofora. Nakon četiri dana od zasejavanja, gljive dostižu poslednji stadijum razvika sporangiofora i zrele sporangije se potapaju u sterilisanu dejonizovanu vodu. U dodiru sa vodom, opne sporangija pucaju i oslobađaju se spore. Prikupljene spore se zatim koriste za gajenje micelije u tečnom medijumu.

Bitno je napomenuti da se spore čuvaju u zamrzivaču na -20°C i čuvaju se u obliku koncentrovanog rastvora (10⁷/mL). Rastvor spora u koncentraciji od 10⁷/mL služi za zasejavanje gljive u tečnom medijumu, a njegovim razblaživanjem dejonizovanom vodom do koncentracije spora od 10²/mL, dobija se rastvor koji se koristi za zasejavanje gljiva na čvrstom medijumu. Takođe na -20°C se čuva i **master štok** (10⁷ spora/mL), koji je neophodno obnavljati na dve godine, kako bi se održala genetička uniformnost gljive. Spore za master štok se dobijaju od jedne sporangije, koja se potopi u 1 mL sterilisane dejonizovane vode. U dodiru sa vodom, opna sporangija pukne i oslobodi se sadržaj, a novonastali rastvor sadrži oko 5x10⁴ spora/mL. Taj rastvor se razblažuje do koncentracije spora od 10²/mL, a zatim se te spore aktiviraju i vrši se zasejavanje 6 petri kutija na prethodno opisan način. Dobijeni rastvor spora, nakon potapanja zrelih sporangija u 6 mL sterilisane dejonizovane vode, predstavlja master štok genetički uniformnih spora.

3.1.2. Gajenje u tečnom medijumu

Ovakav način gajenja je za cilj imao dobijanje micelijuma, koji je korišćen u eksperimentima. Micelijum je gajen u tečnom minimalnom medijumu SIV (Sutter, 1975), čiji je sastav dat u tabeli 3.1.2.1. Mikroelementi su dodavani u vidu rastvora (10 mL), koji je čuvan u frižideru, a njegov sastav je opisan u tabeli 3.1.2.2.

Tabela 3.1.2.1. Sastav minimalnog medijuma (SIV).

Komponenta medijuma	g/L	mL/L	Konačna koncentracija u SIV medijumu (mM)
D+ glukoza	20		110
L-asparagin monohidrat	2		13,1
KH ₂ PO ₄	5		36,7
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5		2
Mikroelementi		10	

Tabela 3.1.2.2. Sastav rastvora mikroelemenata.

Komponenta	Koncentracija štoka (g/mL)	V štoka u 100 mL rastvora (mL)	Konačna koncentracija u SIV medijumu (μM)
CaCl ₂	0,01	0,025	0,2
Tiamin hidrohlorid (vit B1)	0,05	0,2	3
Limunska kiselina x H ₂ O	0,1	0,2	10,2
Fe(NO ₃) ₃ x 9 H ₂ O	0,075	0,2	3,7
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1	0,1	3,5
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03	0,1	1,8
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,003	0,1	0,2
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,005	0,1	0,2

Priprema medijuma se odvijala tako što se najpre glukoza rastvarala u dejonizovanoj vodi (u polovini konačne zapremine), dok se asparagin monohidrat rastvarao takođe u polovini konačne zapremine dejonizovane vode, uz blago zagrevanje, i u taj rastvor su se dodavale sve ostale komponente tečnog medijuma. Kada se sve supstance rastvore, rastvori se sterilišu pod pritiskom na 114°C, 25 min. Tek nakon hlađenja se spajaju rastvor glukoze i rastvor ostalih komponenti, čime se dobija kompletan tečni medijum pH oko 4,6, koji je spreman za zasejavanje aktiviranih spora gljiva. Koncentracija spora u medijumu je $\sim 0,5 \times 10^6/\text{mL}$ pri gajenju u erlenmajerima, a $1 \times 10^6/\text{mL}$ pri gajenju u petri posudama.

Svi rastvori, kao i štokovi hemikalija koji su korišćeni u opisanim eksperimentima, su pravljani u destilovanoj/dejonizovanoj vodi osim ako nije drugačije naglašeno.

3.2. Kriva rasta micelije *P. blakesleeanus*

Za dobijanje krive rasta micelijum gljive *P. blakesleeanus* je gajen na šejkeru (Sea Star, Heathrow Scientific, SAD), pri rotaciji od 120 rpm, pri konstantnom osvetljenju i temperaturi od 22°C. U erlenmajere od 100 mL je dodavano po 20 mL standardnog tečnog medijuma pH podešenog na 6,7 i 1 mL prethodno aktiviranih spora (10^7 /mL, 15 min. na 48-50°C). Podešavanje pH medijuma na 6,7 je vršeno da bi se izbegao potencijalni fiziološki efekat pH na miceliju. Pošto je rastvor vanadata bazan, njegovim dodatkom u minimalni medijum, dolazi do povećanja pH, pa su svi rastvori minimalnog medijuma, kako kontrolni, tako i oni koji su sadržali vanadat (u predstojećim eksperimentima), podešavani na 6,7 (pH medijuma kada se doda vanadat da bude u koncentraciji od 15 mM), stoga je i kriva rasta određena pri datom pH.

Rast micelije gljive je praćen do 68 h, pri čemu je određivanje biomase prvog uzorka započeto nakon 12 h rasta, a svako sledeće određivanje je vršeno na 4 h; masa micelijuma je bila nemerljiva za mlađe gljive (< 12 h stare). U svakoj vremenskoj tački, micelijum se centrifugirao 10 min. na 4300 x g (Eppendorf resort 5804R, Nemačka). Micelijum se tokom centrifugiranja spusti na dno konusne epruvete, a dobijeni supernatant predstavlja medijum u kojem je micelijum gljive rastao. Ovaj supernatant je odvajan u mikrotube i zamrzavan, radi kasnijeg određivanja koncentracije glukoze. Iscentrifugirani micelijum je filtriran pomoću vakuum pumpe na filter papiru poznate mase. Dobijeni uzorak micelije se sušio u sušnici 24 h, na temperaturi od 50°C, a nakon toga stajao 24 h na vazduhu zbog nadoknađivanja izgubljene vlage u filter papiru, pa je zatim vršeno merenje njegove mase na analitičkoj vagi. Svaka satnica je rađena u dva ili tri ponavljanja po eksperimentalnoj postavci, u tri nezavisna eksperimenta ($n \geq 6$), i masa svakog je izražena u miligramima suve mase po 1 mL medijuma ($\text{mg}_{\text{SM}}/\text{mL}$). Zahvaljujući dobijenoj krivi rasta, osim što su utvrđene faze razvoja micelija pomenute gljive, omogućen je odabir micelija odgovarajućih starosti koje su potom tretirane vanadatom. Za tretmane vanadatom su izabrane micelije gljive starosti 20 h (rana do srednja eksponencijalna faza razvića), 36 h (kasna eksponencijalna/rana stacionarna faza razvića) i 56 h (stacionarna faza razvića).

3.3. Određivanje koncentracije glukoze u medijumu

Koncentracija glukoze u medijumu je određivana spektrofotometrijski, u reakciji sa dinitrosalicilnom kiselinom (DNS) metodom (Jain et al., 2020). Princip ove metode se ogleda u tome da u alkalnoj sredini, dolazi do redukcije DNS od strane glukoze, čime nastaje 3-amino-5 nitro salicilna kiselina, narandžasto crvene boje, čiji je maksimum apsorbanca na 575 nm.

Reagens za određivanje koncentracije glukoze je sadržao 40 mM 3,5 dinitrosalicilnu kiselinu, 4 mM Na_2SO_3 i 250 mM NaOH i on je pomešan sa supernatantom (izdvojenim u svakoj vremenskoj tački krive rasta) u odnosu 1:1 (po 0,5 mL u mikroepreveti). Uzorci su zatim zagrevani na 90°C 15 min. Nakon zagrevanja, dodato je po 300 μL 50 % rastvora NaK tartarat tetrahidrata. Uzorci su zatim ohlađeni do sobne temperature i nakon hlađenja im je očitavana apsorbanca na 575 nm (UV/Vis spektrofotometar Jenway Genova Plus, Engleska). Zajedno sa uzorcima medijuma rađeni su i standardi (0,1-5 mg/mL glukoze), na isti način, pa je koncentracija glukoze dobijena očitavanjem sa standardne prave ($R^2=0,99$) i izražena u mg po mL medijuma (mg/mL).

3.4. Priprema rastvora vanadata i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat

3.4.1. Priprema rastvora vanadata

Rastvor vanadata je pripreman prema protokolu Gordona (Gordon, 1991). Ovaj protokol se ogledao u postupku ponavljanja ključanja, hlađenja i podešavanja pH rastvora Na_3VO_4 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka), a krajnji cilj je bio dobijanje V(V) monomera. Nakon inicijalnog rastvaranja Na_3VO_4 , dobija se bezbojni, bazni rastvor, pH oko 12-13. Pre samog zagrevanja rastvora dodaje se HCl kako bi se pH rastvora spustio na 10. Dodatkom kiseline nastaju oligomeri i boja rastvora iz bezbojne prelazi u narandžastu. Ključanjem nestaju oligomeri, i u rastvoru ostaju monomeri ali pH raste. Nakon nekoliko ciklusa ključanja, hlađenja i zakišeljavanja rastvora, dobija se rastvor stabilnog pH oko 10 u kome se nalaze samo monomeri vanadata. Dobijeni rastvor se isfiltrira i štok vanadata (koncentracije 200 mM) se čuva na - 20°C do korišćenja.

3.4.2. Klijanje i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat

Kako bi se ispitao uticaj vanadata na klijanje spora i rast micelije gljive, vanadat je dodavan u tečni medijum i to u četiri različite koncentracije (1 mM, 5 mM, 10 mM i 15 mM), pH svih medijuma je podešen na 6,7 i u ovakve medijume su zasejane aktivirane spore ($10^7/\text{mL}$). Korišćen je 200 mM štok Na_3VO_4 , koji je pripremljen prema prethodno opisanom protokolu. Praćen je rast micelija koje su rasle na vanadatu do 12 h, 20 h i 36 h na šejkeru, kao i micelija koje su rasle do 20 h na vanadatu u petri kutijama. Nakon rasta, micelije gljive su filtrirane pod vakuumom, ispirane vodom i sušene na filter papiru poznate mase. Dobijeni uzorci su sušeni u sušnici 24 h, na temperaturi od 50°C. Nakon sušenja, uzorci su stajali 24 h na vazduhu, pa se zatim vršilo njihovo merenje na analitičkoj vagi. Rast je izražen kao $\text{mg}_{\text{SM}}/\text{mL}_{\text{med}}$.

Izračunat je i indeks tolerancije- eng. *tolerance index* (TI) prema Ceci i sardnicima (Ceci et al., 2012), korišćenjem sledeće formule **TI = (Suva masa tretiranog micelijuma/suva masa kontrolnog micelijuma) x 100**.

3.5. NMR spektar medijuma sa vanadatom

Kako bi se utvrdile prisutne forme vanadata u minimalnom medijumu korišćena je nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija (NMR). NMR spektroskopija je analitička tehnika kojom se proučava struktura molekula detekcijom odgovora određenih atomskih jezgara na delovanje spoljašnjeg elektromagnetnog polja u radiofrekventnom opsegu (RF). Svako atomsko jezgro koje ima neparan broj protona i/ili neutrona ima spin i može se pratiti ovom tehnikom (Bothwell & Griffin, 2011). Princip rada ove tehnike se ogleda u tome da se uzorak najpre stavi u konstantno magnetno polje koje dovodi do poravnanja spinova jezgara, zatim se atomskim jezgrima šalju radiofrekventni pulsevi koji uzrokuju prelazak spinova iz nižeg u više energetske stanje, a prisustvo dijamagnetnih vrsti elementa se vrši indirektno, nakon prestanka delovanja RF pulsa kada dolazi do uspostavljanja ravnoteže u zastupljenosti spinova jezgara po energetskim stanjima (relaksacija) i taj raspad magnetizacije se prevodi u električni signal koji se detektuje kao promena intenziteta indukovnog napona u vremenu. Furijerovom transformacijom se zavisnost pretvara u zavisnost magnetizacije od frekvencije i takvi signali predstavljaju NMR spektar. Uobičajeno je da se umesto frekvencije koristi bezdimenziona veličina, hemijski pomak (izražen u ppm - eng. parts per million) koji predstavlja rezonantnu frekvenciju konkretnog atomskog jezgra u odnosu na neki referentni standard. Najčešće korišćeni standard je tatrmetilsilan i u odnosu na njega standardni vanadatni hemijski pomaci su uglavnom nalaze u oblasti između -500 i -600 ppm.

U ovom eksperimentu korišćena je ^{51}V NMR spektroskopija, koja se može primeniti za utvrđivanje prisustva različitih polimernih oblika vanadata (Willsky et al., 1984). Vanadat u koncentracijama od 1 mM, 5 mM i 10 mM je dodat u minimalni medijum i pH je podešen na 6,7 pomoću KOH. Korišćen je spektrometar Bruker MSL 400 (Nemačka) sa nadogradnjom Apollo (Techmag, SAD) pri rezonantnoj frekvenciji od 105.169 MHz za ^{51}V . ^{51}V NMR spektri su snimani sa odovarajućom sondom i uzorkom u horizontalnom položaju, a trajanje pulsa je bilo 20 μs (odgovara uglu od 45°), dok je trajanje snimanja spektra bilo oko 3,6 minuta. Pomeraji signala su posmatrani u odnosu na standard - 1 M natrijum metavanadat, pH 12, sa signalom na -535,7 ppm u odnosu na VOCl_3 (Rehder, 2008a).

3.6. Postavka tretmana vanadatom i vijabilnost

Tretmani sa rastućim koncentracijama vanadata su za cilj imali ispitivanje efekta istog na micelije stare 20 h, 36 h i 56 h, koje su gajene na šejkeru (Sea Star, Heathrow Scientific, SAD), pri rotaciji od 120 rpm, u kontrolisanim uslovima. Ispitan je uticaj vanadata na:

- a) Vijabilnost micelije
- b) Produkciju ROS-a
- c) Sisteme antioksidativne zaštite micelije (enzime i neenzimske antioksidanse),

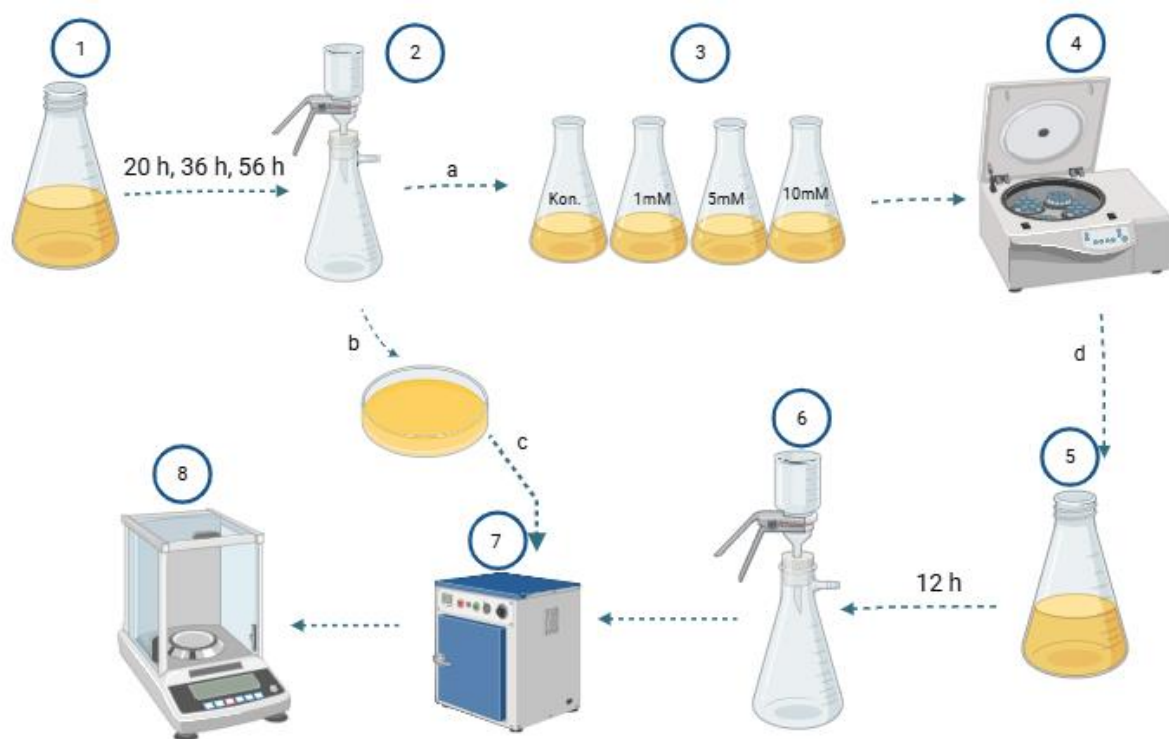
a takođe, određen je:

- d) Sadržaj vanadijuma u micelijama
- e) Relativni sadržaj biomolekula poput lipida, proteina i ugljenih hidrata

nakon odovarajućih tretmana vanadatom.

Micelije su gajene u minimalnom medijumu pH podešenog na 6,7, u koji su dodate prethodno aktivirane spore ($10^7/\text{mL}$, 15 min. na $48\text{--}50^\circ\text{C}$, odnos medijuma/spora : 20 mL/1 mL $10^7/\text{mL}$ spora). Nakon rasta micelije do prethodno pomenutih satnica, micelije su profiltrirane i prebačene u novi minimalni medijum pH podešenog na 6,7 (kontrola) ili minimalni medijum koji je sadržao 1 mM, 5 mM ili 10 mM vanadat, takođe pH podešenog na 6,7 (tretmani) i resuspendovane. Izlaganje vanadatu je bilo kraće (0,5 h, 1 h, 5 h) i/ili duže (24 h) i zavisilo je od tipa eksperimenta.

Za određivanje **vijabilnosti** micelije tretman vanadatom je trajao 5h. Pre samog tretmana, dobijene micelije (na gore opisan način) su podeljene, tako što je po 500 mg micelijuma stavljano u 50 mL medijuma (kontrola i tretmani), u kojem su resuspendovane ($n = 4$), a 4 x 500 mg je odmah odvojeno i stavljeno u sušnicu na 50°C , kako bi se sušilo 24 h. Nakon završetka tretmana (5 h), vršeno je centrifugiranje uzoraka u konusnim epruvetama od 50 mL na swing-out rotoru (Eppendorf resort 5804R, Nemačka), $4.300 \times g$, 4°C , 7 min. Po završetku centrifugiranja odliven je supernatant i micelijum je ispran sa 50 mM Na_2EDTA pH 6,7. Nakon ispiranja, micelijumi (i kontrolni i tretirani) su resuspendovani u 50 mL novog minimalnog medijuma pH 6,7 u kojem su rasli još 12 h. Tokom tretmana vanadatom, kao i tokom rasta u svežem medijumu nakon tretmana, micelija je rasla pod ranije navedenim uslovima gajenja (120 rpm, 22°C). Nakon 12 h, uzorci su filtrirani na vakum pumpi i dobijeni micelijumi su sušeni u sušnici 24 h na 50°C , nakon čega im je merena masa na analitičkoj vagi. Vijabilnost je praćena kroz 2 nezavisna eksperimenta ($n \geq 7$) i izražena kroz stopu rasta, koja je prikazana kao mg suve mase micelijuma po mL medijuma tokom 1 h ($\text{mgSM}/\text{mL} \cdot \text{h}$). (slika 3.6).



Created in BioRender.com **bio**

Slika 3.6. Prikaz toka eksperimenta za određivanje vijabilnosti micelija, starosti 20 h, 36 h i 56 h, gajenih na šejkeru, kada se izlože rastućim koncentracijama V(V) (1, 5 i 10 mM), tokom 5 h. Opis šeme:

1. Gajenje u kontrolisanim uslovima (na šejkeru, pri rotaciji od 120 rpm u tečnom minimalnom medijumu pH 6,7).
2. Filtracija micelija pod vakumom; **a**- 500 mg micelije je odvojeno i dodavano u 50 mL medijuma; **b** - 4 x 500 mg micelije je odmah odvojeno i stavljanu u sušnicu (**c**)
3. Resuspendovanje micelija u nove SIV medijume, kontrolne i medijume sa V(V), za predstojeće tretmane od 5 h; pH svih medijuma je bio podešen na 6,7.
4. Centrifugiranje, 4300 x g na 4°C, 7 min.; **d**- Ispiranje micelija 2 puta, sa 50 mM Na₂EDTA pH 6,7.
5. Nakon ispiranja, micelijumi (i kontrolni i tretirani) su resuspendovani u 50 mL novog minimalnog medijuma pH 6,7 u kojem su rasli još 12 h.
6. Filtracija micelija pod vakumom.
7. Sušenje micelija u sušnici 24 h na 50°C.
8. Merenje mase micelija na analitičkoj vagi.

Ova šema je napravljena uz pomoć sajta <https://BioRender.com>

Osim vijabilnosti, ispitan je uticaj vanadata na respiraciju micelije gljive, praćenjem promena koncentracije O₂ na kiseoničnoj elektrodi Klarkovog tipa (Hansatech Oxygraph, Engleska).

Rađeno je više eksperimenata praćenja uticaja vanadata na respiraciju micelije gljive. Najpre je ispitano akutno dejstvo V(V) na micelije gljive koje su rasle 24 h u minimalnom medijumu na šejkeru. Micelija je razblažena svežim minimalnim medijumom oko 4 puta pred merenje, jer je u suprotnom potrošnja O₂ bila prebrza za praćenje efekata vanadata. U razblaženi uzorak micelija je dodat 5 mM V(V), kako bi se utvrdilo akutno delovanje vanadata na respiraciju.

Drugi eksperimenti su podrazumevali praćenje delovanja vanadata na respiraciju micelije stare 20 h i 36 h, kada se ista izloži dužem delovanju vanadata (1 h, 3 h i 5 h). Kao i za vijabilnost, dobijene su micelije stare 20 h i 36 h, koje su filtrirane, resuspendovane u nove medijume i tretirane 5 mM V(V). Pre samog merenja na kiseoničnoj elektrodi svi micelijumi su filtrirani i stavljeni tokom 30 min. u svež minimalni medijum pH 6,7. Zatim su uzorci razblaživani medijumom (4 puta, po potrebi i više) i praćena je promena koncentracije kiseonika. Nakon merenja, uzorci su prebačeni u mikrotube i sušeni u sušnici na 50°C i potom mereni na analitičkoj vagi. Respiracija je izražena kao promena koncentracije kiseonika (nmol) po mg suve mase (mg_{SM}), tokom jednog minuta ($\text{nmol}/\text{mg}_{\text{SM}}/\text{min}$).

3.7. Određivanje sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta

Sadržaj reaktivnih kiseoničnih vrsta u micelijama je određen prema metodi Kalyanaraman i saradnika (Kalyanaraman et al., 2012) u reakciji sa dihlorodihidrofluorescein diacetatom (DCFH-DA), koji se u ćeliji hidrolizuje do DCFH karboksilatnog anjona koji u prisustvu različitih oksidanasa prelazi u dihlorofluorescein (DCF) koji fluorescira, a intenzitet fluorescencije je direktno proporcionalan sadržaju reaktivnih kiseoničnih vrsta, pre svega H_2O_2 u uzorku.

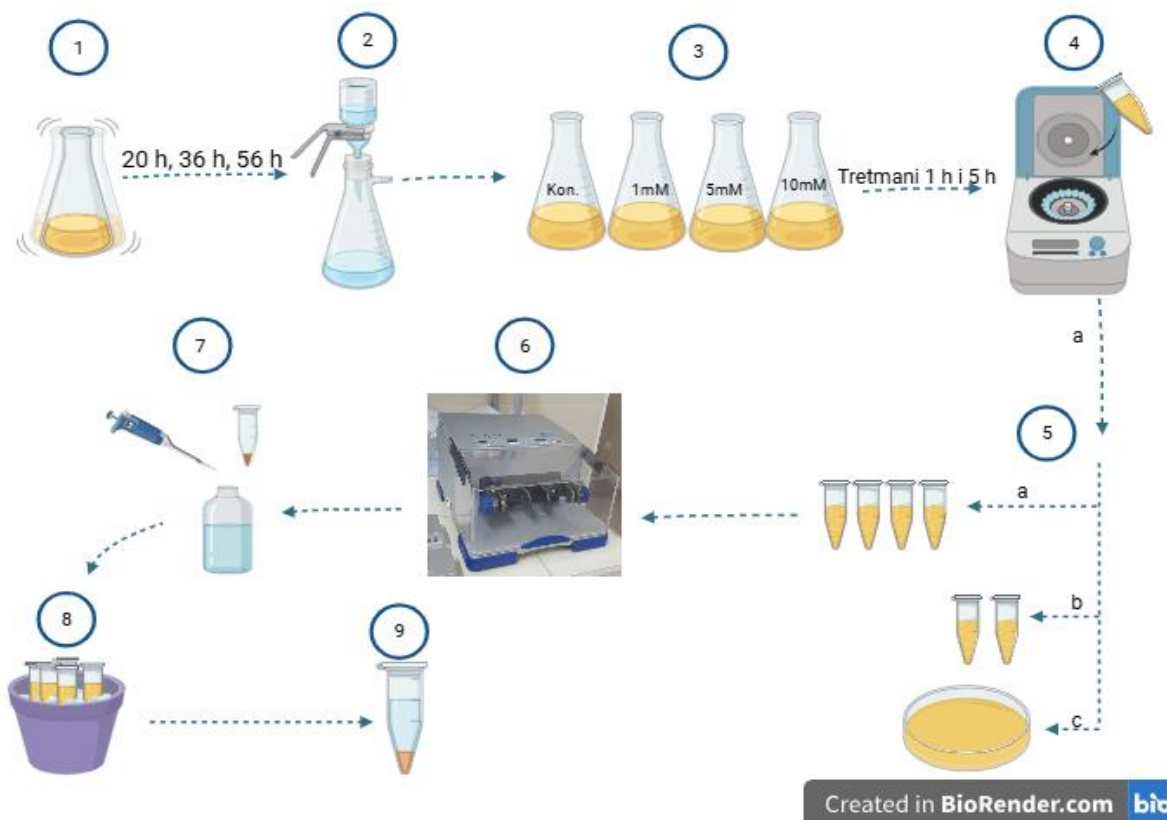
Za ovaj esej micelija je dobijena i tretirana na prethodno opisan način (slika 3.6, do 5. koraka, bez 2 b i 2 c), a sadržaj ROS-a je određen nakon 0,5, 1, 5 i 24 h tretmana. Po završetku tretmana podešena je optička gustina uzoraka, tako što je na spektrofotometru (UV/Vis spektrofotometar Jenway Genova Plus, Engleska) na 750 nm, uzorak rablažen vodom, tako da apsorbanca ne prelazi 0,5. Uzorci su zatim isprani dva puta sa destilovanom H_2O i inkubirani sa bojom (DCFH-DA) 1 h, na sobnoj temperaturi u mraku. Boja je bila rastvorena u 96 % etanolu, (štok koncentracije od 2 mM) i po 5 μL je dodato u svaki uzorak (kako bi finalna koncentracija boje u uzorku bila 20 μM). Ukoliko je to bilo neophodno, uzorci su nakon inkubacije, razblaživani destilovanom H_2O , i po 200 μL svakog je dodato u bunariće crnih mikrotitar ploča sa providnim dnom. Intenzitet fluorescencije DCF je praćen na Tecan Infinite M Nano čitaču mikrotitar ploča (Tecan Group Ltd, Maennedorf, Švajcarska), pri ekscitaciji na 485 nm i emisiji na 530 nm. Rezultati su prikazani kao intenzitet fluorescencije DCF (u arbitarnim jedinicama) i kao odnos intenziteta fluorescencije tretiranih i kontrolnih uzoraka.

3.8. Priprema ekstrakata za enzimске eseje

Za enzimске eseje, micelijumi gajeni bez vanadata (na šejekru i u petri kutijama, u SIV medijumu, pH 4,6) su filtrirani pod vakumom, odvajani u mikrotube (po 200 mg sveže mase) i zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na -70°C do upotrebe. Micelijumi gajeni sa vanadatom su centrifugirani na 4300 x g (Eppendorf resort 5804R, swing-out rotor, Nemačka) na 4°C, 7 min. Supernatanti su odbačeni, a dobijeni micelijumi su ispirani dva puta sa 50 mM Na_2EDTA pH 6,7, kako bi se uklonili ostaci vanadata. Isprani micelijum je zatim podeljen; po 200 mg je odvojeno za enzimске eseje, po 100 mg za određivanje koncentracije ukupnog glutationa, a ostatak micelijuma je liofilizovan i korišćen za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka i koncentracije ukupnih fenola. Liofilizacija je vršena na liofilizatoru oko 48 h, i nakon toga uzorci su čuvani na -70°C.

Micelijumi odvojeni u mikrotube za određivanje enzimске aktivnosti uzoraka (po 200 mg) su zamrzavani u tečnom azotu i homogenizovani na Tissue Lyser aparatu (Qiagen, Nemačka), tako što je dodata kuglica za homogenizaciju (Qiagen, 5 mm, Nemačka), u svaku mikrotubu i homogenizacija se odvijala pri frekvenciji od 30 Hz, dva puta po 30 s. Nakon homogenizacije, uzorak je kratko centrifugiran (16100 x g, 4°C, 1 min., Eppendorf resort 5415R, Nemačka) kako bi se homogenat spustio na dno mikrotube i dodato je po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,2 sa/bez D-izo askorbata i fenilmetilsulfonil fluorida (PMSF). Fosfatni pufer sa dodatkom 2 mM PMSF-a i 2 mM D-izoskorbata je korišćen za ekstrakciju, kako bi se dobili uzorci za određivanje aktivnosti enzima uključenih u glutationski ciklus (glutathion

reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GPx), i glutation transferaze (GST)), dok je sam fosfatni pufer korišćen za ekstrakciju i dobijanje uzoraka za određivanje aktivnosti POD, CAT i SOD. Ekstrakcija je vršena na ledu tokom 15 min. uz konstanto mešanje. Nakon toga, uzorci su centrifugirani na 16100 x g i 4°C, 15 min, a dobijeni supernatanti su odvojeni, zamrznuti na -70°C i korišćeni za enzimske eseje (slika 3.8).



Slika 3.8. Šema dobijanja ekstrakta za enzimske eseje, kada se 20 h, 36 h i 56 h stare micelije, gajene na šejkeru, tretiraju rastućim koncentracijama V(V) (1, 5 i 10 mM), tokom 1 h i 5 h. Opis šeme:

1. Gajenje u kontrolisanim uslovima (na šejkeru, pri rotaciji od 120 rpm, u tečnom minimalnom medijumu pH 6,7).
 2. Filtracija micelija pod vakuumom.
 3. Resuspendovanje micelija u nove SIV medijume, kontrolne i medijume sa V(V), za predstojeće tretmane od 1 h i 5 h; pH svih medijuma je bio podešen na 6,7.
 4. Centrifugiranje, 4300 x g na 4°C, 7 min.; **a**- Ispiranje micelija 2 puta sa 50 mM Na₂EDTA pH 6,7.
 5. Odvajanje micelija i to: **a** - 4 x 200 mg, za enzimske eseje, **b** - 2 x 100 mg, za određivanje koncentracije ukupnog glutationa, **c** - ostatak micelija je liofilizovan i iskorišćen za određivanje koncentracije ukupnih fenola i ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka.
 6. Homogenizacija nakon zamrzavanja u tečnom azotu sa dodatkom kuglice za homogenizaciju. Uzorci micelija su homogenizovani na Tissue Lyser aparatu, pri frekvenciji od 30 Hz, dva puta po 30 s.
 7. Započinjanje ekstrakcije, odnosno dodavanje pufera, u dve mikrotube po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,2, a u druge dve po 1 mL 50 mM K-fosfatnog pufera, pH 7,2 sa 2 mM PMSF-om i 2 mM D-izoskorbatom.
 8. Ekstrakcija na ledu uz konstantno mešanje, 15 min.
 9. Supernatanti za enzimske eseje (dobijeni nakon centrifugiranja na 16100 x g i 4°C, 15 min.).
- Ova šema je napravljena uz pomoć sajta <https://BioRender.com>

3.9. Određivanje koncentracije proteina

Za određivanje koncentracije proteina u ekstraktima koji su korišćeni u enzimskim esejima je korišćena metoda po Bradfordu, a kao standardni protein je korišćen goveđi serum albumin - BSA (eng. bovine serum albumin) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka). Pravljen je štok BSA koncentracije 10 mg/mL i od njega su pravljene standardi, koncentracija od 0,1 do 1 mg/mL BSA. Bradfordov reagens (koji sadrži 0,05% boju Coomassie Brilliant Blue G 250 (CBB), 50% H₃PO₄ i 25% EtOH) je razblaživan sa dejonizovanom H₂O u odnosu 1:4, a zatim filtriran i odmah korišćen. Esej je rađen u mikrotitar pločama za 96 uzoraka sa ravnim dnom, gde je u svaki bunarić sipano po 5 µL uzorka (razblaženog)/standarda i 200 µL Bradfordovog reagensa. Nakon toga, uzorci su inkubirani 30 min. u mraku i na sobnoj temperaturi. Inkubacijom uzorka/standarda sa Bradford reagensom dolazi do reakcije između amino grupa proteina i boje Coomassie Brilliant Blue, čime dolazi do promene apsorpcionog spektra boje, odnosno ona iz smeđe, prelazi u plavu boju. Apsorbanca je merena na 620 nm na ELISA čitaču mikrotitar ploča (model DV 990BV6, GDV, Italija). Intenzitet izmerene apsorbance je bio proporcionalan koncentraciji proteina iz uzorka. Na osnovu dobijenih apsorbanca uzoraka i uz pomoć standardne prave ($R^2 \geq 0,98$) određena je koncentracija proteina u supernatantima i izražena u mg/mL.

3.10. Enzimski esej

Aktivnost svih enzima izuzev katalaza je određivana spektrofotometrijski na Cary 60 UV-Vis spektrofotometru (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Svi dobijeni podaci su zatim obrađivani u Logger Pro programu (verzija 3.4.6.), a potom je preračunavana aktivnost enzima i izražavana kao aktivnost po mg proteina (U/mg prot). Jedna katalitička jedinica se definiše kao ona količina enzima koja katalizuje nestajanje 1 µmol supstrata ili nastajanje 1 µmol produkta tokom jednog minuta pod uslovima esej.

3.10.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti peroksidaza (POD) (EC 1.11.1.7)

Aktivnost peroksidaza je određivana spektrofotometrijski prema protokolu Chance i Maehly (Chance & Maehly, 1955). Praćena je produkcija purpogalina na 420 nm, u prisustvu H₂O₂, usled delovanja peroksidaza iz uzorka. Napravljen je 1 M štok pirogalola i 1 M štok H₂O₂ i u reakcionu smešu je dodato 8 µL H₂O₂ (finalna koncentracija H₂O₂ je bila 8 mM), 42 µL pirogalola (finalna koncentracija pirogalola je bila 42 mM), 900 µL 50 mM K-fosfatnog pufer, pH 6 i 50 µL uzorka. Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 1 mL.



Enzimska aktivnost je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$A_{\text{POD}} = \frac{V_k \cdot \Delta A}{12 \cdot V_u} \text{ (U/mL)}$$

Gde je:

V_k - ukupna zapremina rastvora u kiveti (mL)

ΔA - promena apsorbance u minuti na 420 nm

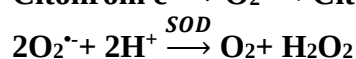
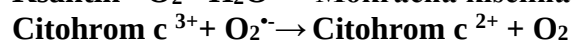
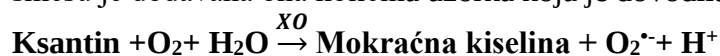
V_u - zapremina uzorka u kiveti (mL)

12 – molarni ekstinkcioni koeficijent za purpogalin na 420 nm (mM⁻¹cm⁻¹)

3.10.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) (EC 1.15.1.1)

Aktivnost superoksid dismutaza je određivana spektrofotometrijski prema protokolu McCord and Fridovich (McCord & Fridovich, 1969). Praćena je redukcija fericitohroma c do ferocitohroma c, čime

dolazi do porasta apsorbanca na 550 nm. Redukcija je vršena od strane superoksid anjon radikala, koji nastaje u reakciji između ksantina i kiseonika, koju katalizuje ksantin oksidaza. Neophodni reagensi u ovom eseu su bili: 50 mM K-fosfatni pufer, pH 7,8 koji je sadržao 1 mM EDTA i 0,02 mM NaN₃, 0,5 mM ksantin (rastvaran u 1 mM NaOH, uz zagrevanje), 0,2 mM fericitohrom c i ksantin oksidaza (XO) (2,27 mg (X4376- 5UN, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka) je rastvarano u 1 mL K-fosfatnog pufera). Reakciona smeša je sadržala 0,05 mM ksantin, 0,01 mM citohrom c, ksantin oksidazu (najčešće od 20 do 30 µL), uzorak (3-5 µL) i pufer do ukupne zapremine od 1 mL. Ksantin oksidaza se u reakcionu smešu dodavala u onoj zapremini koja je izazivala promenu apsorbanca od 0,025/min. Pošto su prvo dodati pufer, ksantin, fericitohrom c i ksantin oksidaza najpre je dolazilo do porasta apsorbanca usled redukcije fericitohroma. Dodatkom uzorka, dolazilo je do usporavanja porasta apsorbanca kao posledica aktivnosti SOD, koja vrši dismutaciju O₂⁻, čime se smanjuje redukcija fericitohroma c. U reakcionu smešu je dodavana ona količina uzorka koja je dovođila do 50 % inhibicije redukcije citohroma.



Jedna katalitička jedinica SOD je definisana kao ona količina enzima koja dovodi do inhibicije 50 % formiranja ferocitohroma c, a procenat inhibicije je izračunat na osnovu sledeće formule:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\Delta Au - \Delta Au_z}{\Delta Au} * 100$$

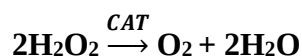
Gde je:

ΔAu - promena apsorbanca u minuti na 550 nm, kada se u kivetu dodaju svi reagensi sem uzorka

ΔAu_z - promena apsorbanca u minuti na 550 nm, nakon dodatka uzorka

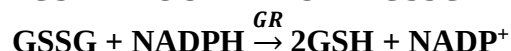
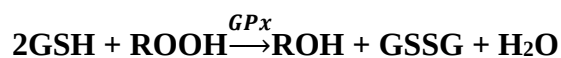
3.10.3. Polarografsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT) (EC 1.11.1.6)

Aktivnost katalaze je praćena polarografski na kiseoničnoj elektrodi Klarkovog tipa (Hansatech Oxygraph, Engleska), po metodi Luisa i saradnika (Del Río et al., 1977). Praćeno je povećanje koncentracije kiseonika usled razgradnje H₂O₂, delovanjem katalaze iz uzorka. Reakciona smeša je sadržala 12 mM H₂O₂, 100 mM K-fosfatni pufer pH 7,5 i uzorak (oko 5 µL). Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 1 mL i reakcija je započinjala dodavanjem uzorka.



3.10.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GPx) (EC 1.11.1.9.)

Aktivnost glutation peroksidaze je određivana spektrofotometrijski prema protokolu Drotar i saradnika (Drotar et al., 1985). GPx katalizuje reakciju u kojoj se GSH oksiduje do GSSG, a kumen hidroperoksid (ROOH) redukuje, a zatim se nastali GSSG redukuje od strane GR u prisustvu NADPH. Prati se pad apsorbanca na 340 nm, kao posledica smanjenja koncentracije NADPH, koje je direktno proporcionalno aktivnosti GPx iz uzorka. Za ovaj esej su bili neophodni sledeći reagensi: 100 mM GSH, 100 mM kumen hidroperoksid, 10 mM NADPH, GR (2 µL komercijalnog rastvora (G3664-500UN, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka) je rastvoreno u 510 µL K-fosfatnog pufera) i 50 mM K-fosfatni pufer sa 1 mM EDTA, pH 7. Reakciona smeša je sadržala 2 mM GSH, 2 mM kumen hidroperoksida, 0,2 mM NADPH, 5 µL GR, uzorak (20 µL) i pufer do 1 mL.



Enzimski aktivnost je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$A_{GPx} = \frac{Vk \cdot \Delta A}{6,22 \cdot Vu} \text{ (U/mL)}$$

Gde je:

Vk - ukupna zapremina rastvora u kivetu (mL)

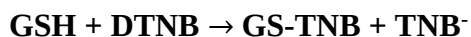
ΔA - promena apsorbance u minuti na 340 nm

Vu - zapremina uzorka u kivetu (mL)

6,22- ekstinkcioni koeficijent za NADPH na 340 nm ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

3.10.5. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation reduktaze (GR) (EC 1.8.1.7)

Aktivnost glutation reduktaze je određivana spektrofotometrijski prema protokolu Smith i Vierheller (Smith et al., 1988). Praćen je porast apsorbance na 412 nm, koji je posledica nastanka žutog produkta, 2-nitro-5-tiobenzojeve kiseline (TNB), koja nastaje reakcijom GSH i 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB). GSH nastaje redukcijom GSSG od strane GR u prisustvu NADPH. Korišćeni su sledeći reagensi: 7,5 mM DTNB, 10 mM NADPH, 50 mM GSSG i 50 mM K-fosfatni pufer sa 1 mM EDTA, pH 7,5. Ukupna zapremina reakcione smeše je iznosila 1 mL i sadržala je 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG, pufer i uzorak (50-100 μL).



Enzimski aktivnost je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$A_{GR} = \frac{Vk \cdot \Delta A}{14,15 \cdot Vu} \text{ (U/mL)}$$

Gde je:

Vk - ukupna zapremina rastvora u kivetu (mL)

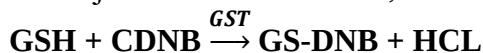
ΔA - promena apsorbance u minuti na 412 nm

Vu - zapremina uzorka u kivetu (mL)

14,15 - ekstinkcioni koeficijent za TNB na 412 nm ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

3.10.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti glutation S transferaze (GST) (EC 2.5.1.18)

Aktivnost glutation S transferaze je određivana spektrofotometrijski prema protokolu Habig i saradnika (Habig et al., 1974). Praćen je porast apsorbance na 340 nm, kao posledica nastanka GS-DNB konjugata, koji apsorbuje na toj talasnoj dužini. Porast apsorbance je bio direktno proporcionalan aktivnosti GST iz uzorka. Neophodni reagensi za ovaj esej su bili: 100 mM GSH, 100 mM 1-hloro-2,4-dinitrobenzen ((CDNB) - rastvara se u 96 % etanolu i uz zagrevanje) i 100 mM K-fosfatni pufer pH 6,5. Reakciona smeša je sadržala 1 mM GSH, 1 mM CDNB, 100 μL uzorka i pufer do 1 mL.



Enzimski aktivnost je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$A_{GST} = \frac{Vk \cdot \Delta A}{9,6 \cdot Vu} \text{ (U/mL)}$$

Gde je:

Vk - ukupna zapremina rastvora u kivetu (mL)

ΔA - promena apsorbance u minuti na 340 nm

Vu - zapremina uzorka u kivetu (mL)

9,6 - ekstinkcioni koeficijent za GS-DNB konjugat na 340 nm ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

3.11. Nativna elektroforeza i detekcija izoformi CAT i SOD

Nativna elektroforeza za razdvajanje proteina je rađena na poliakrilamidnom gelu, u vertikalnom sistemu za elektroforezu (BIO-RAD, Mini-PROTEAN Tetra System, SAD). Poliakrilamidni gel predstavlja selektivno "sito", koje omogućava razdvajanje proteina na osnovu veličine. Elektroforeza se ogleda u razdvajanju proteina, zahvaljujući odgovarajućem električnom polju koje omogućava njihovo kretanje kroz gel od negativno naelektrisanе katode ka pozitivno naelektrisanju anodi, pri čemu manji proteini putuju brže, tj. na ploči pređu duži put u poređenju sa većim proteinima. U nativnoj elektroforezi, put koji protein pređe zavisi od njegove veličine i ukupnog naelektrisanja. Ova metoda je korišćena za razdvajanje i detekciju izoformi CAT i SOD. Za sam proces elektroforeze najbitnije je napraviti odgovarajuće gelove, čiji sastav zavisi od enzima koji se analizira (tabele 3.11.1 i 3.11.2). Pravljen je gel debljine 1 mm i dimenzija 10 x 10 cm. Gelovi su pravljeni od mešavine akrilamida i bisakrilamida (komercijalna 30% mešavina, (A3699, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka)), amonijumpersulfata (APS), Tris pufera i tetrametiletildiamina (TEMED). TEMED i APS imaju ulogu u polimerizaciji gela i dodaju se neposredno pre nalivanja gelova. Najpre je napravljena smeša za gelove (u tečnom agregatnom stanju) i u nosače su stavljena dva stakla i nalivan je gel, a pri vrhu su stavljani plastični češljići, čija je uloga bila da naprave bunariće u koje su nanošeni uzorci. Nakon polimerizacije gela (oko 45 min), skidani su češljići i u bunariće su naneti uzorci (mikrošpicem ili pipetom) u onoj zapremini koja je sadržala 20-25 μg proteina. Radi lakšeg praćenja toka elektroforeze, uzorci se mogu pomešati sa glicerolom kako bi se povećala viskoznost, a ukoliko su bezbojni, može se dodati boja (CBB). Nakon što su uzorci uneti u bunariće, gelovi sa uzorcima su stavljani u kadicu za elektroforezu, u koju je nalivan pufer za razdvajanje, Tris-glicinski (0,025 M Tris i 0,192 M glicin, pH 8,3) i započet je proces elektroforeze. Nakon završene elektroforeze, gelovi su ispirani nekoliko puta destilovanom vodom, a zatim bojeni, kako bi se detektovala aktivnost enzima u gelu.

3.11.1. Detekcija izoformi CAT

Za razdvajanje izoformi CAT korišćen je 5% gel za koncentrovanje i 8 % gel za razdvajanje, čiji je sastav dat u tabeli (Tabela 3.11.1). Gel za razdvajanje je nalivan prvi i to oko 4 mL po ploči, preko koga je nalivana mala količina dejonizovane vode, kako bi se obezbedilo da tokom polimerizacije površina gela za razdvajanje ostane ravna. Nakon polimerizacije, filter papirom je pažljivo uklonjena voda i iznad gela za razdvajanje je nanet gel za koncentrovanje (oko 1 mL po ploči).

Tabela 3.11.1. Sastav gelova za razdvajanje izoformi CAT.

Komponente gela	5% Gel za koncentrovanje		8% Gel za razdvajanje	
	V komponenti (mL) u ~10 mL	Koncentracija komponenti u gelu	V komponenti (mL) u ~20 mL	Koncentracija komponenti u gelu
1,5 M Tris, pH 8,8			5 mL	0,375 M
1 M Tris, pH 6,8	1,25 mL	0.13 M		
30 % akrilamid mix	1,7 mL	5%	5,3 mL	8%
10 % APS	0,1 mL	0,1%	0,2 mL	0,1%
TEMED	0,01 mL	8,6 mM	0,012 mL	5,2 mM
Dest. H ₂ O	6,9 mL		9,5 mL	

Nakon polimerizacije gela za koncentrovanje u bunariće je dodavano po 15 µL uzoraka. Elektroforeza je tekla u pomenutim uslovima, Tris-glicinskom puferskom sistemu (0,025 M Tris i 0,192 M glicin, pH 8,3), na sobnoj temperaturi, pri konstantnoj jačini struje od 50 mA po gelu, tokom prvih 12 min. (dok se proteini kreću kroz gel za koncentrovanje), a potom pri konstantnom naponu od 200 V tokom kretanja proteina kroz gel za razdvajanje, u trajanju od 45 minuta. Nakon završetka elektroforeze gelovi su pažljivo isprani destilovanom vodom, 4-5 puta, a zatim bojeni.

Katalaze su detektovane prema metodi Woodbury et al. (Woodbury et al., 1971). Gel je najpre inkubiran u 5 mM H₂O₂ tokom 15 min, a zatim ispran destilovanom vodom i inkubiran u rastvoru koji je sadržao 1% K₃Fe(CN)₆ i 1% FeCl₃. Nakon inkubacije, gel se boji u plavo, kao posledica redukcije gvožđa u prisustvu H₂O₂ i formiranja ferocijanida. Pošto katalaza dovodi do razgradnje H₂O₂, na mestima gde se ona u gelu nalazi, gel ostaje neobojen.

3.11.2. Detekcija izoformi SOD

Kako bi se detektovale izoforme SOD korišćena je metoda po Beauchamp and Fridovich-u (Beauchamp & Fridovich, 1971) i rađena je elektroforeza u 10% gelu za razdvajanje, čiji je sastav prikazan u tabeli 3.11.2. Nalivano je 5 mL gela po ploči i nakon polimerizacije gela dodati su uzorci u bunariće u zapreminama od 6-13µL (zapremina uzoraka koja je sadržala 20-25 µg proteina).

Tabela 3.11.2. Sastav gela za razdvajanje izoformi SOD.

Komponente gela	10% Gel za razdvajanje	
	Zapremina komponenti (mL) Pravljeno : 20 mL	Koncentracija komponenti u gelu
1,5 M Tris, pH 8,8	5 mL	0,375 M
30 % akrilamid mix	6,7 mL	10%
10 % APS	0,2 mL	0,1%
TEMED	0,008 mL	3,4 mM
Dest. H ₂ O	8,1 mL	

Elektroforeza je tekla u Tris-glicinskom puferu (0,025 M Tris i 0,192 M glicin, pH 8,3), na sobnoj temperaturi, pri konstantnoj jačini struje od 50 mA, tokom 1 h -1 h i 30 min. Nakon završene elektroforeze, gelovi su isprani 4-5 puta destilovanom vodom i bojeni.

Gelovi su bojeni u 50 mM K-fosfatnom puferu (pH 7,8) u kojem su dodati 1 mM EDTA, 0,3 mM nitroplavi tetrazolijum hlorid (engl. nitroblue tertazolium chloride, NBT), 0,08 mM riboflavin i 0,2 mM TEMED. Gelovi su inkubirani u pomenutom rastvoru 30 min. u mraku, na sobnoj temperaturi i nakon inkubacije su isprani destilovanom vodom i osvetljeni fluorescentnom lampom tokom 15 min, radi izazivanja fotohemijske reakcije. Osvetljivanjem riboflavina dolazi do nastanka superoksid anjon radikala koji reagujući sa NBT formira tamnoplavi formazanski produkt. SOD iz uzorka vrši dismutaciju $O_2^{\cdot-}$, čime se sprečava ova reakcija i na mestima gde je SOD prisutna, gel ostaje nebojen.

Distinkcija između formi SOD je izvršena inkubacijom u rastvoru inhibitora tokom 30 min, pre inkubacije u boji. Kao inhibitori korišćeni su 5 mM KCN i 5 mM H_2O_2 (koji su rastvoreni u 50 mM K-fosfatnom puferu, pH 7,8). KCN inhibira Cu/Zn-SOD, dok H_2O_2 inhibira Cu/Zn-SOD i Fe-SOD (Ma et al., 2017). Pošto je pravljeno više gelova, jedan gel je tretiran samo bojom (kontrolni gel), a ostali su tretirani i inhibitorom i bojom i na taj način su uočene odgovarajuće izoforme SOD. Jedan od gelova je tretiran i 5 mM NaN_3 , koji je prema literaturi (Ma et al., 2017), inhibitor sve tri forme (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD i Mn-SOD).

3.12. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka i koncentracije neenzimskih antioksidanasa

Osim enzima, kako bi se dobila jasnija slika o uticaju vanadata na sisteme zaštite od oksidativnih oštećenja gljive *P. blakesleeanus*, određena je i ukupna antioksidativna aktivnost uzorka i koncentracije ukupnih fenola i ukupnog glutathiona. Micelije dobijene i tretirane na prethodno opisan način (slika 3.6, do 5. koraka, bez 2 b i 2 c i slika 3.8, do 5 c koraka) su izlagane vanadatu tokom 1 h i 5 h. Ukupna antioksidativna aktivnost uzorka i koncentracija ukupnih fenola su određeni spektrofotometrijski na UV-Vis spektrofotometru (Agilent Technologies, SAD), dok je koncentracija ukupnog glutathiona određen na ELISA čitaču mikrotitar ploča (model DV 990BV6, GDV, Italija).

3.12.1. Ekstrakcija i određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka

Kako bi se odredila ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakta rađen je esej sa 2,2'-azino bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonskom kiselinom) diamonijumovom soli (ABTS) (Re et al., 1999). Za ovaj test je korišćen liofilizovani micelijum (oko 50 µg), u koji je dodata polovina zapremine ekstrakcionog rastvarača i koji je potom homogenizovan na Tissue Lyser aparatu, pri frekvenciji od 30 Hz, dva puta po 30 s (uz dodatak kuglice za homogenizaciju. Kao ekstrakcioni rastvarač najbolje se pokazao 50% etanol, (tabela 3.12.1) i odnos mase micelijuma: zapremine rastvarača je bio 1:8. Nakon homogenizacije dodat je ostatak ekstrakcionog rastvarača i uzorci su inkubirani 4 min. uz konstanto mešanje, a potom centrifugirani na 16100 x g 10 min. na 4°C. Dobijeni supernatanti su odmah korišćeni za esej.

Tabela 3.12.1. Poređenje ekstrakcionih rastvarača za određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti uzorka u 2 nezavisna uzorka, liofilizovane micelije.

	Rastvarači	
	80% metanol	50% etanol
Mmol EAK/ g_{SM}	19.9	70.5
u 2 nezavisna uzorka		
(lioofilizovane micelije)	15.2	64.2

Sam esej se ogledao u praćenju pada apsorbance na 730 nm. Reakciona smeša (1 mL) je sadržala 50 mM K-fosfatni pufer pH 7,5, 2 mM ABTS, 15 μ M H₂O₂, 0,25 μ M peroksidazu iz rena tipa 2, i 20 μ L uzorka/standarda. Najpre u reakcionoj smeši, u prisustvu peroksidaze i H₂O₂, od ABTS nastaje ABTS radikal koji je plave boje, sa maksimum apsorbance na 730 nm, a dodatkom uzorka koji sadrži antioksidanse, smanjuje se koncentracija ABTS radikala, samim tim i obojenost reakcione smeše. Prvo je u kivetu dodato sve osim uzorka, praćena je apsorbance tokom 20 s, a zatim je dodat uzorak i praćen je pad apsorbance. Što je pad apsorbance bio veći, to je ukazivalo na veću koncentraciju antioksidanasa u uzorku. Kao standard je korišćen rastvor askorbinske kiseline u 50% etanolu, a standardna prava je obuhvatala opseg koncentracija od 0,1 do 1 mM ($R^2 \geq 0,98$). Koncentracija antioksidanasa se na osnovu apsorbance izračunavala iz standardne prave i izražavala se kao mmol ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu suve mase (mmol EAK/g_{SM}).

3.12.2. Ekstrakcija i određivanje koncentracije ukupnih fenola

Nakon liofilizacije, micelijum (oko 50 μ g) je odvajan u mikrotube i homogenizovan na Tissue Lyser aparatu tako što je dodata kuglica za homogenizaciju i polovina zapremine ekstrakcionog rastvarača u svaku mikrotubu. Homogenizacija se odvijala pri frekvenciji od 30 Hz, dva puta po 30 s. Kao ekstrakcioni rastvarač korišćen je 80% metanol, pošto se pokazao kao najefikasniji (tabela 3.12.2), a odnos mase micelijuma : zapremine rastvarača je bio 1:10. Po završetku homogenizacije dodata je druga polovina zapremine rastvarača. Nakon 4 min. inkubacije uz konstantno mešanje, uzorci su centrifugirani na 16100 x g 10 min. na 4°C, a dobijeni supernatanti su odmah korišćeni za esej.

Tabela 3.12.2. Poređenje ekstrakcionih rastvarača za određivanje sadržaja ukupnih fenola u 2 nezavisna uzorka, liofilizovane micelije.

Rastvarači			
	80% metanol	80% etanol	50% etanol
Mmol EGK/ g_{SM} u 2 nezavisna uzorka (lioofilizovane micelije)	186.8	153.7	182.7
	210.7	140.8	182.1

Koncentracija ukupnih fenola je određivana spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu metode (Singleton & Rossi, 1965). Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (koji se sastoji od fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline), dolazi do oksidacije fenola, a redukcije samog reagensa, koji iz žute boje prelazi u plavu, sa maksimumom apsorbance na 724 nm. Kao standard je korišćen rastvor galne kiseline u 80% metanolu, a standardna prava je obuhvatala opseg koncentracija od 0,1 do 2 mM ($R^2=0,998$). U reakcionu smešu je dodat razblaženi uzorak/standard (50 μ L) i 0,2 M Folin-Ciocalteu reagens (475 μ L), reakciona smeša je promešana, a nakon 3 min. je dodat 0,25 M Na₂CO₃ (475 μ L). Zatim su uzorci inkubirani 60 min. u mraku, na sobnoj temperaturi, nakon čega je očitavana apsorbance. Koncentracija ukupnih fenola je dobijena na osnovu standardne prave i izražena kao mmol ekvivalenata galne kiseline po gramu suve mase (mmol EGK/g_{SM}).

3.12.3. Određivanje koncentracije glutaciona

Za određivanje koncentracije glutaciona korišćen je svež micelijum (100 mg), koji je nakon zamrzavanja u tečnom azotu homogenizovan na Tissue Lyser aparatu pri frekvenciji od 30 Hz, dva puta po 30 s (uz

dodatak kuglice za homogenizaciju). U homogenizovane uzorke je zatim dodato po 500 μL 0,1 M HCl koja je sadržala 1 mM EDTA i 43 μL 9,2 M HClO_4 . Uzorci su promešani na kratko pa je dodato po 500 μL 2 M K_2HPO_4 u svaki. Dodatkom kiselina, uzorci su deproteinizovani taloženjem, dok je K_2HPO_4 korišćen za neutralizaciju. Nakon centrifugiranja (na 16100 x g, 15 min. na 4°C), dobijeni su supernatanti koji su odmah korišćeni za esej.

Ukupna koncentracija glutationa je određivana spektrofotometrijski prema metodi Matsumoto i saradnika (Matsumoto et al., 1996), koja je prilagođena za ELISA čitač. Praćena je promena, odnosno porast apsorbance na 405 nm, tokom 6 minuta, pri čemu su apsorbance standarda i uzorka merene na svaka 2 minuta (0 min, 2 min, 4 min. i 6 min). Na osnovu pomenutih merenja standarda konstruisana je standardna prava. Kao standard je korišćen redukovani glutation (GSH), a standardna prava je obuhvatala opseg koncentracija od 2-20 $\mu\text{g/mL}$, ($R^2 \geq 0,98$). Sama promena apsorbance je poticala od TNB, koji nastaje u reakciji između DTNB i GSH. U bunarčić, sa ravnim dnom, je dodato: 0,21 mM NADPH, 0,6 mM DTNB, 2 μL GR (G3664-500UN, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka, razblažena 5 puta u Na-fosfatnom puferu), 30 μL standarda/razblaženog uzorka i 125 mM Na fosfatnog pufera pH 7,5 koji je sadržao 6,3 mM EDTA do ukupne zapremine od 300 μL . Uloga GR se ogledala u tome da se sav GSSG, u prisustvu NADPH, redukuje do GSH, koji reaguje sa DTNB, pri čemu nastaje TNB, žute boje.

Koncentracija ukupnog glutationa je određena sa standardne prave i izražena u μg po gramu sveže mase ($\mu\text{g/gSv.M}$).

3.13. Određivanje sadržaja vanadijuma u micelijumu

Sadržaj vanadijuma, odnosno njegovo usvajanje od strane micelije gljive je određen korišćenjem, analitičke tehnike optičke emisije spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). ICP spektroskopija je analitička tehnika koja se koristi za određivanje sadržaja hemijskih elemenata u različitim uzorcima. Uzorak koji je prošao proces digestije se najpre raspršuje u fine kapljice i uvodi u plazmu i atomi i joni koji se nađu u plazmi bivaju pobuđeni. Po povratku u osnovno energetska stanje, oni emituju svetlost specifičnih talasnih dužina, koja se detektuje odgovarajućim spektrometrom. Intenzitet emitovane svetlosti proporcionalan je koncentraciji elementa u uzorku i uz pomoć kalibracione krive, dobijene sa standardnim rastvorima poznatih koncentracija, određuje se količina analiziranog elementa. Prednosti ove metode su: jednostavna priprema uzorka (koja uključuje digestiju kiselinama/bazama i peroksidom), mala potrebna količina uzorka, mogućnost analize velikog broja uzorka u relativno kratkom vremenskom periodu, kao i identifikacija brojnih elemenata, kako esencijalnih metala, tako i metala koji ispoljavaju toksične efekte, te sama metoda ima široku primenu (Wilschefski & Baxter, 2019).

Pored vanadijuma, u uzorcima je određen i sadržaj fosfora. Koncentracije ova dva elementa su određene u micelijama, ali i medijumima u kojima je micelija rasla. Za ovaj eksperiment micelija je dobijena i tretirana na prethodno opisan način (slika 3.6, do 4. koraka, bez 2 b i 2 c), a tretman vanadatom je trajao 24 h. Nakon tretmana uzorci micelija su centrifugirani na 4300x g na 4°C, 5 minuta, isprani dva puta sa destilovanom vodom i stavljeni u sušnicu na 50°C tokom 48 h. Supernatanti dobijeni nakon centrifugiranja su zamrznuti do analize. Mikrotalasna digestija uzoraka (500 mg) je urađena u mikrotalasnom digestoru (ETHOS EASI, Milestone, Italija), sa 2 mL H_2O_2 (30%) (Merck, Nemačka) i 8 mL ultra-čiste azotne kiseline (65%) (Merck, Nemačka). Digestija je izvedena tokom 45 min., na temperaturi od 180°C. Nakon digestije i hlađenja uzoraka do sobne temperature, svaki je razblažen dejonizovanom vodom do ukupne zapremine od 20 mL. Slepe probe, ukupno njih četiri, su takođe pripremane, kako bi se proverilo potencijalno prisustvo analiziranih elemenata u reagensima koji su korišćeni. Supernatanti su neposredno pre analize odmrznuti, filtrirani kroz špric sa odgovarajućim filterom (0,2 μm) i razblaženi mešavinom HNO_3 i H_2O_2 identičnog sastava kao za micelijumu.

ICP-OES merenje je izvršeno na instrumentu model Avio 200, Perkin Elmer (ICP-OES, Avio 200, Perkin Elmer, SAD), na sledećim talasnim dužinama: 292,464 nm za vanadijum (V) i 213,617 nm za fosfor (P).

3.14. Određivanje relativnog sadržaja lipida, proteina i ugljenih hidrata u micelijumu primenom infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom

Primena infracrvene spektroskopije sa Furijevom transformacijom (FTIR) omogućila je dobijanje spektara koji predstavljaju „metabolički otisak“ micelijuma gljive, reflektujući prisustvo građivnih biomolekula poput lipida, proteina, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata. Ovom metodom uzorak micelijuma se izlaže infracrvenom zračenju širokog spektralnog opsega (0.05 do 0.5 eV), koje u uzorku pobuđuju vibracije veza u molekulu, kao što su O-H, N-H, C-H, C=O i druge (Naumann, 2015). Specifične hemijske veze selektivno apsorbuju IR zračenje na definisanim talasnim brojevima, što rezultira smanjenjem intenziteta prenetog zračenja kroz uzorak. Dobijeni FTIR spektar sadrži više signala koje se pojavljuju na različitim talasnim brojevima i odgovaraju specifičnim funkcionalnim grupama prisutnim u biomolekulima micelijuma (Naumann, 2015). Za ovaj eksperiment micelija je dobijena i tretirana na prethodno opisan način (slika 3.6, do 4. koraka, bez 2 b i 2 c), a izlaganje vanadatu je trajalo 5 h i 24 h. Nakon tretmana, micelijumi su isprani destilovnom vodom, dva puta, a zatim zamrznuti u tečnom azotu i potom liofilizovani. Liofilizacija je vršena na liofilizatoru 48 h (po potrebi i duže) i nakon toga uzorci su homogenizovani 10 minuta pri frekvenciji od 30 Hz sa čeličnim kuglicama prečnika 1 mm na homogenizeru (Mixer Mill MM400, Retsch, GmbH, Nemačka). Potom su uzorci analizirani na FTIR spektrometru (Perkin Elmer, SAD), na kome su bili podešeni sledeći parametri snimanja: broj akumulacija 16, rezolucija 1 cm^{-1} u opsegu talasnih brojeva od 400 do 4000 cm^{-1} i sila pritiska u opsegu od 95 do 100 prema skali uređaja. Svim spektrima je automatski izvršena korekcija bazne linije i prisustvo vodene pare pomoću algoritama za korekciju u softveru Spectrum 10. Analiza spektara je rađena u Quasar 1.10.2 softveru.

3.15. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je rađena s ciljem procene značajnosti razlika između tretiranih i kontrolnih uzoraka. Za obradu podataka su korišćeni softverski paketi **GraphPad Prism 6.01** i **SigmaPlot 11.0**, a poređenje između grupa vršeno je primenom odgovarajućih statističkih testova.

Eksperimenti su izvođeni kroz više serija gajenja ($n \geq 2$), pri čemu je svaka serija obuhvatala najmanje po dva uzorka u kontrolnoj i tretiranoj grupi (ukupno $n \geq 4$). Tokom određivanja aktivnosti enzimskih i koncentracija neenzimskih antioksidanasa, zabeležene su izražene varijacije između različitih serija. Iako je efekat vanadata bio jasno uočen i ponovljiv u različitim eksperimentalnim serijama, zbog pomenutih razlika bilo je neophodno izvršiti normalizaciju podataka u odnosu na kontrolu. Normalizacija je sprovedena unutar svake serije tako što je prosečna vrednost kontrolne grupe postavljena na 100%, a vrednosti ostalih uzoraka izražene su relativno u odnosu na tu vrednost. Za statističku obradu normalizovanih podataka (aktivnosti antioksidativnih enzima, ukupnu antioksidativnu aktivnost uzorka, ukupni sadržaj glutaciona i fenola), korišćen je neparametarski Man-Vitni test ($n = 4-6$).

Podaci koji nisu zahtevali normalizaciju, (npr. određivanje koncentracije ROS-a, određivanje sadržaja vanadijuma i dr.) su analizirani **jednofaktorskom analizom varijanse (jednofaktorska ANOVA- One Way ANOVA)**, praćeni preporučenim testovima kao što su **Holm-Sidak** i **Tukijev test**.

Rezultati su vizuelno prikazani u softveru **GraphPad Prism 6.01**.

Kako bi se utvrdila međuzavisnost između faze razvoja i tretmana vanadatom, na sadržaj gradivnih biomolekula micelijuma (podaci dobijeni nakon FTIR analize), primenjena je **analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis PCA)** zasnovana na **matrici korelacija**. PCA je korišćena za sumiranje efekata koncentracije vanadata i faze razvoja na FTIR spektralne karakteristike, kao i na sadržaj lipida i ugljenih hidrata u miceliji. Analiza je izvršena korišćenjem softvera **XLSTAT (verzija 7.5.2, Addinsoft)**.

4. Rezultati

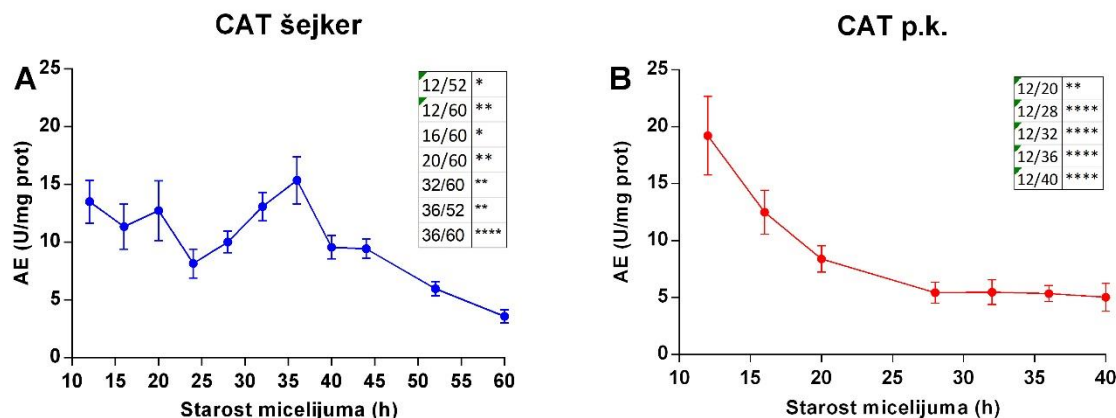
4.1. Određivanje aktivnosti antioksidativnih enzima tokom rasta micelijuma *P. blakesleeanus* na pH=4,5

Utvrđeni optimalni pH za rast micelije *P. blakesleeanus* je ~ 4,5 (Martínez-Cadena et al., 1995). Krive rasta na ovoj pH su određene u master radu Nikolića (Nikolić, 2014) i to u stacionarnim uslovima (petri kutije) i pri rotaciji (na šejkeru u erlenmajerima). Dobijeni rezultati su pokazali da je moguće dobiti gotovo duplo veću biomasu pri gajenju na šejkeru, kao i da je, očekivano, prilikom gajenja na šejkeru inhibiran razvoj sporangiofora. U ovoj tezi su ispitane aktivnosti CAT, POD i SOD, tokom perioda obuhvaćenog pomenutim krivama rasta, na svaka 4 sata, da bi se utvrdilo da li i na koji način promena uslova gajenja utiče na aktivnost navedenih antioksidativnih enzima.

Micelija gljive je gajena u minimalnom medijumu pH 4,6, na šejkeru pri rotaciji od 120 rpm, ili u petri kutijama (stacionarno gajenje). Aktivnosti CAT, SOD i POD su određene u micelijama gljiva starosti od 12 h do 60 h (gajenih na šejkeru) i starosti od 12 h do 40 h (gajenih u p.k), odnosno do vidljive pojave sporangiofora. Ova dva načina gajenja su se odvijala pod istim uslovima, u pogledu medijuma, svetlosti i temperature, ali velika je razlika u tome što se pri rotaciji centrifugalnom silom inhibira negativni gravitropski odgovor, dok su micelije usled konstantnog mešanja, izložene većoj količini kiseonika. Stoga ovakav način gajenja može doprineti boljem prinosu, odnosno većoj biomasi micelije, u poređenju sa stacionarnim gajenjem (u p.k), a osim promene u biomasi, gajenje na šejkeru može uticati i na aktivnost enzima, nivo proteina, polisaharida, raznih metabolita i drugo (Pilafidis et al., 2024).

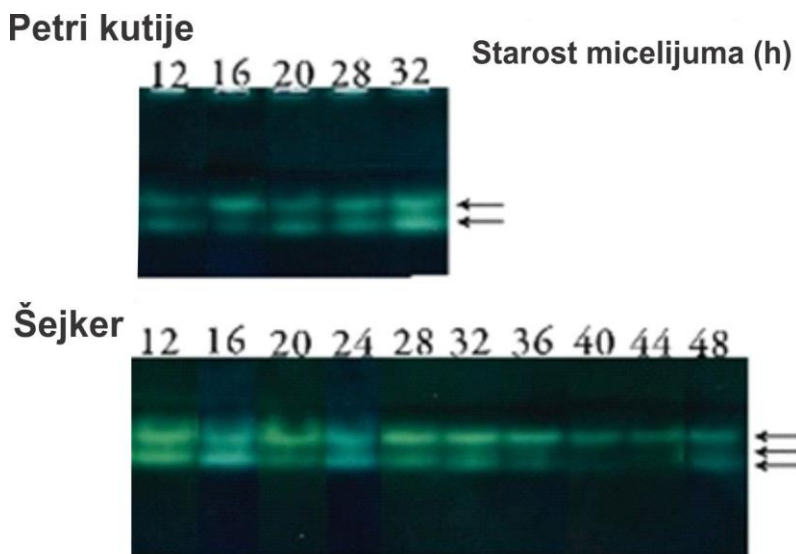
4.1.1. Aktivnost CAT

Katalaza je enzim zadužen za uklanjanje H_2O_2 i drugih peroksida i aktivnost ovog enzima je izražena pre svega kod mlađih micelija gljiva u eksponencijalnoj fazi razvoja (De Castro et al., 2013), ali postoje i izoforme ovog enzima, koje se javljaju i u kasnijim fazama razvića (Aguirre et al., 2005). Kod micelija gajenih na šejkeru (slika 4.1.1.1. A), uočene su promene u aktivnosti ovog enzima u različitim fazama razvoja. Visoke vrednosti su zabeležene u micelijama mlađih gljiva (12-20 h), a zatim je aktivnost enzima blago opadala, da bi se ponovni maksimum aktivnosti uočio u micelijama starim 32 i 36 h. Nakon 36 h razvoja, aktivnost CAT se smanjivala i najmanje aktivnosti su zabeležene u micelijama gljiva starosti 60 h. Na slici 4.1.1.1. B su prikazane promene aktivnosti CAT u micelijumu gljive *P. blakesleeanus*, kada je micelijum gajen u petri kutijama. Takođe su uočene promene u aktivnosti ovog enzima između micelija različitih starosti, a najviša aktivnost je zabeležena u micelijama starosti 12 h. Kako se povećavala starost micelije uočeno je smanjivanje aktivnosti enzima.



Slika 4.1.1.1. Aktivnost CAT u micelijama gljiva gajenih na šejkeru (A) i micelijama gajenih u petri kutijama (p.k) (B). Prikazana je specifična aktivnost enzima u jedinicama po mg proteina (U/mg prot), U-katalitička jedinica; Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti $\pm$ standardna greška iz 3 eksperimentalne serije ($n \geq 4$). Poređenje vremenskih tačaka je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Holm-Sidak testom. Statistički značajne razlike među satnicama su prikazane u tabeli.

Pored praćanje aktivnosti katalaza polarografski, katalaze su razdvajane elektroforetski na poliakrilamidnom gelu (slika 4.1.1.2). Kod gljiva gajenih u petri kutijama uočene su dve izoforme, dok kod gljiva gajenih na šejkeru su primećene tri izoforme.

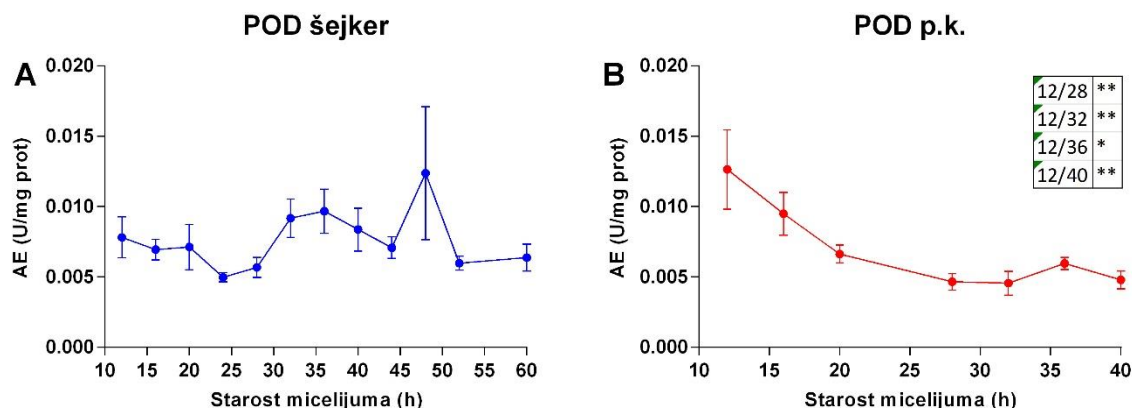


Slika 4.1.1.2. Nativna eletroforeza CAT na poliakrilamidnom gelu, micelije gljive *P.blakesleeanus* gajene u petri kutijama (starosti od 12 h do 32 h) i na šejkeru (starosti od 12 h do 48 h). Strelice ukazuju na uočene izoforme.

4.1.2. Aktivnost POD

Kao i katalaze i peroksidaze su enzimi koji učestvuju u uklanjanju H_2O_2 i ostalih peroksida. Pošto oba enzima kao supstrat koriste perokside, najčešće se aktivnosti ova dva enzima menjaju na sličan način sa rastom, što je uočeno i kod gljive *P. blakesleeanus* (slika 4.1.2). Kod micelija gajenih na šejkeru su zabeležene veće aktivnosti POD u mlađim u poređenju sa starijim micelijama (starijim od 44 h), ali najveće aktivnosti ovog enzima su zabeležene u kasnoj ekspanzionalnoj fazi, odnosno u micelijama starosti 32, 36 i 40 h. Kod micelija koje su rasle u petri kutijama, aktivnost POD, baš kao i CAT praktično monotonno opada sa starošću.

Pošto je povećana aktivnost CAT zabeležena takođe kod micelija starih 36 h, gajenih na šejkeru, može se reći da u kasnoj ekspanzionalnoj fazi razvića, kada se micelijum gljive gaji na ovakav način, dolazi do fizioloških promena koje dovode do porasta aktivnosti i POD i CAT. Kao i kod CAT, ove fiziološke promene su uzrok ili posledica promene u fazi rasta, pa tako kod fitopatogena *Magnaporthe oryzae* je uočeno da dolazi do ekspresije više gena za peroksidaze tokom formiranja konidije i tokom formiranja apresorije, a povećana ekspresija se javlja i kao rezultat izloženosti H_2O_2 , koji nastaje kao odgovor biljke na infekciju (Mir et al., 2015).

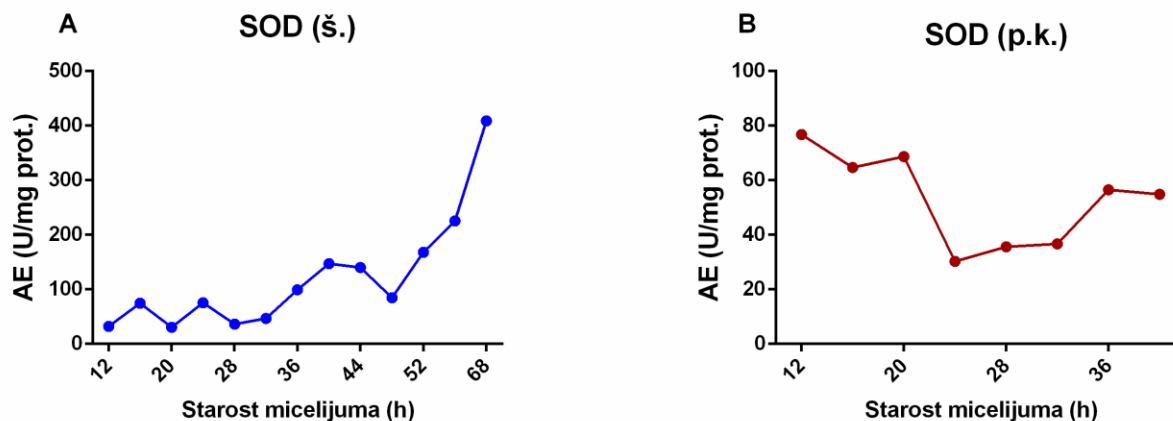


Slika 4.1.2. Aktivnost POD kod gljiva gajenih na šejkeru (A) i gljiva gajenih u petri kutijama (p.k) (B). Prikazana je specifična aktivnost enzima izražena u jedinicama po mg proteina uzorka (U/mg prot), U-katalitička jedinica; Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti $\pm$ standardna greška iz 3 serije ($n \geq 4$). Poređenje vremenskih tačaka je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Holm-Sidak testom. Statistički značajne razlike među satnicama su prikazane u tabeli.

4.1.3. Aktivnost SOD

SOD je enzim koji učestvuje u uklanjanju superoksid anjon radikala $O_2^{\cdot-}$, pri čemu nastaje O_2 i H_2O_2 . Kao i CAT i POD i njegova aktivnost se menja tokom razvića micelijuma gljive *P. blakesleeanus*. Aktivnost ovog enzima je veća kod micelija gljiva gajenih na šejkeru u odnosu na one gajene u petri kutijama (slika 4.1.3). Gljive gajene na šejkeru karakteriše niska i stabilna aktivnost SOD do 32 sata starosti, da bi od 36 h starosti (ulazak u ranu stacionarnu fazu) došlo do umerenog, a od 52 sata starosti (stacionarna faza) izuzetno velikog porasta njene aktivnosti (slika 4.1.3). Kod *N. crassa* i *Fusarium decemcellulare* uočeno je povećanje aktivnosti SOD prilikom prelaska u stacionarnu fazu razvoja (Gessler et al., 2007). Sa starenjem povećava se nivo ROS, što dovodi i do povećanja aktivnosti ovog enzima (De Castro et al., 2013). Micelije gljiva starije od 52 h gajene na šejkeru, su pokazale izrazito veliku aktivnost SOD, dok su micelije gajene u petri kutijama, manjih starosti (8 i 12 h) pokazale veću

aktivnost SOD nego micelije istih starosti gajene na šejkeru. Međutim, aktivnost SOD kod micelija gajenih u p.k. starijih od 20 h je naglo opala, da bi ponovo porasla na 36 h i 40 h. Micelije gljiva gajenih na šejkeru, starije od 32 h, su imale veću aktivnost SOD nego micelije gljiva gajene u petri kutijama, istih starosti. Ovi rezultati mogu ukazivati na to da je gajenje na šejkeru, odnosno sa rotacijom, vrsta oksidativnog stresa za miceliju ili je u pitanju signalizacija bitna za razvoj micelijuma, pošto su ROS bitni signalni molekuli za prelazak gljive iz jedne faze razvoja u drugu (Aguirre et al., 2005). U ovoj fazi, gljive gajene u petri kutijama su duboko zašle u pripremu za razvoj sporangiofora, do čijeg razvoja ne dolazi kod gljiva gajenih na šejkeru.



Slika 4.1.3. Aktivnost SOD kod gljiva gajenih na šejkeru (š) (A) i gljiva gajenih u petri kutijama (p.k) (B). Prikazana je specifična aktivnost enzima izražena u jedinicama po mg proteina uzorka proteina (U/mg prot), U-katalitička jedinica; Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ($n \geq 2$).

Uzimajući u obzir prethodne rezultate, može se zaključiti da su POD i CAT enzimi čije se aktivnosti najčešće menjaju na sličan način tokom rasta micelije, da su povećane aktivnosti ovih enzima karakteristične za mlađe micelije gljive, dok je aktivnost SOD povećana kod starijih micelija (> 52 h) i da se gajenjem na šejkeru inhibira razvoj sporangiofora, usled čega dolazi do skoka aktivnosti sva tri enzima u micelijama gljiva starih između 32 i 40 h.

4.2. Kriva rasta micelijuma gljive *Phycomyces blakesleeanus* na pH=6,7

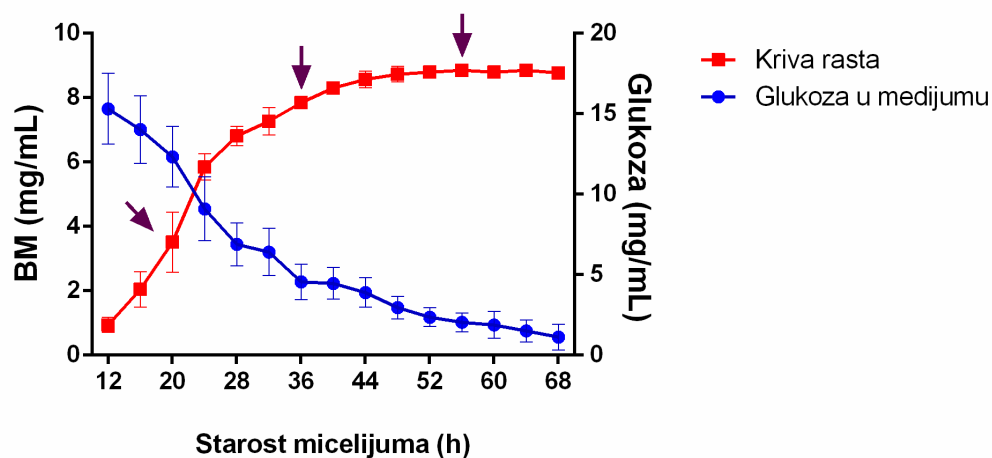
Životni vek micelije filamentoznih gljiva, odnosno njihov rast se odvija kroz nekoliko faza, koje se razlikuju po trajanju i intenzitetu rasta. Četiri osnovne faze razvoja su: **lag faza** (faza sporog rasta), **log faza**, odnosno eksponencijalna faza tokom koje je rast najintenzivniji, **stacionarna faza**, tokom koje je rast usporen, odnosno zanemarljiv i **faza odumiranja** (Moore et al., 2020). Rast micelije zavisi od uslova sredine u kojima se ona razvija, kao i od dostupnosti neophodnih nutrijenata iz medijuma, a glavni nutrijenti za razvoj *P. blakesleeanus* su glukoza kao izvor ugljenika i L-asparagin kao izvor azota, te je uporedo sa rastom, praćena i promena koncentracije glukoze u medijumu.

Kako bi se sprečio razvoj sporangiofora i dobio veći prinos micelije, *P. blakesleeanus* je u ovoj tezi gajen na šejkeru u erlenmajerima. Pored toga, kako je jedan od ciljeva ove disertacije ispitivanje mogućnosti korišćenja micelije *P. blakesleeanus* u industrijske svrhe, kao mogućeg bioakumulatora vanadijuma i izvora ekonomski interesantnih biomolekula poput lipida, uslovi gajenja su prilagođeni industrijskim. Uzorkovanje je rađeno na 4 h, počevši od 12 h rasta (prva merljiva masa) i merena je suva masa

micelijuma koja je izražavana u mg/mL. Uočeno je da je već nakon 12 h rasta, micelija ušla u eksponencijalnu fazu razvića, koja je trajala sve do ~36 h, kada je prešla u stacionarnu fazu. Za micelije gljive starosti između 12 h i 36 h se može reći da se nalaze u intenzivnoj eksponencijalnoj fazi, dok za micelije starosti 36 h i 40 h se može reći da su u kasnoj eksponencijalnoj fazi; odnosno na prelasku u stacionarnu, kada rast postoji, ali je on mnogo manjeg intenziteta (slika 4.2). Povećanje pH vrednosti medijuma na 6,7 nije dovelo do promena u dobijenoj biomasi micelije.

Paralelno sa krivom rasta, DNS metodom je praćen pad koncentracije glukoze u medijumu i njen minimum je uočen nakon 60 h kada je njena koncentracija ispod 2 mg/mL (slika 4.2).

Zahvaljujući dobijenoj krivi rasta, osim što su utvrđene faze razvoja micelija pomenute gljive, omogućen je odabir micelija odgovarajućih starosti za tretmane vanadatom. Izabrane su micelije gljive starosti 20 h (eksponencijalna faza razvića), 36 h (kasna eksponencijalna/rana stacionarna faza razvića) i 56 h (stacionarna faza razvića).



Slika 4.2. Kriva rasta micelijuma gljive *P. blakesleeanus* i kriva potrošnje glukoze u medijumu. Sva merenja su rađena u tri nezavisne serije ($n \geq 6$) i prikazane su srednje vrednosti $\pm$ standardna greška. Strelicama su obeležene starosti micelijuma gljive, koje su odabrane za tretmane vanadatom. Leva y osa se odnosi na biomasu micelije (BM), izražena kao mg suve mase po mL medijuma (mg/mL), dok se desna osa odnosi na koncentraciju glukoze u medijumu (mg/mL).

4.3. Efekat vanadata na klijanje i rast *P. blakesleeanus*

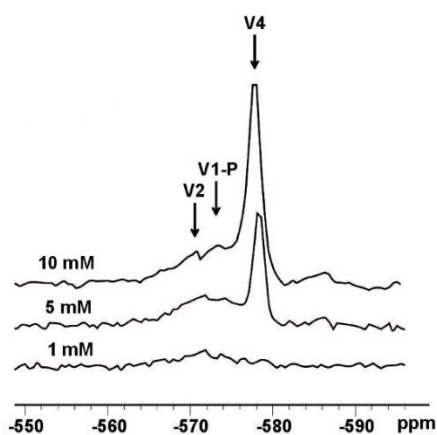
Nakon određivanja tipičnih faza rasta micelijuma gljive *P. blakesleeanus*, micelijum određene starosti (20 h, 36 h i 56 h) je izlagan različitim koncentracijama vanadata (1 mM, 5 mM i 10 mM). Kako pripremljeni ortovanadat dovodi do povećanja pH vrednosti medijuma, micelijum je za ove eksperimente od same inokulacije gajen u modifikovanom medijumu pH=6,7. Ova promena je uvedena da bi se izbegao efekat promene pH u trenutku dodavanja vanadata. U preliminarnim eksperimentima je pokazano da povećanje pH medijuma dovodi do promena u aktivnosti antioksidativnih enzima, odnosno do smanjenja aktivnosti CAT i POD, dok za SOD nisu zabeležene značajne promene (Dragićević, 2017).

4.3.1. NMR spektroskopija medijuma koji sadrži vanadat

Za određivanje formi vanadata u minimalnom medijumu, korišćena je NMR spektroskopija. U minimalni medijum je dodavan vanadat u koncentracijama od 1 mM, 5 mM i 10 mM, nakon čega im je pH podešen na 6,7. U eksperimentima je korišćen koncentrovani rastvor vanadata dobijen prema Gordonovom protokolu (Gordon, 1991) u kome se on nalazi u obliku monomera.

Vanadijum, kao prelazni metal, se može naći u različitim oksidacionim stanjima. Osim toga njegova oksidovana forma, vanadat, može biti prisutan u različitim oblicima (monomer, dimer, tetramer, dekamer). Oksidaciono stanje i oblik u kojem se nalazi V u vodenim rastvorima zavise od brojnih faktora: koncentracije, pH i jonske jačine (Siegel, H., Siegel, 1995). Analizom spektara (slika 4.3.1) uočavaju su signali za V2 (-572 ppm) i V4 (-576 ppm), a pored njih detektovan je i signal na -574 ppm, čiji intenzitet raste sa povećanjem koncentracije vanadata. Na spektrima se ne uočava signala monomera, koji je očekivan na -558 ppm, na pH 6,7. Na pH 6,7 pri koncentraciji od 1 mM u medijumu je uočen samo signal dimera (V2) vanadata (slika 4.3.1). Odsustvo signala monomera V1, koji je očekivan na -558 ppm ne isključuje njegovo prisustvo u medijumu, ali zbog niske koncentracije intenziteti njegovih linija nisu dovoljni da bi se signal pojavio. Sa povećanjem koncentracije na 5 i 10 mM V(V), pojavljuje se i preovladava signal tetramera (V4). Pozicije signala monomera i dimera zavise od pH vrednosti, dok pozicija tetramera ne zavisi od pH rastvora (Rehder, 2008a). Zbog toga na konstantnom pH od 6,7 spektre snimljene sa vanadatom u koncentracionom opsegu između 1 i 10 mM karakterišu identični hemijski pomeraji za sve detektovane vrste vanadata.

Spektri vanadata u medijumu su snimljeni i zbog mogućih interakcija sa njegovim komponentama: glukozom, asparaginom, fosfatima, sulfatima i mikroelementima. Interakcija sa glukozom i asparaginom nije detektovana pomoću ^{51}V NMR u ranijem istraživanju Žižića i saradnika (Žižić et al., 2016), a koncentracija mikroelemenata je bila suviše niska da bi se detektovala interakcija. S druge strane, fosfati imaju visok kapacitet za vezivanje vanadata i ova interakcija je najverovatnija, jer kada se fosfati u obliku hidrogen-fosfata (HPO_4^{2-}), nalaze u vodenim rastvorima, hemijski pomeraj kompleksa vanadat-fosfat, na pH 6,7 iznosi oko -574 ppm za V1-P sistem (Andersson et al., 2005). Upravo taj signal je zabeležen na spektru, a nastankom kompleksa V1-P, se može objasniti i nedostatak signala za V1 (slika 4.3.1).



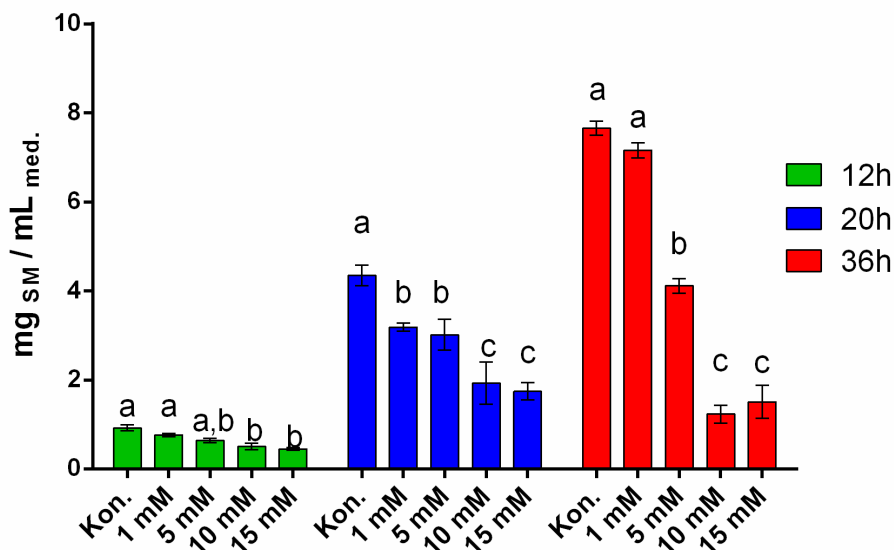
Slika 4.3.1. ^{51}V NMR spektri medijuma koji su sadržali 1 mM, 5 mM i 10 mM V(V). Uočeni su signali dimera (V2) i tetramera (V4) vanadata, kao i kompleksa vanadat-fosfat (V1-P).

4.4. Klijanje i rast micelije gljive u medijumu koji je sadržao vanadat

Kako bi se ispitaio uticaj vanadata na rast micelijuma gljive, vanadat je dodavan u tečni medijum i to u četiri različite koncentracije (1 mM, 5 mM, 10 mM i 15 mM), neposredno pre inokulacije aktiviranih spora, sa konačnim pH=6,7. Praćen je rast micelija koje su rasle na vanadatu do 12 h, 20 h, odnosno 36 h na šejkeru, kao i micelija koje su rasle do 20 h na vanadatu u petri kutijama. Kao što je napomenuto, gajenjem na šejkeru, može se povećati biomasa micelije, usled povećane aeracije medijuma. Postoje brojne studije koje potvrđuju da povećana aeracija dovodi do povećanja biomase gajenih gljiva

(Diamantopoulou et al., 2014; Elzwai & Ahmed, 2019), međutim kod nekih vrsta može imati i suprotan efekat i smanjiti prinos (Pilafidis et al., 2024).

U ovom eksperimentu je uočeno da je vanadat značajno inhibirao rast, kod gljiva svih starosti gajenih na šejkeru, pogotovo kada je u medijumu bio prisutan u višim koncentracijama (10 mM i 15 mM), dok je kod gljiva starih 20 h inhibični efekat počinjao već od koncentracije od 1 mM, a kod onih starih 36 h od koncentracije od 5 mM (slika 4.4.1).



Slika 4.4.1. Rast micelija *P. blakesleeanus* koje su rasle pri različitim koncentracijama vanadata (1, 5, 10 i 15 mM) do 12 h, 20 h i 36 h na šejkeru. Rast je izražen kao mg suve mase micelijuma po mL medijuma ($\text{mg}_{\text{SM}}/\text{mL}_{\text{med.}}$) i prikazane su srednje vrednosti $\pm$ standardna greška ($n \geq 4$). Poređenje kontrola i tretmana je vršeno je jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA on ranks, Kruskal-Wallis, praćeno Dunnovim testom) Tretmani obeleženi različitim malim slovom su statistički značajno različiti.

Izračunat je i indeks tolerancije i dobijene vrednosti su prikazane u tabeli 4.4.1. Analizom TI, micelija starih 12 h, 20 h i 36 h, može se uočiti da je sa porastom koncentracije vanadata došlo do monotonog opadanja TI, odnosno zabeleženi rast je bio najmanji kod micelijuma gljiva tretiranih 15 mM V(V). Kod micelija gljiva starih 36 h takođe je došlo do inhibicije rasta, ali najveća inhibicija je zabeležena nakon tretmana sa 10 mM V(V), dok tretmani sa 1 mM V(V) nisu doveli do značajnije inhibicije rasta.

Inhibicija rasta micelija gljiva starih 20 h, gajenih u p.k, je zapažena smo pri većim koncentracijama vanadata (10 mM i 15 mM), dok niže koncentracije vanadata nisu uticale na rast. Ukoliko se međusobno uporede TI micelijuma gljiva starih 20 h gajenih u p.k. i na šejkeru uočava se da su one gajene na šejkeru značajno osetljivije, što ukazuje da je i sam način gajenja uticao na odgovor micelije na vanadat, ali neophodno je sprovesti dodatne eksperimente kako bi se to i potvrdilo.

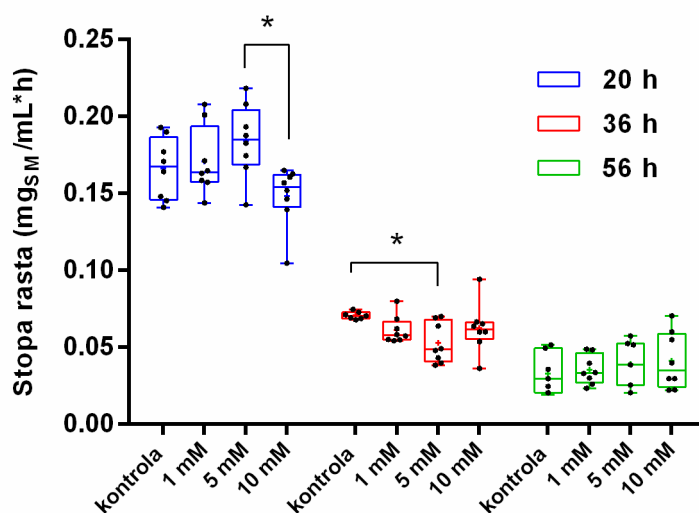
Tabela 4.4.1. Indeks tolerancije (TI) micelijuma *P. blakesleeanus* nakon tretmana sa V(V). TI = (Suva masa tretiranog micelijuma/suva masa kontrolnog micelijuma) x100. Kontrolni micelijum je onaj koji je dobijen filtriranjem micelije gljive koje je rasla u medijumu bez V(V). TI su izračunati iz tri eksperimentalne serije (n≥4).

TI nakon tretmana sa V(V)				
	1 mM	5 mM	10 mM	15 mM
12 h	95.40 ± 5.03	65.45 ± 7.52	52.38 ± 9.57	55.08 ± 4.03
20 h	94.36 ± 2.63	61.42 ± 9.50	38.08 ± 11.90	43.29 ± 2.28
36 h	96.28 ± 2.28	52.39 ± 1.48	16.19 ± 2.85	20.30 ± 4.94
20 h (p.k.)	97.68 ± 5.37	86.85 ± 5.20	73.50 ± 2.45	64.41 ± 4.94

4.5. Vijabilnost

Vijabilnost gljive ili preživljavanje ćelija (eng. “Cell survival”), je rađeno kako bi se utvrdio toksičan efekat vanadata na micelijum gljive, kada se vanadat primeni u različitim stadijumima rasta. Micelijumi gljive starosti 20 h, 36 h i 56 h su nakon rasta na šejkeru, izlagani vanadatu u različitim koncentracijama (1 mM, 5 mM i 10 mM) tokom 5 h, nakon kojih su ispirani i vraćani u svež medijum narednih 12 h, potom sušeni i mereni. Vijabilnost je praćena preko stope rasta, koja je izražena kao mg suve mase micelijuma po mL medijuma tokom 1 h (mg_{SM}/mL*h). Prikazani rezultati (slika 4.5.1) pokazuju da u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi razvića vanadat nije imao uticaja na preživljavanje, dok je blagi inhibitorni efekat zabeležen kod micelija gljiva starih 36 h, gde vanadat jeste uticao na vijabilnost, a statistički značajna razlika u rastu je zabeležena između kontrolnog micelijuma i micelijuma tretiranog 5 mM V(V) ($p \leq 0.05$).

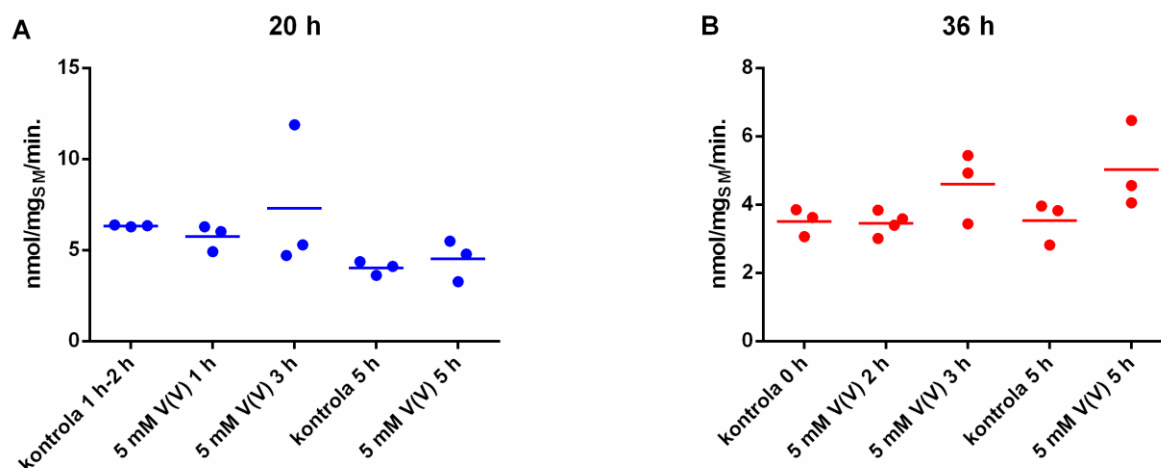
Iako nisu uočene statistički značajne razlike između kontrola i tretmana u eksponencijalnoj fazi, zabeleženo je da je 10 mM V(V) doveo do statistički značajno manjeg rasta u odnosu na tretman 5 mM V(V) ($p \leq 0.05$), što potencijalno ukazuje na hormetički efekat 5 mM V(V), što je uočeno i u radu Žižića i saradnika, za 1 mM i 5 mM V(V) (Žižić et al., 2013). Hormetički efekat je fenomen odgovora na dozu, kod koga niska doza nekog stresora može delovati stimulatивно, dok visoka doza istog deluje inhibitorно na proučavanu osobinu (Calabrese, 2014).



Slika 4.5.1. Stopa rasta micelijuma gljive *P. blakesleeanus*, starosti 20 h, 36 h i 56 h; nakon izlaganja različitim koncentracijama V(V) (1 mM, 5 mM i 10 mM) tokom 5 h. Podaci su prikazani dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograda opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sva merenja (prikazana kao tačke) i njihovu raspodelu ($n \geq 7$). Poređenje kontrola i tretmana je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Holm-Sidak testom, $p \leq 0.05$ (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***)).

Osim ovog eksperimenta, urađen je i eksperiment u kojem su micelijumi gljive starosti 20 h, 36 h i 56 h izlagani vanadatu (1 mM, 5 mM i 10 mM) tokom 5 h i odmah nakon tretmana micelijumi su filtrirani, sušeni i potom mereni. Ovakvi tretmani vanadatom nisu doveli do promene mase micelijuma, odnosno vanadat nije uticao na njihov rast dovoljno brz da bi efekat bio merljiv (rezultati nisu prikazani).

Pored praćenja efekta vanadata na rast, ispitan je i uticaj vanadata na disanje *P. blakesleeanus*, pošto je on aerobna gljiva. Urađena su dva tipa eksperimenata; u prvom je dodavan vanadat direktno u medijum nakon 24 h rasta micelije gljive (akutno izlaganje vanadatu) i praćen je njen odgovor, ali nije zabeležena nikakva značajnija promena (rezultati nisu prikazani). U sledećem eksperimentu je praćen efekat 5 mM V(V) na disanje nakon dužeg delovanja (1 h, 3 h, 5 h) kod micelija gljiva starih 20 h (A) i 36 h (B) (slika 4.5.2). Koncentracija od 5 mM V(V) je odabrana zbog pokazanih efekata u ispitivanju vijabilnosti. Uočeno je da V(V) nije značajno uticao na promenu disanja micelijuma gljiva starih 20 h, a ni micelijuma gljiva starih 36 h.

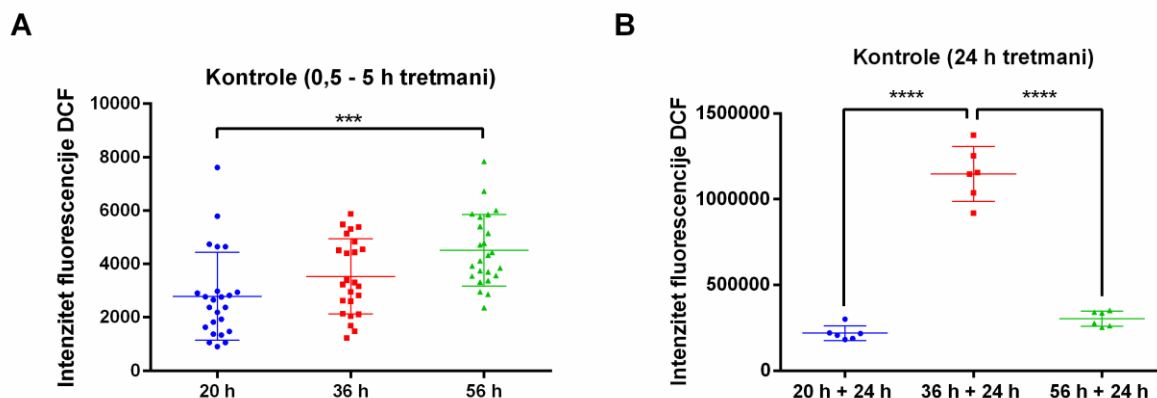


Slika 4.5.2. Uticaj 5 mM V(V) na disanje kod 20 h (A) i 36 h (B) starih micelijuma gljive *P. blakesleeanus*. Linije predstavljaju srednje vrednosti, dok tačke predstavljaju pojedinačna merenja, $n \geq 3$. Respiracija je izražena kao nmol O₂/mg_{SM}/min.

4.6. Određivanje sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta

Vanadijum, kao prelazni metal, ima sposobnost generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta i to putem reakcija sličnih Fentonovoj i/ili Haber-Weiss-ovoj, zbog čega je praćen njihov nastanak nakon tretmana vanadatom. Produkcija ROS-a je praćena nakon kraćih tretmana od 0,5, 1 i 5 h, kao i nakon dužeg tretmana od 24 h, DCFH-DA esejem u kome je porast fluorescencije ukazivao na porast koncentracije unutarćelijskih ROS, pre svega H₂O₂. Poređenjem kontrolnih micelija različitih starosti koje odgovaraju

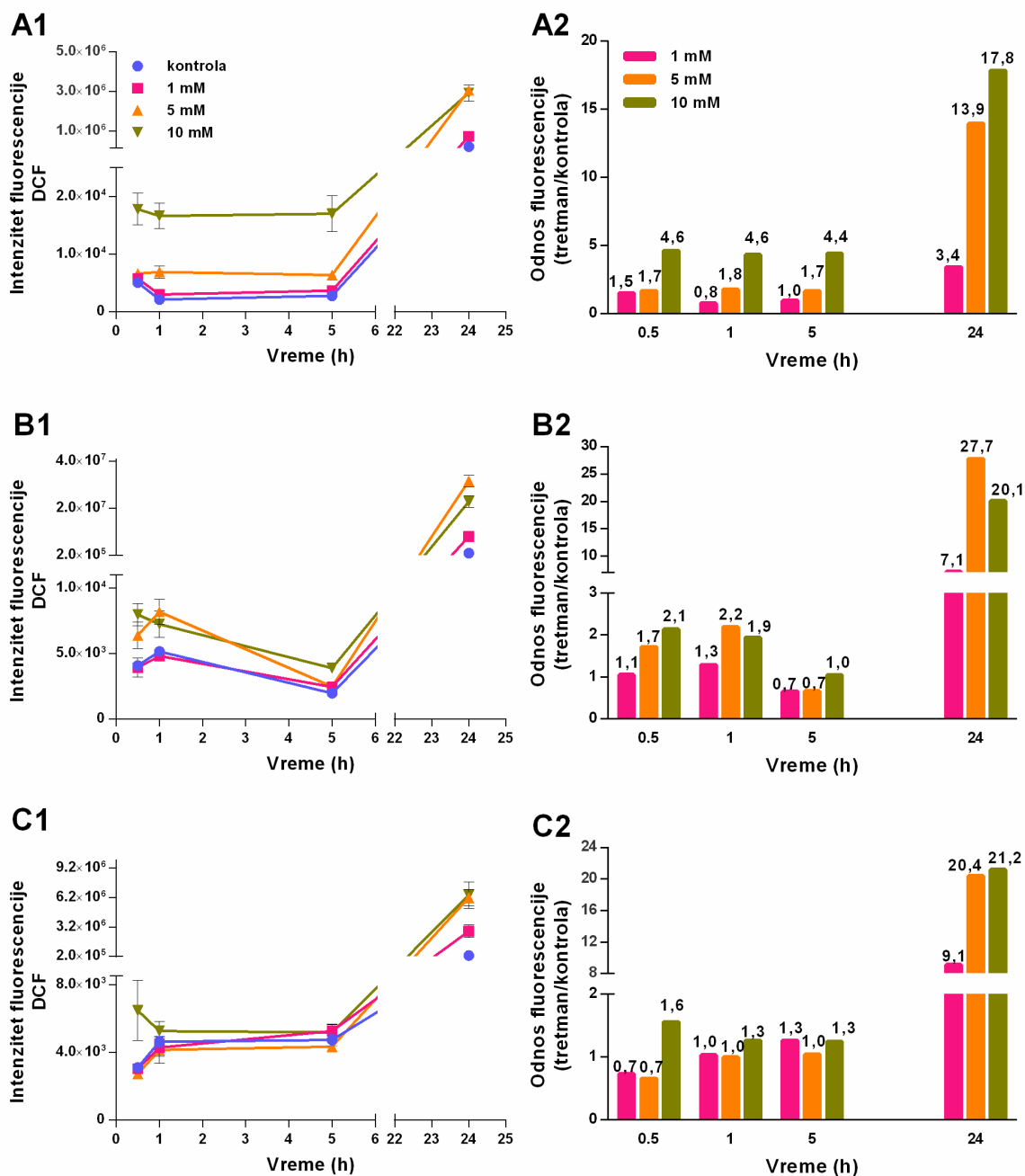
kraćim (0,5 h do 5 h) tretmanima (slika 4.6.1. A) može se uočiti da je najveći sadržaj ROS-a zabeležen kod najstarijih micelija, što potvrđuje činjenicu da sa starošću dolazi do njihove povećane produkcije (De Castro et al., 2013). Kod dužih vremena rasta koji odgovaraju tretmanima od 24 h (slika 4.6.1. B), najveći sadržaj ROS je zabeležen u micelijama starim 36 + 24 h, što takođe ukazuje na povećanu produkciju ROS-a u stacionarnoj fazi, jer je realna starost micelija bila 60 h, a povećanje je bilo značajno kako u odnosu na 44 h (20 + 24 h, $p \leq 0.0001$) tako i u odnosu na 80 h (56 + 24 h, $p \leq 0.0001$) stare micelijume.



Slika 4.6.1. Poređenje sadržaja reaktivnih kiseoničnih vrsta u kontrolnim micelijama starim 20 h, 36 h i 56 h (**A**, $n \geq 24$) i u micelijama starim 20 + 24 h, 36 + 24 h, 56 + 24 h (**B**, $n \geq 6$). Statistička provera je vršena jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćenom Tukijevim testom, $p \leq 0.05$ (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***), ≤ 0.0001 (****).

Efekti vanadata na produkciju ROS-a su prikazani na slici 4.6.2, gde su sa leve strane grafici na kojima je predstavljena promena fluorescencije (izražena kroz arbitarne jedinice), tokom vremena u kontrolnim i tretiranim micelijama, a sa desne strane grafici koji prikazuju odnos fluorescencije tretmana i odgovarajućih kontrola. Prilikom računanja odnosa tretman/kontrola, kontrole koje odgovaraju tretmanima od 0,5 – 5 h su objedinjene. Kad se pogledaju rezultati za micelije gljive stare 20 h (slika 4.6.2. A), može se uvideti da je produkcija reaktivnih vrsta u ovoj fazi rasta bila visoka, da je detektovana odmah nakon tretmana od 0,5 h, i da je bila najveća u micelijumu koji je tretiran 10 mM V(V) (4,6 puta u odnosu na kontrolu). Nakon tretmana od 1 h i 5 h koncentracija ROS-a je bila i dalje visoka u micelijama tretiranim 10 mM V(V), dok tretmani sa 1 mM i 5 mM V(V) nisu doveli do značajnih promena u produkciji ROS-a. Duži tretmani, od 24 h, su doveli do izrazito povećane koncentracija ROS-a u svim tretiranim micelijama.

Ako se analiziraju rezultati micelijuma gljive stare 36 h (slika 4.6.2. B), promene su daleko manje izražene pri kraćim tretmanima, dok je nakon dužih tretmana produkcija ROS-a bila veća nego kod micelija starih 20 h tretiranih 24 h V(V). U ovoj fazi (36 + 24 h) je sadržaj ROS visok i u kontrolnim micelijumima (slika 4.6.1 B), što se može objasniti i činjenicom da je micelija prešla u stacionarnu fazu rasta, gde povećana koncentracija ROS-a može biti rezultat starenja (De Castro et al., 2013), ali svakako ovako velika koncentracija ROS-a je bez sumnje posledica i delovanja vanadata. Kod micelijuma starog 56 h (slika 4.6.2. C), kraći tretmani sa V(V), nisu doveli do povećane produkcije ROS-a, a jedino blago povećanje je zabeleženo u micelijumu tretiranom 10 mM V(V), nakon 0,5 h (1,6 puta u odnosu na kontrolu). S druge strane, duži tretmani su, kao i kod micelija starih 20 h i 36 h doveli do povećane produkcije ROS-a i to 9, 20 i 21 put kod 1, 5 i 10 mM V(V). Ovako veliko povećanje ROS-a jeste posledica dugotrajne izloženosti micelijuma delovanju vanadata.



Slika 4.6.2. Produkcija ROS-a nakon 0,5, 1, 5 i 24 h izlaganja vandatu (1, 5 i 10 mM) u micelijumu gljive *P. blakesleeanus* starosti 20 h (A1), 36 h (B1) i 56 h (C1). Sa leve strane su prikazane promene u sadržaju ROS-a tokom vremena, gde znakovi predstavljaju srednje vrednosti $\pm$ standardna greška ($n \geq 6$); a sa desne strane (A2, B2, C2) su prikazani odnosi fluorescencije tretmana i kontrola.

Ukoliko se uporede kraća (do 5 h) i duža (od 24 h) izloženost vanadatu, može se zaključiti da izloženost od 24 h dovodi do produkcije ROS-a u svim fazama razvoja, nezavisno od metaboličke aktivnosti same gljive, a najviša produkcija je zabeležena u kasnoj eksponencijalnoj fazi (36 h star micelijum); dok kod kraće izloženosti, najveći efekat vanadata je zabeležen kod 20 h starih micelija (kad je gljiva najviše

metabolički aktivna) i to pri najvećoj koncentraciji (10 mM), dok u drugim fazama razvoja nije zabeležen veliki sadržaj ROS-a u tretiranim, u poređenju sa kontrolnim micelijama.

4.7. Određivanje sadržaja neenzimskih antioksidanasa i aktivnosti enzima u micelijama *P. blakesleeanus* nakon tretmana vanadatom

Kako bi se detaljnije sagledalo funkcionisanje antioksidativnog sistema zaštite gljive *P. blakesleeanus* praćen je uticaj vanadata na njegove neenzimske i enzimске komponente. Praćene su promene aktivnosti enzima i promene koncentracije neenzimskih antioksidanasa u odgovoru na tretmane vanadatom različitog trajanja i koncentracija. Micelije gljive različitih starosti (20 h, 36 h i 56 h) su tretirane sa tri koncentracije vanadata (1 mM, 5 mM i 10 mM) tokom 1 h i 5 h. Ove dužine tretmana su izabrane sa idejom da se ispita odgovor micelije gljive nakon kraće i duže izloženosti, sa pretpostavkom da je dužina tretmana od 1 h dovoljna da izazove određeni odgovor, pre svega neenzimskih antioksidanasa, a da je duži tretman od 5 h dovoljan da dovede i do odgovora enzimskih komponenti sistema antioksidativne zaštite.

U ispitivanju odgovora micelije na delovanje vanadata određena je **ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka**, koncentracije **ukupnih fenola** i **ukupnog glutaciona**, kao i aktivnost šest enzima, **POD**, **CAT** i **SOD** i enzima uključenih u glutationski ciklus, **GR**, **GPx** i **GST**.

Zbog velikih varijacija u klijanju spora i rastu micelijuma među pojedinačnim eksperimentalnim serijama, efekti vanadata su izolovani od efekata rastezanja normalizacijom aktivnosti enzima i koncentracija antioksidanasa u micelijumima tretiranim vanadatom u odnosu na kontrolu. Normalizacija podataka je omogućila poređenje apsolutnih vrednosti aktivnosti enzima i koncentracija antioksidanasa između različitih faza razvika, ali je omogućila jasno uočavanje efekata vanadata. Razlog ovako velike varijabilnosti u rastezanju micelije, uprkos identičnim uslovima gajenja, može biti to što je *P. blakesleeanus* filamentozna i cenocitična (nesegmentisana) gljiva, koju kao i ostale filamentozne gljive karakteriše izražena nehomogenost u raspodeli organela i gustini citoplazme unutar hifa, što zajedno sa prisustvom ćelijskog zida predstavlja najpre značajan izazov za uspešnu izolaciju citosola sa enzimima; a potom, dodatni problem je i izuzetna fenotipska plastičnost i sposobnost prilagođavanja čak i na gotovo neprimetne promene u uslovima sredine, uz odgovarajuće promene u fiziologiji i morfologiji (Schinagl et al., 2016).

4.7.1. Ukupna antioksidativna aktivnost uzorka

Ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka je određena ABTS testom i rezultati su izraženi kao mmol ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu suve mase (mmol EAK/g_{SM}). Ovim esejem se može procenti antioksidativna aktivnost različitih uzoraka i test se zasniva na neutralizaciji ABTS radikala uz pomoć antioksidanasa koji su prisutni u uzorku. ABTS radikal reaguje sa antioksidansom, koji mu donira elektron (ili vodonik) i redukuje ga i prati se pad apsorbanse ABTS radikala na 730 nm. Pošto je ABTS rastvorljiv i u vodenim i organskim rastvaračima i može se koristiti pri različitim pH, a nastali ABTS radikal reaguje brzo sa antioksidansom, ovaj esej se smatra jednim od najosetljivijih metoda za procenu antioksidativne aktivnosti (Shalaby & Shanab, 2013).

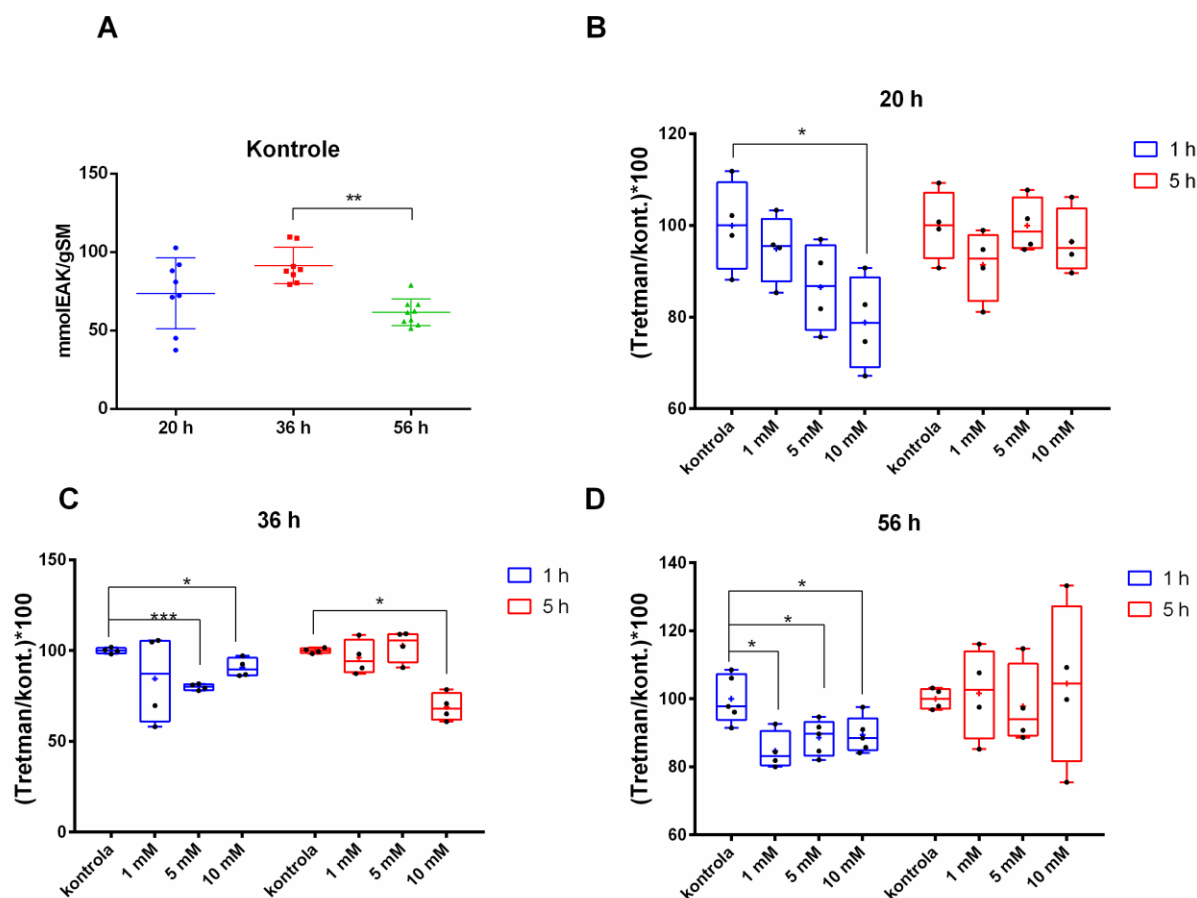
Kada se pogledaju rezultati ovog eseja (slika 4.7.1. A) može se uočiti da je kod kontrolnih micelija, najmanja antioksidativna aktivnost zabeležena u micelijama starim 56 h, dok su micelije stare 20 h i 36 h pokazivale sličnu antioksidativnu aktivnost.

Kod tretiranih micelija starih 20 h (slika. 4.7.1. B) antioksidativna aktivnost uzoraka je opadala sa porastom koncentracije vanadata, i najveće smanjenje je zabeleženo u micelijumu tretiranom 10 mM V(V) ($p \leq 0,05$), nakon jednočasovnog tretmana. To ukazuje da je u tim uzorcima koncentracija

neenzimskih antioksidanasa bila smanjena, odnosno da su oni utrošeni, kao posledica stresa izazvanog vanadatom. Tretmani od 5 h nisu doveli do značajnijih promena.

Kod micelija starih 36 h (slika 4.7.1. C), takođe je uočeno smanjenje antioksidativne aktivnosti uzorka nakon 1 h tretmana, koje je imalo statističku značajnost kod micelijuma tretiranog 5 (p ≤ 0,001) i 10 mM V(V) (p ≤ 0,05), dok su tretmani od 5 h doveli do smanjenja antioksidativne aktivnosti uzorka samo u micelijumu tretiranom 10 mM V(V) (p ≤ 0,05).

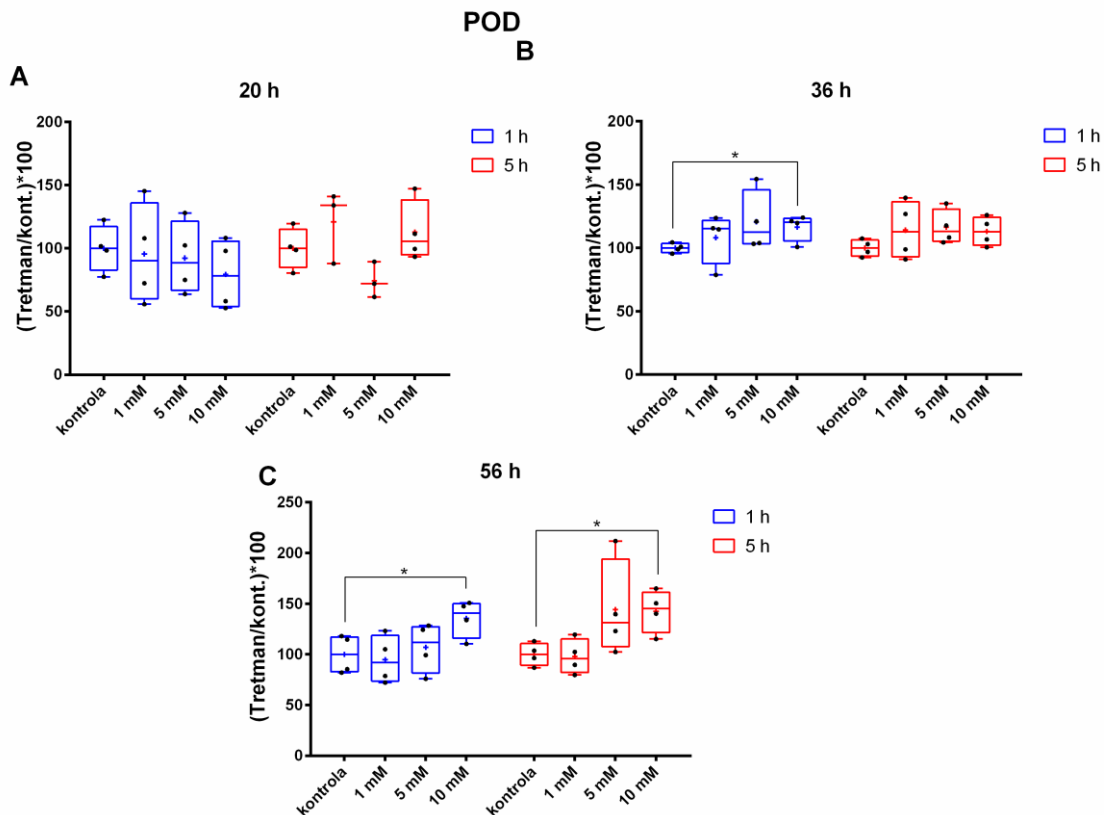
U stacionarnoj fazi razvoja gljive (slika 4.7.1. D), tretmani od 1 h su takođe doveli do smanjenja antioksidativne aktivnosti u micelijumima tretiranim svim koncentracijama vanadata (p ≤ 0,05).



Slika 4.7.1. A) Antioksidativni kapacitet uzoraka, izražen u ekvivalentima askorbinske kiseline (mmol EAK/gSM) u kontrolnim micelijama starim 20 h, 36 h i 56 h; objedinjene su kontrole koje su odgovarale tretmanima od 1 h i 5 h (n ≥ 8). Poređenje je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA, praćena Tukijevim testom); **(B)** Efekat V(V) na ukupnu antioksidativnu aktivnost uzorka (ABTS test) micelija starih 20 h, **(C)** 36 h i **(D)** 56 h, nakon tretmana od 1 h i 5 h. Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu (n ≥ 4). Poređenje kontrole i tretmana je vršeno neparametarskim Man-Vitni testom. Statistički značajna razlika između grupa podataka je prikazana zvezdicama, (p ≤ 0.05 (*), p ≤ 0.01 (**), p ≤ 0.001 (***)).

4.7.2. Aktivnost POD

Ukoliko se analizira promena aktivnosti POD u micelijama 20 h starih gljiva (slika 4.7.2. A), mogu se uočiti promene u aktivnosti ovih enzima jedino nakon kraćih tretmana; koji su doveli do blagog, ali ne i statistički značajnog pada u aktivnosti, sa porastom koncentracije vanadata. Ovaj efekat se može objasniti visokom koncentracijom H_2O_2 koja je dovela do inaktivacije POD (Michalak, 2006). Kod 36 h starih micelija, zabeležen je porast aktivnosti POD i nakon 1 h i 5 h tretmana, za sve koncentracije vanadata, ali statistički značajno povećanje je uočeno samo kod micelijuma tretiranog 10 mM V(V) tokom 1 h ($p \leq 0.05$). Slično je zabeleženo i kod micelijuma u stacionarnoj fazi razvoja (56 h), gde su tretmani 10 mM V(V) doveli do povećanja POD aktivnosti, i to i nakon kraćeg i nakon dužeg izlaganja ($p \leq 0.05$)).

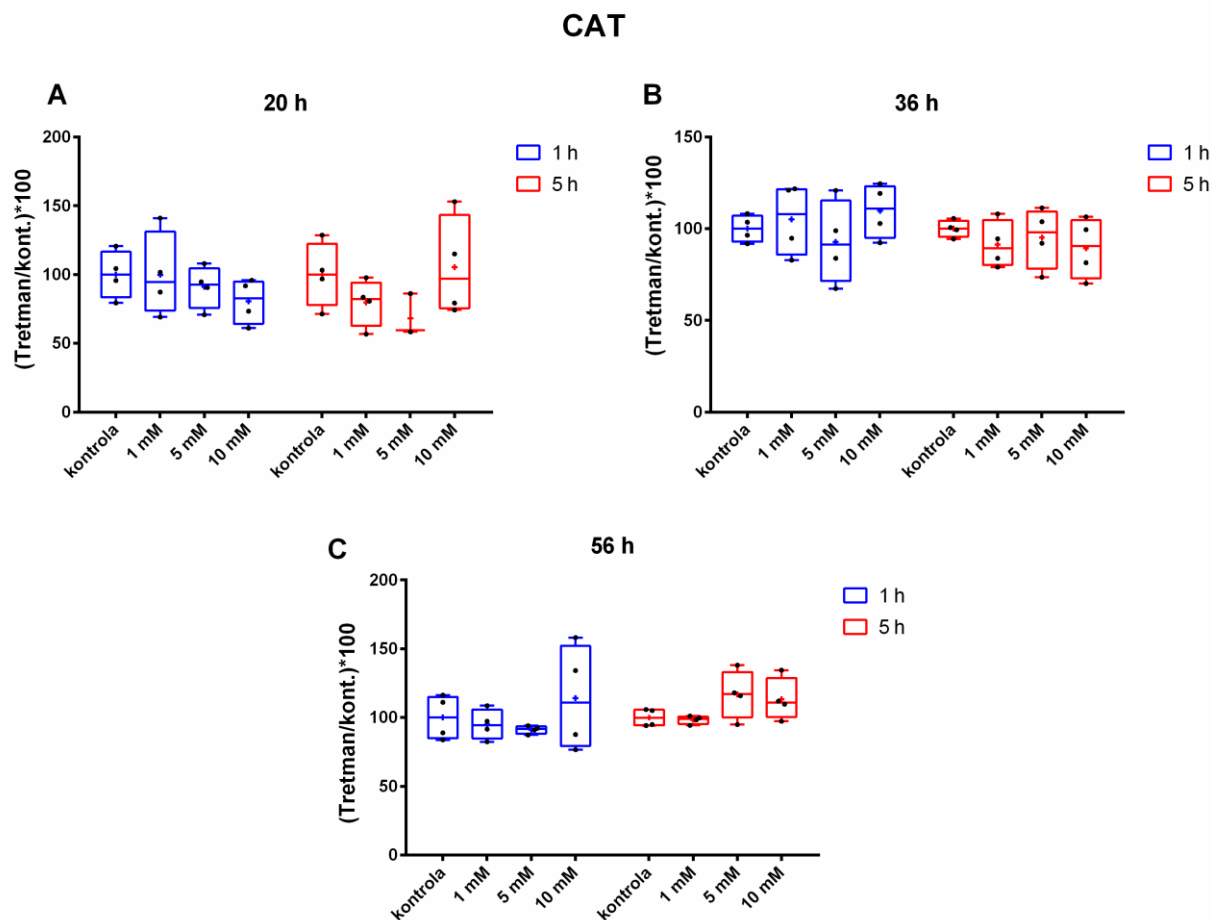


Slika 4.7.2. Efekat V(V) na aktivnost POD u micelijama starosti 20 h (A), 36 h (B) i 56 h (C). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Neparametarski Man-Vitni test je korišćen za poređenje kontrole i tretmana i statistički značajna razlika između dve grupe podataka je prikazana zvezdicama; ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.7.3. Aktivnost CAT

Katalaze su enzimi koji su kao i POD uglavnom izraženiji kod mlađih gljiva, a pošto koriste isti supstrat u reakciji (najčešće H_2O_2), aktivnosti im se uglavnom i menjaju na isti način. S obzirom na to da postoji više oblika katalaza, kao i različiti putevi razgradnje H_2O_2 , interpretaciju aktivnosti CAT treba posmatrati s oprezom.

Kod tretiranih micelija gljiva starih 20 h (slika 4.7.3. A), aktivnosti CAT su bile neznatno smanjene u odnosu na kontrolne nakon 1 h tretmana. Takva promena je zabeležena i u aktivnosti POD, što može ukazivati na potencijalnu blagu inhibiciju oba enzima, od strane ROS-a. Nakon tretmana od 5 h, aktivnost CAT (kao i POD) je bila neznatno povećana kod micelija tretiranih 10 mM V(V), što se može objasniti time da je visoka koncentracija ROS-a pri dužoj izloženosti blago stimulisala povećanje aktivnosti ova dva enzima. Kod micelija gljive stare 36 h, vanadat nije doveo do jasnih promena u aktivnosti CAT, dok je u micelijumu starom 56 h zabeležena aktivnost CAT bila slična aktivnosti POD, gde su tretmani 10 mM V(V) doveli do blagog, ali ne statistički značajnog porasta aktivnosti i nakon 1 h i 5 h tretmana.

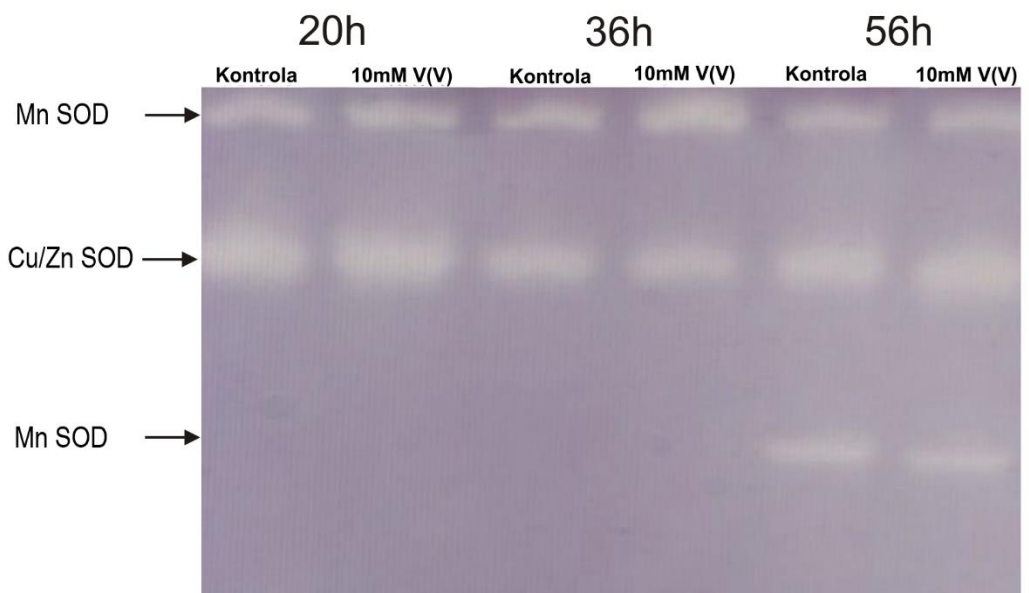


Slika 4.7.3. Efekat V(V) na aktivnost CAT u micelijama starosti 20 h (A), 36 h (B) i 56 h (C). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Neparametarski Man-Vitni test je korišćen za poređenje kontrole i tretmana i statistički značajna razlika između dve grupe podataka je prikazana zvezdicama; ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.7.4. Aktivnost SOD

Za razliku od CAT i POD, SOD je enzim čija je aktivnost izraženija kod starijih gljiva (De Castro et al., 2013), što je potvrđeno i za *P. blakesleeanus* (Slike 4.1.3. i 4.7.4). Kako bi se utvrdila aktivnost različitih formi ovog enzima rađeno je elektroforetsko razdvajanje na poliakrilamidnom gelu. Što se aktivnosti tiče, nije uočena razlika u intenzitetu i površini razdvojenih traka, te se moglo zaključiti da tretmani vanadatom nisu doveli do promene aktivnosti SOD.

Poznato je da *P. blakesleeanus*, kao i većina filamentoznih gljiva i kvasaca poseduje dve forme SOD: Cu/Zn-SOD i Mn-SOD, koje su neophodne za njeno normalno funkcionisanje (De Castro et al., 2013). Kod *S. cerevisiae* Cu/Zn-SOD i Mn-SOD su neophodni u kasnoj stacionarnoj fazi rasta kako bi se zaštitili mitohondrijalni proteini od oksidativnih oštećenja (Longo et al., 1996). Udeo svake forme u ukupnoj aktivnosti SOD može biti različit i zavisi od vrste gljive. Nativna elektroforeza je omogućila da se u analiziranim uzorcima vizuelizuju pomenute izoforme SOD, a najinteresantniji rezultat je bila pojava još jedne trake u poliakrilamidnom gelu, odnosno nove izoforme SOD na gelu u micelijama kontrolnih i tretiranih gljiva starih 56 h. Pored jedne Cu/Zn-SOD i jedne Mn-SOD, koje su uočene u micelijama mlađih gljiva (20 h i 36 h), kod micelija u stacionarnoj fazi razvoja (56 h) se javila dodatna izoforma Mn-SOD.

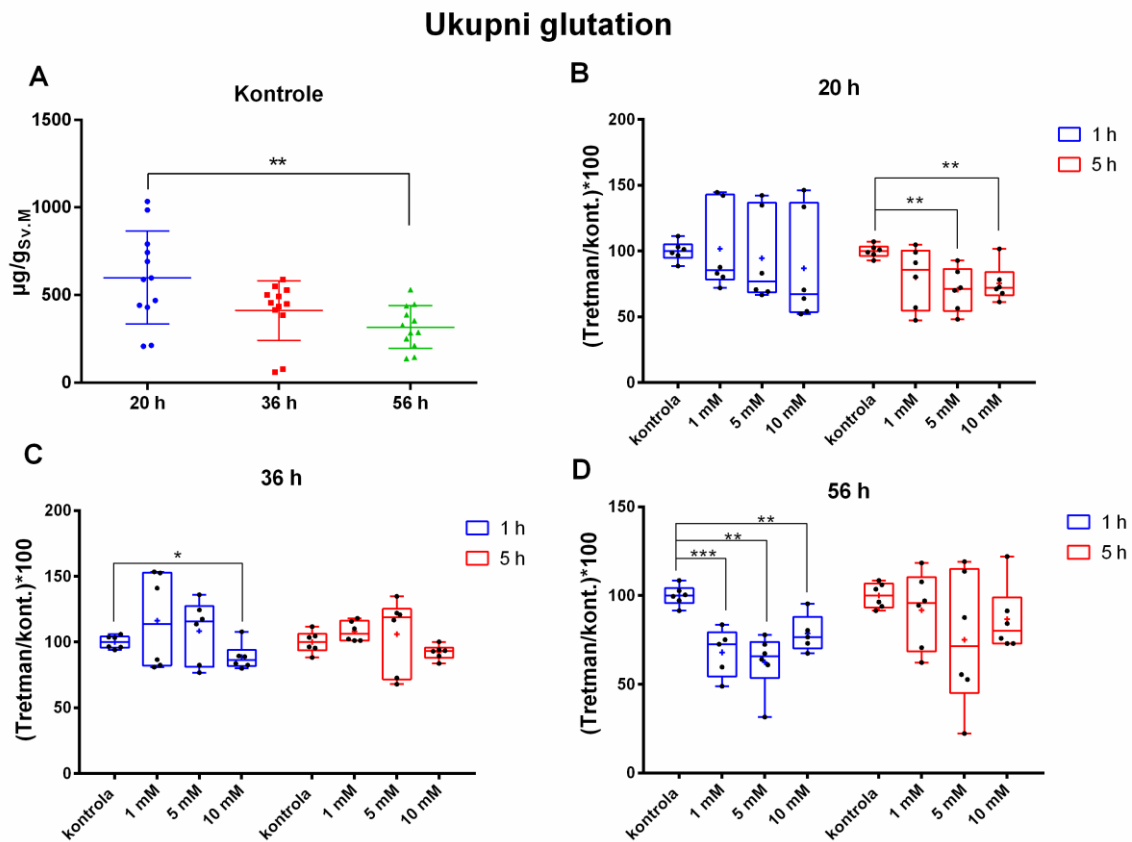


Slika 4.7.4. Poliakrilamidni gel nakon bojenja za detekciju aktivnosti SOD. Analizirani su ekstrakti kontrolnih micelija (20 h, 36 h i 56 h), kao i micelija tretiranih 10 mM V(V) nakon 5 h tretmana. Strelicama su obeležene uočene izoforme.

4.7.5. Koncentracija ukupnog glutaciona

Kada se analizira koncentracija ukupnog glutaciona u kontrolnim uzorcima (slika 4.7.5. A), može se uočiti da je sa povećanjem starosti micelije došlo do pada koncentracije glutaciona, koja je bila najmanja u 56 h starim micelijama. U micelijama 20 h starih gljiva, tokom tretmana od 1 h nije došlo do značajnih promena, ali nakon 5 h tretmana došlo je do smanjenja koncentracije ukupnog glutaciona ($p \leq 0,01$, za micelijume tretirane 5 i 10 mM V(V)). Kod micelija starih 36 h, nisu uočene tako jasne promene, osim kod onih koje su tretirane 10 mM V(V), u kojima je zabeleženo smanjenje koncentracije glutaciona nakon 1 h tretmana ($p \leq 0,05$). Najveća promena kod ovog neenzimskog antioksidansa je uočena u micelijama

starosti 56 h (slika 4.7.5 D), gde je zabeleženo statistički značajno smanjenje koncentracije glutaciona u svim micelijama nakon tretmana od 1 h.

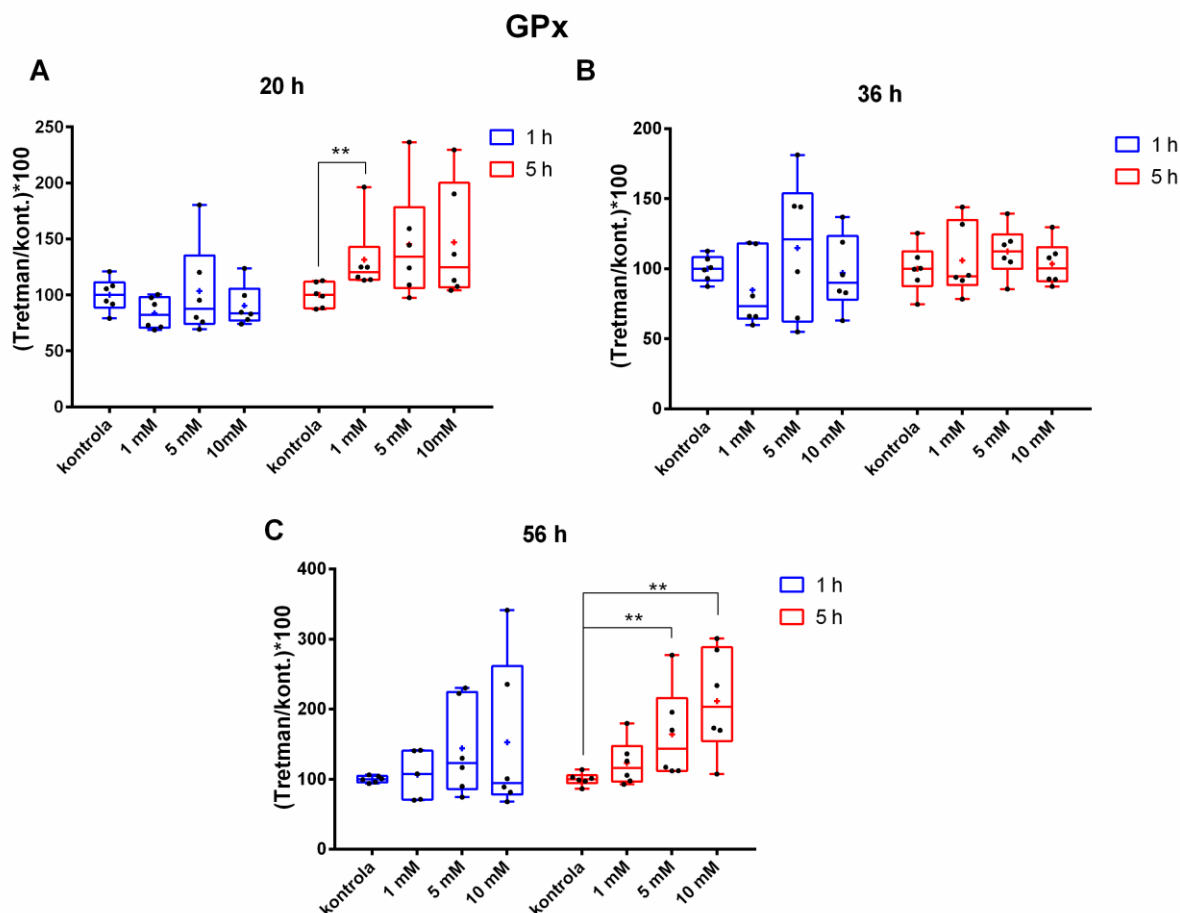


Slika 4.7.5. A) Prikaz koncentracije ukupnog glutaciona (izražen u mikrogramima po gramu sveže mase, $\mu\text{g/g}_{\text{sv.M}}$) u kontrolnim micelijama starim 20 h, 36 h i 56 h; objedinjene su sve kontrole (i od 1 h i 5 h, $n \geq 12$). Poređenje je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Tukijevim testom; Efekat V(V) na koncentraciju ukupnog glutaciona u micelijumu gljive stare 20 h (**B**), 36 h (**C**) i 56 h (**D**). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Poređenje kontrole i tretmana je vršeno neparametarskim Man-Vitni testom; Statistički značajna razlika između grupa podataka je prikazana zvezdicama, ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.7.6. Aktivnost GPx

GPx je enzim uključen u glutationski ciklus, odnosno on katalizuje reakciju između GSH i H_2O_2 (ili lipidnih peroksida), gde kao krajnji proizvod nastaju GSSG i H_2O . Na taj način se oksiduje redukovani glutation, ali se uklanjaju reaktivne vrste kiseonika, tako da je aktivnost ovog enzima usko vezana sa koncentracijom glutaciona, odnosno odnosom GSH i GSSG.

Najveće promene u aktivnosti GPx, nakon tretmana vanadatom, su zabeležene kod micelija 56 h starih gljiva, kod kojih su zabeležene i najveće promene u sadržaju ukupnog glutationa (slika 4.7.6. C). Izrazito povećanje aktivnosti GPx ($p < 0,01$) je zabeleženo u micelijama tretiranim 5 mM i 10 mM V(V) tokom 5 h. U micelijama starosti 20 h, jednočasovni tretmani nisu doveli do značajne promene aktivnosti GPx, dok su duži tretmani doveli do trenda povećanja aktivnosti u svim tretiranim micelijama u poređenju sa kontrolnim, pri čemu je statistički značajan porast zabeležen samo kod tretmana 1 mM vanadatom ($p < 0,01$). Kod micelija gljiva u kasnoj eksponencijalnoj fazi razvoja nije došlo do značajnih promena u aktivnosti GPx ni nakon tretmana od 1 h ni nakon tretmana od 5 h.

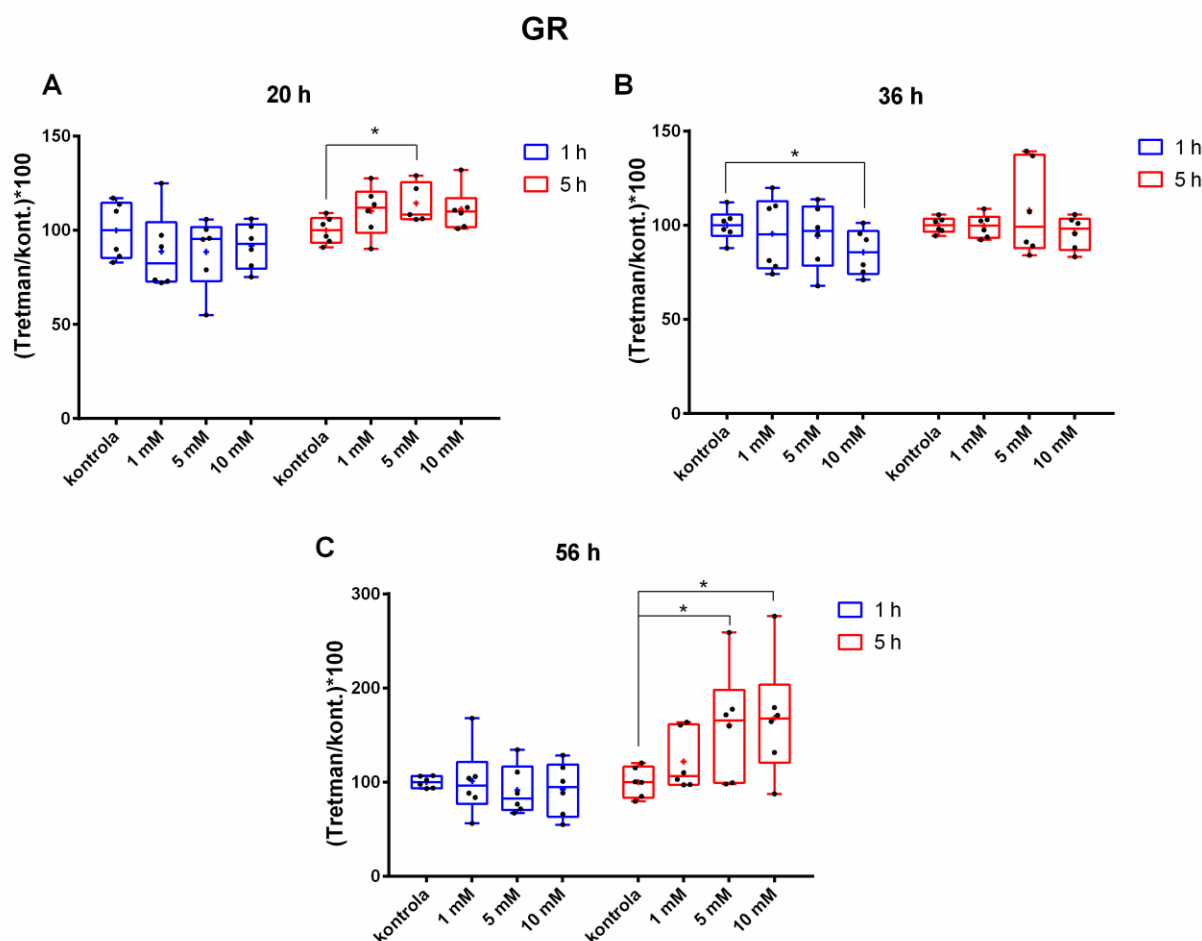


Slika 4.7.6. Efekat V(V) na aktivnost GPx u micelijumu starosti 20 h (**A**), 36 h (**B**) i 56 h (**C**). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Neparametarski Man-Vitni test je korišćen za poređenje kontrole i tretmana i statistički značajna razlika između dve grupe podataka je prikazana zvezdicama; ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

GPx kao i CAT i POD ima peroksidaznu aktivnost, a dobijeni rezultati ukazuju na značajniju ulogu ovog enzima u uklanjanju ROS u micelijumu *P. blakesleeanus* u odnosu na CAT, bar u uslovima izloženosti vanadatu.

4.7.7. Aktivnost GR

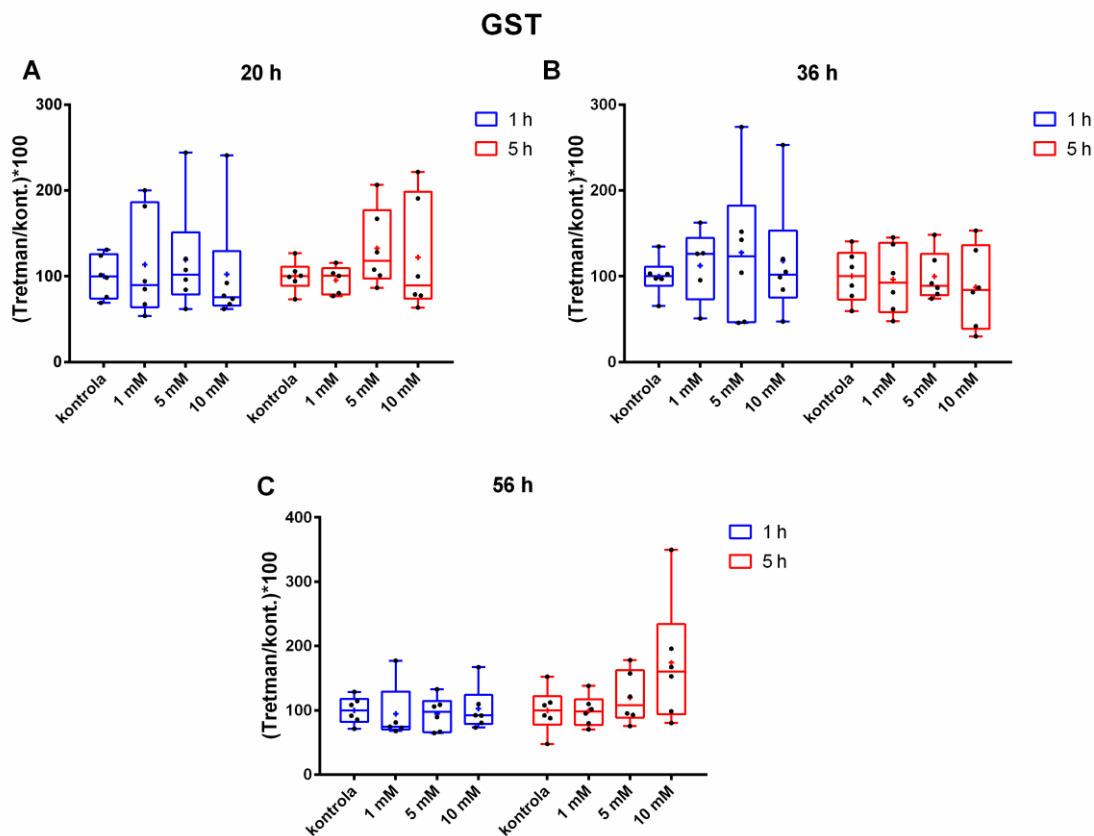
Kao i GPx, GR je enzim uključen u glutationski ciklus, on redukuje GSSG, pri čemu se GSH obnavlja i na taj način se održava optimalan odnos redukovanog i oksidovanog glutaciona. Kako su najveće promene u sadržaju glutaciona uočene kod 56 h starih micelija, najveće promene u aktivnosti GR, kao i za GPx su zabeležene upravo kod njih (slika 4.7.7. C). Nakon tretmana od 5 h došlo je do značajnog porasta aktivnosti GR u micelijumima tretiranim 5 mM i 10 mM V(V) ($p \leq 0,01$), ali je blagi porast zabeležen i u micelijumu tretiranom 1 mM V(V), dok jednočasovni tretmani nisu doveli do značajnijih promena. Kod 20 h starih micelija uočen je trend povećanja aktivnosti GR nakon 5 h u svim tretiranim micelijama, koji je statistički bio značajan za 5 mM tretman ($p \leq 0,05$), dok je kod micelija 36 h starih gljiva jedina značajna promena zabeležena nakon tretmana od 1 h sa 10 mM V(V), kada je došlo do pada aktivnosti GR ($p \leq 0,05$).



Slika 4.7.7. Efekat V(V) na aktivnost GR u micelijumu gljive stare 20 h (**A**), 36 h (**B**) i 56 h (**C**). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu ogradaenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Neparametarski Man-Vitni test je korišćen za poređenje kontrole i tretmana i statistički značajna razlika između dve grupe podataka je prikazana zvezdicama; ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.7.8. Aktivnost GST

GST je još jedan od enzima koji su uključeni u glutationski ciklus, koji katalizuje reakciju između GSH i ksenobiotika, kao i oksidovanih metabolita, poput 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) (Singhal et al., 2015), čime se neutrališe njihovo štetno delovanje. Kada se pogledaju dobijeni rezultati (slika 4.7.8.) teško je govoriti o samom efektu vanadata na ovaj enzim, pošto je i pored normalizacije podataka zabeležena velika razlika u aktivnosti enzima između eksperimentalnih serija. U micelijama gljiva starih 20 h (slika 4.7.8. A), nije došlo do jasnih promena u aktivnosti ovog enzima, a isto je zabeleženo i u micelijama gljiva starih 36 h (slika 4.7.8. B), kod kojih nije došlo ni do značajnih promena u sadržaju ukupnog glutatona, a ni u aktivnosti druga dva enzima, GPx i GR. Jedina naznaka promene u aktivnosti GST, odnosno porast aktivnosti, je zabeležen u micelijama starim 56 h, koje su tretirane 10 mM V(V) tokom 5 h (slika 4.7.8. C).

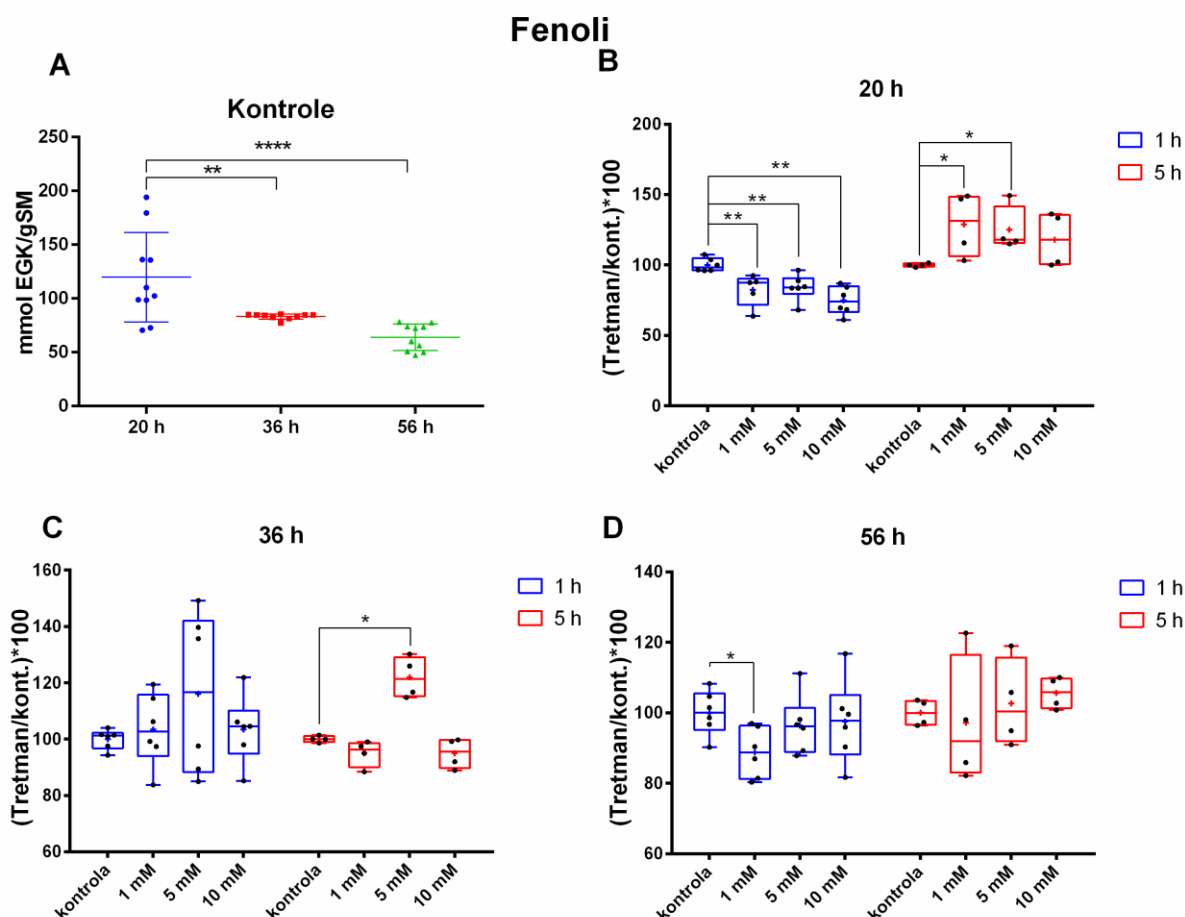


Slika 4.7.8. Efekat V(V) na aktivnost GST u micelijumu gljive stare 20 h (A), 36 h (B) i 56 h (C). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu ograničenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Neparametarski Man-Vitni test je korišćen za poređenje kontrole i tretmana i statistički značajna razlika između dve grupe podataka je prikazana zvezdicama; ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***)).

4.7.9. Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja

Na slici 4.7.9. A je prikazana koncentracija fenolnih jedinjenja izražena kao sadržaji ekvivalenata galne kiseline (EGK) u kontrolnim uzorcima. Može se uočiti da je u micelijama starim 20 h njihova koncentracija najveća, dok je kod starijih micelija zabeležena značajno niža koncentracija fenola ($p \leq$

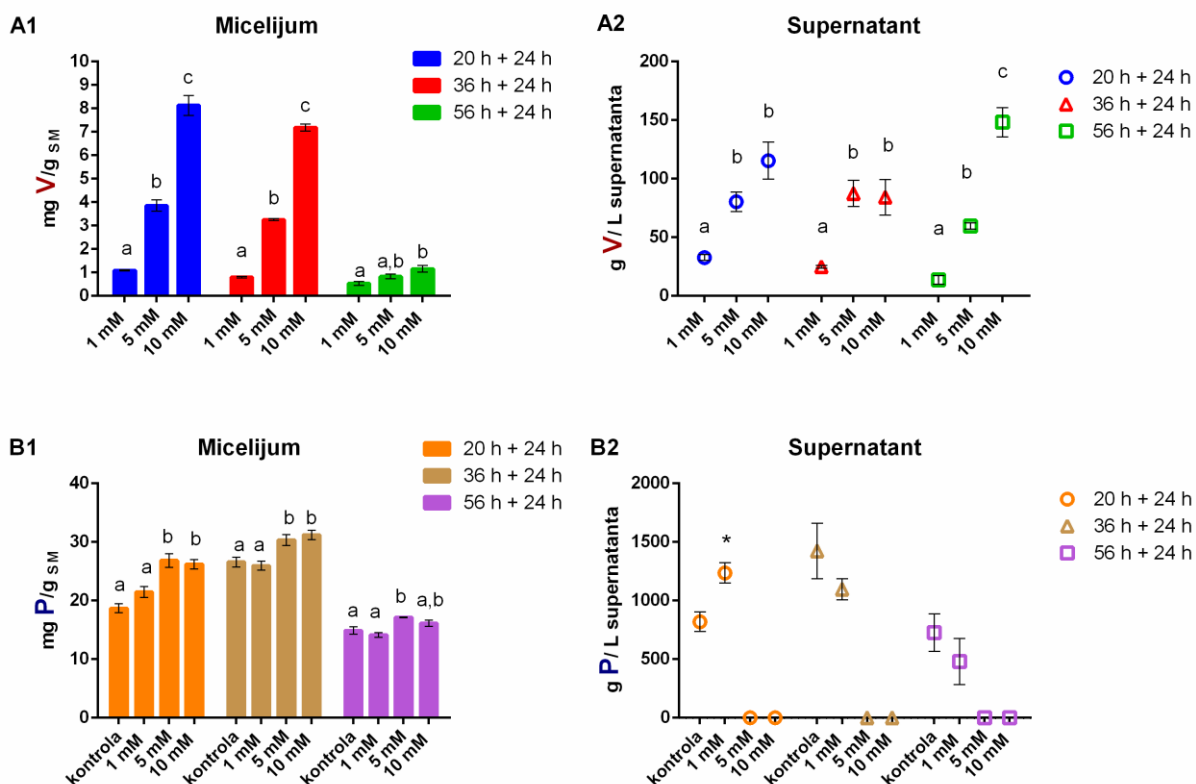
0,01 za 36 h i $p \leq 0,0001$ za 56 h). Kada se pogledaju tretirane micelije, uočava se da su kraći tretmani kod micelija u eksponencijalnoj fazi razvoja (slika 4.7.9. B) doveli do smanjenja sadržaja fenola u svim tretiranim micelijama ($p \leq 0,01$), dok je nakon 5 h tretmana zabeležen porast sadržaja fenolnih jedinjenja ($p \leq 0,05$ za 1 i 5 mM V(V)). U micelijumu gljiva starih 36 h i 56 h (slika 4.7.9. C i D) nije došlo do značajnijeg povećanja nakon 5 h tretmana, sa izuzetkom statistički značajnog porasta kod 36 h starog micelijuma tretiranog 5 mM V(V) ($p \leq 0,05$). Tretmani od 1 h kod 36 h starih gljiva su doveli do neznatnog povećanja sadržaja fenola, dok je kod 56 h starih gljiva došlo do smanjenja koje je jedino bilo statistički značajno kod micelijuma tretiranog 1 mM V(V) ($p \leq 0,05$).



Slika 4.7.9. A) Prikaz sadržaja fenolnih jedinjenja izražen u ekvivalentima galne kiseline (mmol EGK/g_{SM}) u kontrolnim micelijama starosti 20 h, 36 h i 56 h; objedinjene su sve kontrole (i od 1 h i 5 h, $n \geq 10$). Poređenje je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Tukijevim testom; Efekat V(V) na sadržaj fenola u micelijama starim 20 h (**B**), 36 h (**C**) i 56 h (**D**). Vrednosti su normalizovane na kontrolu i prikazane dijagramima u obliku pravougaonika gde vodoravna linija predstavlja medijanu, ograđenu opsegom verovatnoće od 25% do 75%, a kraci predstavljaju minimalne i maksimalne vrednosti. Ovim načinom prikazivanja vidimo sve podatke (prikazani kao tačke), odnosno njihovu raspodelu ($n \geq 4$). Poređenje kontrole i tretmana je vršeno neparametarskim Man-Vitni testom; Statistički značajna razlika između grupa podataka je prikazana zvezdicama, ($p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****)).

4.8. Određivanje sadržaja vanadijuma u micelijumu

Metodom optičke emisije spektroskopije sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) je određen sadržaj vanadijuma i fosfora u micelijumu gljive *P.blakesleeanus*, nakon njenog izlaganja vanadatu u trajanju od 24 h. Dobijeni rezultati pokazuju koncentraciono zavisno usvajanje vanadata, odnosno koncentracija usvojenog vanadata je statistički značajno rasla sa porastom koncentracije u medijumu kod micelija starih 20 i 36 h ($p \leq 0,001$), dok je kod micelija starih 56 h uočen isti trend, ali je porast koncentracije vanadata u miceliji bio statistički značajan samo između micelija gajenih na 1mM i 10 mM vanadatu (slika 4.8.1. A1). Kod prikaza sadržaja vanadijuma u micelijumu i supernatantu, nisu prikazani kontrolni uzorci, jer u njima normalno nije prisutan vanadat, dok kod sadržaja fosfora, postoje kontrolni uzorci, pošto micelijum gljive, a i medijum u kojem raste sadrže fosfor.



Slika 4.8.1. Sadržaj vanadijuma (**A1**) i fosfora (**B1**) u micelijumima (izraženi kao mgV/P po g suve mase (SM) i supernatantima (**A2** i **B2**) (izraženi kao mg V/P po ml supernatanta) gljive *P. blakesleeanus*, nakon tretmana od 24 h, rastućim koncentracijama vanadata (1 mM, 5 mM i 10 mM). Prikazane su srednje vrednosti $\pm$ standardna greška ($n \geq 3$). Poređenje kontrola i tretmana je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćene Holm-Sidak testom, sa nivoom značajnosti od 0,05. Tretmani obeleženi različitim malim slovom su statistički značajno različiti.

Ako se uporede međusobno sadržaji vanadijuma u zavisnosti od faze rasta, može se zaključiti da je usvajanje u eksponencijalnoj i kasnoj eksponencijalnoj fazi razvića bilo slično i kod tretmana sa 10 mM V(V) sadržaj vanadijuma u micelijumu je iznosio blizu 1% suve mase, odnosno kod 20 h 0,8%, a kod 36 h 0,7%. (tabela 4.8.1). U stacionarnoj fazi razvića, zabeleženo je znatno manje usvajanje, te sadržaj vanadijuma u micelijumu koji je tretiran 10 mM V(V) je iznosio 0,1% suve mase micelijuma. Ovo se može objasniti time da je u stacionarnoj fazi gljiva metabolički znatno manje aktivna nego u prethodno

pomenutim fazama, a takođe to ukazuje da je za unos vandata neophodna energija, odnosno da je transport vandata u micelijum energetski zavisian.

Tabela 4.8.1. Prikaz sadržaja vanadijuma u tretiranim micelijama, nakon 24 h tretmana sa 1 mM, 5 mM i 10 mM V(V). Sadržaj vanadijuma je izražen u %, u odnosu na ukupnu suhu masu micelije.

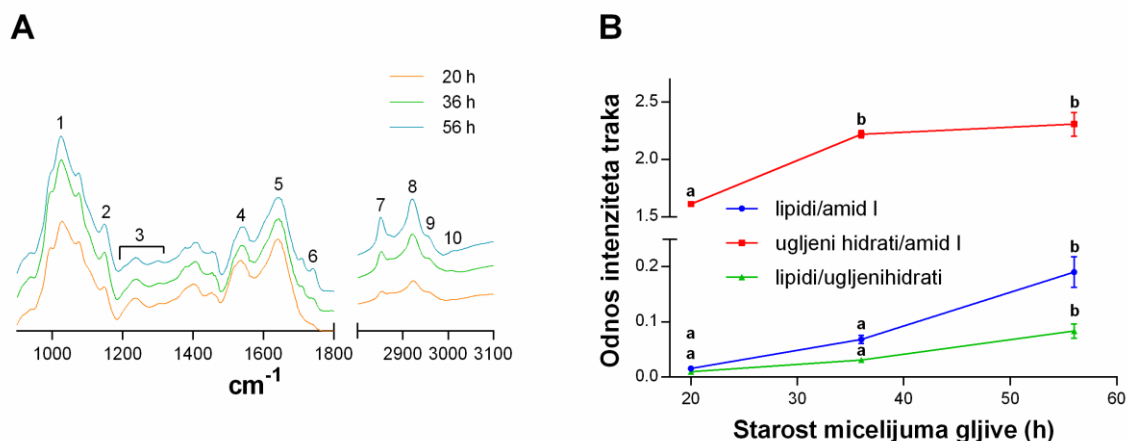
Sadržaj vanadijuma u tretiranim micelijama (%)			
	1 mM	5 mM	10 mM
20 h + 24 h	0,11	0,39	0,81
36 h + 24 h	0,08	0,33	0,72
56 h + 24 h	0,05	0,08	0,12

Zanimljiv rezultat je zabeležen kod supernatanata micelijuma koji su tretirani većim koncentracijama V(V) (5 mM i 10 mM), u pogledu sadržaja fosfora (slika 4.8.1. B2). Naime, u ovim supernatantima nije pronađen fosfor, dok u kontrolnim i u supernatantima micelija tretiranih 1 mM V(V) jeste. Pošto je poznato da je vanadat anjon $(VO_4)^{3-}$ analog fosfata $(PO_4)^{3-}$ i da ulazi u ćeliju koristeći fosfatne transportere, očekivano bi bilo da su oni međusobno kompetitivni, ali u ovom slučaju je izgleda vanadat stimulisao usvajanje fosfora koji je u medijumu prisutan u obliku fosfata.

4.9. FTIR analiza

FTIR spektroskopija je rađena kako bi se odredio „metabolički otisak“ gljive *P. blakesleeanus*, odnosno uporedio sadržaj značajnih biomolekula micelijuma kao što su lipidi, proteini i ugljeni hidrati. Ova metoda ne zahteva opsežnu pripremu uzorka i može se koristiti u različitim fazama razvoja gljiva, uz to analizom micelija i plodnih tela, mogu se obezbediti značajne informacije o biologiji gljiva, tako da FTIR spektroskopija predstavlja izuzetno korisnu tehniku (Naumann, 2015). U studiji Dzurendove i saradnika je korišćena za ispitivanje produkcije lipida i drugih značajnih metabolita gljiva iz razdela Mucoromycota (Dzurendova, Zimmermann, Kohler, et al., 2020), dok je u studiji Dean i saradnika korišćena za praćenje promene sadržaja lipida, kao odgovor na nutritivni stres kod mikroalgi (Dean et al. 2010).

U ovoj tezi, FTIR analiza je korišćena kako bi se utvrdilo delovanje vanadata na gradivne biomolekule micelijuma (lipide, proteine i ugljene hidrate), po izlaganju micelijuma gljive starosti 20 h, 36 h i 56 h različitim koncentracijama vanadata (1 mM, 5 mM i 10 mM), tokom 5 h i 24 h. Na slici 4.9.1. A su prikazani usrednjeni spektri ($n \geq 3$) kontrolnih uzoraka micelija iz tri različite faze razvoja, na kojima su brojevima obeležni signali koji odgovaraju specifičnim funkcionalnim grupama, a u tabeli 4.9.1. su signali definisani.



Slika 4.9.1. A) Usrednjeni ($n \geq 3$) FTIR spektri kontrolnih micelija starih 20 h, 36 h i 56 h. Signali su obeleženi brojevima i njihov opis je dat u tabeli 4.9.1. **B)** Odnosi intenziteta određenih signala kod kontrolnih uzoraka (od bazne linije). Korišćeni su signali na 1743cm^{-1} (sadržaj lipida), na 1645cm^{-1} (amid I - proteini), i 1028cm^{-1} (ugljeni hidrati), i prikazani su odnosi lipidi/amid I, ugljeni hidrati/amid I i lipidi/ugljeni hidrati. Poređenje odnosa je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Holm-Sidakovim testom, sa nivoom značajnost od 0,05. Tačke obeležene različitim malim slovom su statistički značajno različite.

Tabela 4.9.1. Signali obeleženi na FTIR spektru (Al-Kelani & Buthelezi, 2024; Dzurendova, Zimmermann, Kohler, et al., 2020; Kosa et al., 2018; Malek et al., 2014; Movasaghi et al., 2008; Shapaval et al., 2023).

Signal br.	Talasni broj (cm^{-1})	Definicija signala	Biomolekul
1	1028	C-O i C-C simetrično istezanje; C-O-H savijajuća vibracija	Ugljeni hidrati, glikogen
2	1149	Asimetrično C-O istezanje	glikogen; mucin
3	1190-1330	Amid III region	
4	1520-1580	Amid II region	proteini, hitin
5	1580-1720	Amid I region	proteini
6	1743	C=O istezanje karbonilnih jedinjenja	lipidi
7	2850	-CH ₂ simetrično istezanje	lipidi
8	2920	-CH ₂ asimetrično istezanje	lipidi
9	2954	CH ₃ asimetrično istezanje (C-H)	lipidi
10	3008	=C-H istezanje nezasićenih lipida	lipidi

Pošto intenziteti signala zavise od morfologije, debljine kao i homogenosti uzoraka, FTIR analiza se ne može smatрати kvantitativnom. Međutim, upoređivanjem odnosa intenziteta određenih signala unutar spektra istog uzorka se mogu dobiti informacije o udelu određenih biomolekula u biomasi, kao i njihovim promenama, bilo da se radi o fazama razvoja ili određenim tretmanima. Oblast između $1180\text{--}950\text{cm}^{-1}$ je korišćena za analizu sadržaja ugljenih hidrata, signal na 1743cm^{-1} koji odgovara C=O istezanju karbonilnih jedinjenja je korišćen je za analizu lipida, dok je signal za amid I, koji se nalazi na 1645cm^{-1} korišćen za anlizu sadržaja proteina.

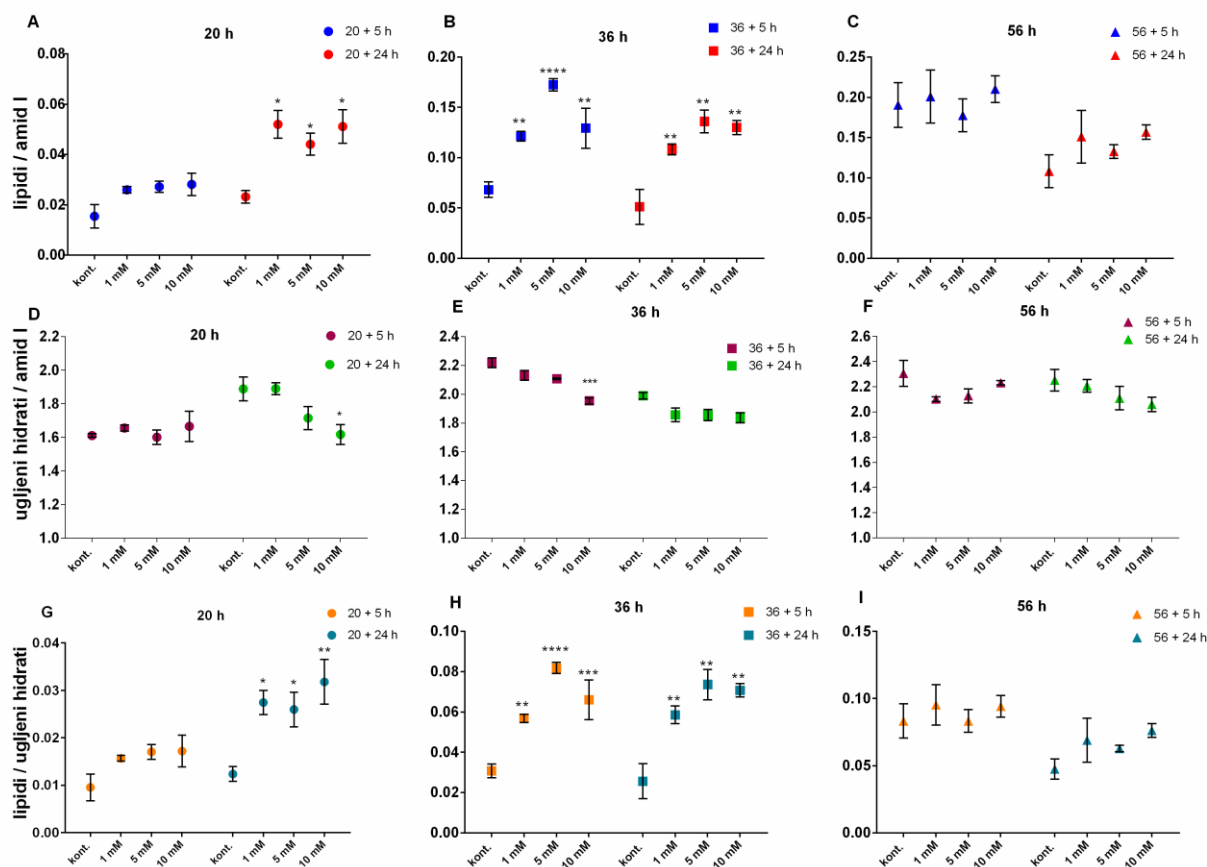
Na slici 4.9.1. B, prikazani su odnosi lipidi/amid I, ugljeni hidrati/amid I i lipidi/ugljeni hidrati kod kontrolnih micelija starosti 20 h, 36 h i 56 h. Uočeno je da je odnos lipidi/amid I bio povećan 4,4 puta, kod micelije stare 36 h i 12,3 puta kod micelije stare 56 h u poređenju sa micelijom starom 20 h, što ukazuje na povećanje sadržaja lipida u odnosu na proteine sa povećanjem starosti micelije. Lipidi su glavne komponente membrana, i mogu služiti kao izvor energije i ugljenika kada se skladište u organizmu u formi lipidnih kapi (Akpinar-Bayazit, 2014).

Odnos ugljeni hidrati/amid I je bio blago povećan 1,3 puta u 36 h staroj miceliji, odnosno 1,4 puta u 56 h staroj miceliji u poređenju sa 20 h starom micelijom, dok je odnos lipidi/ugljeni hidrati bio 3,2 puta veći u 36 h staroj miceliji, odnosno 8,7 puta veći u 56 h staroj miceliji, u poređenju sa 20 h starom micelijom.

Proučavajući odnose intenziteta ovih signala kod tretiranih micelija, uočeno je da kod micelijuma gljive stare 20 h (slika 4.9.2. A,D,G) do značajnih promena dolazi nakon dužeg izlaganja vanadatu (24 h). Udeo lipida u odnosu na proteine (slika 4.9.2. A) je bio povećan kod tretmana svim koncentracijama vanadata ($p \leq 0,05$), a takođe je zabeleženo i povećanje udela lipida u odnosu na ugljene hidrate (slika 4.9.2. G), a najveća razlika je zabeležena u micelijumu tretiranom 10 mM V(V) ($p \leq 0,01$). Odnos ugljenih hidrata i proteina je bio blago smanjen, ali jedino značajno smanjenje je zabeleženo u micelijumu tretiranom 10 mM V(V), ($p \leq 0,05$) nakon tretmana od 24 h.

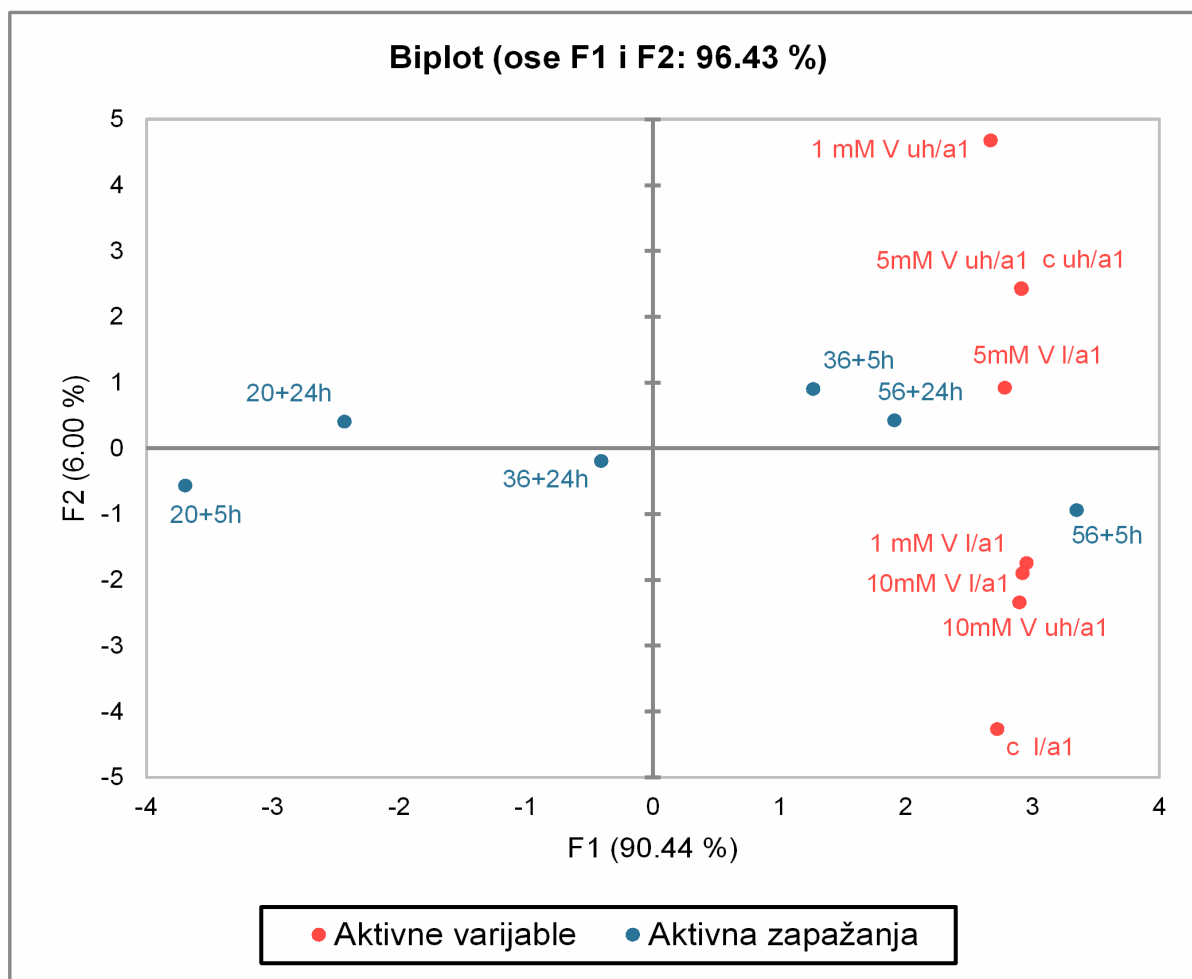
Kod micelijuma starog 36 h (slika 4.9.2. B, E, H), vanadat je doveo do promena i nakon kraćih (5 h) i nakon dužih tretmana (24 h) i to pri svim koncentracijama. Udeo lipida u odnosu na proteine i na ugljene hidrate je bio značajno povećan kod svih tretiranih micelija, a najveće povećanje je uočeno kod micelijuma tretiranog 5 mM V(V), tokom 5 h ($p \leq 0,0001$). Odnos ugljenih hidrata/amid I je bio smanjen i nakon 5 h i 24 h, a značajno smanjenje je zabeleženo u micelijumu tretiranom 10 mM V(V), nakon 5 h tretmana ($p \leq 0,001$).

Tretmani vanadatom nisu doveli do značajnijih promena u odnosima sadržaja lipida, proteina i ugljenih hidrata kod micelijuma gljive stare 56 h (slika 4.9.2. C, F, I). Ovi rezultati se mogu objasniti time da je micelijum u stacionarnoj fazi rasta metabolički manje aktivan, a takođe i time da je u ovoj fazi razvoja zabeležen najmanji unos vanadata (Slika 4.8.1. A1).



Slika 4.9.2. Efekat tretmana vanadatoma na odnose lipida, ugljenih hidrata i proteina, u micelijama u različitim fazama razvoja (20 h, 36 h i 56 h), kada se izlože rastućim koncentracijama vanadata (1 mM, 5 mM i 10 mM) tokom 5 h i 24 h. Poređenje odnosa kontrolnih uzoraka i tretiranih micelija je vršeno jednofaktorskom analizom varijanse (One Way ANOVA), praćeno Holm-Sidakovim testom, $p \leq 0,05$ (*), $\leq 0,01$ (**), $\leq 0,001$ (***), $\leq 0,0001$ (****).

Da bi se uporedio značaj učešća faze razvoja i tretmana vanadatoma na promenu sadržaja lipida, proteina i ugljenih hidrata, rađena je analiza glavnih komponenti (PCA) zasnovana na korelacionoj matrici. Rezultati su prikazani kao biplot, a zbog sličnosti u odnosima lipidi/amid I i lipidi/ugljeni hidrati, izostavljen je odnos lipidi/ugljeni hidrati, kako bi prikaz bio što jasniji (slika 4.9.3). Tokom analize zadržane su dve faktorijalne ose koje čine 90,44% (F1) i 6,00% (F2) ukupne varijanse. Analiza PCA ravni pokazuje da su faze rasta poravnate gotovo u jednom nizu duž F1 ose, počevši od micelijuma u eksponencijanoj fazi (20 h), na negativnom kraju, a završavajući se sa micelijumom u stacionarnoj fazi (56 h) na pozitivnom kraju. Rezultati ukazuju na to da se sadržaj ugljenih hidrata i lipida povećavao u micelijumu tokom razvika, tako da se F1 osa može nazvati razvojnom osom. S obzirom da F1 osa objašnjava većinu varijanse, očigledno je da razvojne promene imaju mnogo značajniji uticaj na sadržaj ugljenih hidrata i lipida u micelijumu gljive u poređenju sa V(V) tretmanima. V(V) tretmani su jasno raspoređeni duž F2 ose, tako da se ona može nazvati V(V) osom. Iako su efekti vanadata manje izraženi od razvojnih, oni su i dalje veoma jasni, jer su kontrolni uzorci odvojeni od uzoraka tretiranih V(V) duž F2 ose. U slučaju sadržaja lipida, ovo važi za sve koncentracije vanadata, dok za ugljene hidrate važi samo pri najvišoj koncentraciji V(V) (10 mM). PCA analiza je takođe pokazala da tretmani vanadatoma imaju suprotne efekte na sadržaj lipida i ugljenih hidrata, odnosno da povećavaju sadržaj lipida, a smanjuju sadržaj ugljenih hidrata u micelijumu.



Slika 4.9.3. Analiza glavnih komponenti (PCA) zasnovana na korelacionoj matrici. Rezultati su prikazani kao biplot sadržaja biomolekula (lipida, ugljenih hidrata i proteina) u kontrolnim (c) i V(V) tretiranim uzorcima (V), nakon tretmana rastućim koncentracijama vanadata (1 mM, 5mM i 10 mM) tokom 5 h i 24 h. Diferencijacija duž F1 ose objašnjava 90,44% varijanse i uglavnom se odnosi na stadijum razvića micelije. Diferencijacija duž F2 ose objašnjava 6% varijanse i može se prepisati tretmanima vanadatom; uh-ugljeni hidrati, a1-amid I, l-lipidi

Uzimajući u obzir prikazane rezultate FTIR analize, može se zaključiti da se sa razvićem gljive, sadržaj lipida i ugljenih hidrata u micelijumu povećavao, a da su tretmani vanadatom kod micelija gljiva koju su bile u eksponencijalnoj i kasnoj eksponencijalnoj/ranoj stacionarnoj fazi doveli do povećane produkcije lipida, odnosno povećanog udela lipida u odnosu na proteine i ugljene hidrate, a smanjenja sadržaj ugljenih hidrata.

5. Diskusija

Phycomyces blakesleeanus je jedna od najbolje proučenih gljiva iz nekadašnjeg razdela Zygomycota, koju karakteriše brz rast, kratak životni ciklus od svega nekoliko dana i velika produkcija spora (Cerdá-Olmedo E., 1987). Nalazi se u bazi filogenetskog stabla gljiva i striktno je aerobna. Kao saprotrof, učestvuje u razlaganju organskih materija i njen rast je uslovljen dostupnošću istih. Sve dok su obezbeđeni odgovarajući uslovi micelija može da se razvija, tako i nekoliko meseci star micelijum sadrži delove citoplazme sa više jedara i može ponovno da raste (Cerdá-Olmedo, 2001). U laboratorijskim uslovima se razvija sve dok ima neophodne nutrijente na raspolaganju. Većina dosadašnjih studija se bavila fiziologijom sporangiofora, dok je micelijum privukao manje pažnje iako njegov brz rast i kratak životni ciklus pružaju mogućnost brzog i pouzdanog testiranja interakcije sa različitim faktorima okoline i ispitivanje potencijalnih industrijskih primena. Razmatrane su strategije povećanja produkcije β -karotena kod *P. blakesleeanus* kao karotenogene gljive (Kuzina & Cerdá-Olmedo, 2007), a nedavno je utvrđeno da micelijum pri izloženosti selenitu (Se(IV)) produkuje selenove nanočestice (Žižić et al., 2022). Takođe, sa sadržajem lipida od 20-28% (Chenouda, 1970), koji u neutralnim pH uslovima može dostići i 40% (Cerdá-Olmeda & Avalos, 1994), *P. blakesleeanus* se može smatrati oleaginoznom gljivom, ali nije bilo pokušaja da se uspostavi industrijska proizvodnja lipida iz ove gljive, koji bi mogli imati upotrebnu vrednost ili u ishrani ili u proizvodnji biodizela.

Sa razvojem biotehnologije, filamentozne gljive se uveliko koriste u fermentacionoj industriji kao značajan izvor enzima i metabolita (Wang et al., 2005). Industrijska proizvodnja u bioreaktorima (*up-scale*), međutim, predstavlja poseban izazov zbog značajnih promena u uslovima rasta. Pre svega, neophodno je obezbediti neki tip mešanja kako bi se mikroorganizmi održali u suspenziji, što neizbežno dovodi do stresa zbog efekata dinamike fluida. Ovaj orbitalni stres ili „stres smicanja“, može dovesti do morfoloških promena, lize ćelija i metaboličkih promena (Lange et al., 2001), pošto konstantna rotacija nije nešto sa čime se većina organizama normalno sreće u svojim prirodnim staništima. Sa druge strane, povećana proliferacija ćelija je zabeležena u više istraživanja prilikom gajenja kultura na šejkeru (Asada et al., 2005; Dardik et al., 2005), a kao što je već napomenuto, primenom rotacije je gotovo duplirana biomasa micelije *P. blakesleeanus* (Nikolić, 2014). Jedan od razloga koji dovodi do ovog fenomena je svakako povećana dostupnost kiseonika i nutrijenata, a specifično kod *P. blakesleeanus*, centrifugalna sila zaustavlja proces razvoja sporangiofora koji je zavisen od prisustva sile gravitacije. Energija koja se u prirodnim uslovima ulaže u razvoj ovih formi može biti preusmerena u rast micelijuma. Što se metaboličkih promena tiče, Papagiani i saradnici su uočili da transfer *A. niger* iz statičkih uslova u uslove rotacije dovodi do povećanja produkcije limunske kiseline ali i promene morfologije iz rastresite u formu peleta (Papagianni et al., 1994), a produkcija egzopolisaharida kod *Tremella fuciformis* je zavisila od tipa mešanja, odnosno bila je veća u „*airlift*“ reaktorima nego u onima sa orbitalnom rotacijom (Cho et al., 2006). Kod *P. blakesleeanus* je pokazano smanjenje učešća cijanid-rezistentnih komponenti respiratornog lanca u ukupnom disanju pri gajenju na šejkeru (Nikolić, 2014), a u ovoj disertaciji je ispitana i aktivnost tri antioksidativna enzima, CAT, POD i SOD, u zavisnosti od uslova gajenja.

Za CAT i POD u micelijama gajenim u petri kutijama, odnosno u statičnim uslovima (Sl 4.1.1.1.B i 4.1.2.B), uočen je monoton pad aktivnosti sa starenjem, dok prilikom gajenja na šejkerima nakon inicijalnog pada dolazi do porasta aktivnosti ovih enzima, i to u satnicama kada u prirodnim uslovima dolazi do razvoja sporangiofora (Sl 4.1.1.1.A i 4.1.2.A), nakon čega se opet uočava pad. Ovo se može objasniti postojanjem različitih izoformi ovih enzima od kojih neke mogu biti inhibirane a druge aktivirane istim stresorom. Kod *A. nidulans* i kod *N. crassa*, pronađeno je više gena za CAT koje se eksprimiraju u različitim fazama razvoja; tako je povećana ekspresije CAT B (*A. nidulans*), odnosno CAT 3 (*N. crassa*), povezana sa aseksualnom sporulacijom (Kawasaki and Aguirre 2001; Aguirre et al. 2005;

Michán et al. 2002). Povećana ekspresija CAT 3 kod *N. crassa* je uočena pri kraju eksponencijalne faze rasta i nakon agregacije hifa (Michán et al., 2002), dok je povećana ekspresija CAT D (*A. nidulans*) i CAT 2 (*N. crassa*) zabeležena u stacionarnoj fazi razvoja ovih vrsta (Kawasaki & Aguirre, 2001; Peraza & Hansberg, 2002). Aktivnost SOD kod micelija gajenih u petri kutijama opada nakon 20 h razvića, da bi sa oko 36 h ponovo porasla mada ne na početni nivo, dok kod micelija gajenih na šejkeru u stacionarnoj fazi aktivnost SOD eksponencijalno raste (Sl 4.1.3), najverovatnije zahvaljujući aktivaciji još jedne izoforme Mn/SOD (Sl 4.7.4). Kod *N. crassa* i *F. decemcellulare* uočeno je povećanje aktivnosti SOD prilikom prelaska u stacionarnu fazu razvoja (Gessler et al., 2007). Sa starenjem povećava se nivo ROS, što dovodi i do povećanja aktivnosti ovog enzima (De Castro et al., 2013).

P. blakesleeanus toleriše visoke koncentracije vanadata

Poznato je da filamentozne gljive i kvasci generalno pokazuju visoku toleranciju na vanadijum i mogu rasti na koncentracijama vanadata u milimolarnom opsegu (Ceci et al., 2012; Mannazzu et al., 1998). U okviru ove disertacije ispitano je dejstvo V(V) na rast micelijuma koji je tretiran u trenutku inokulacije (izražen kao TI) i micelijuma tretiranog u različitim fazama razvića (izražen kao stopa rasta). U prvom slučaju je vanadat sa porastom koncentracije doveo do gotovo linearnog smanjenja biomase (Sl 4.4.1). Ceci i saradnici su ispitivali uticaj 4 različite koncentracije vanadata (1, 2, 3 i 6 mM) na rast šest vrsta gljiva, i uočili su da je došlo do značajne inhibicije rasta kod svih izuzev *Clonostachys rosea* (Ceci et al., 2012). Han i saradnici su pokazali da sa porastom koncentracije vanadata u medijumu (od 0,3%) dolazi do smanjenja rasta *Ganoderma lucidum* i *Grifola frondosa* (Han et al., 2009), dok su Xu i saradnici pokazali da je *A. muscaria* najosetljivija i najmanje tolerantna na različita vanadatova jedinjenja, u odnosu na druge proučavane gljive. Ona je imala najmanji TI i najmanji dijametar rasta (Y.-H. Xu et al., 2019). Iz tabele 4.4.1. se može videti da je vanadat negativno uticao na rast *P. blakesleeanus*, međutim, kako je vanadat dodavan u isto vreme kada i aktivirane spore, u ovom trenutku nije moguće reći da li je inhibitorno dejstvo vanadata usmereno pre svega na klijanje spora ili izduživanje hifa.

U drugom eksperimentu su različite koncentracije V(V) (1, 5 i 10 mM) primenjivane na micelijume gljive u različitim fazama razvića, odnosno u eksponencijalnoj fazi (20 h), kasnoj eksponencijalnoj/ranoj stacionarnoj (36 h) i stacionarnoj fazi (56 h). Blagi inhibitorni efekat zabeležen je jedino kod micelija starih 36 h, dok u eksponencijalnoj i stacionarnoj fazi razvića vanadat nije imao uticaj na preživljavanje. Kod micelije gljive stare 20 h uočen je potencijalni hormezis efekat, gde su manje koncentracije vanadata stimulisale rast, dok je viša (10 mM) dovela do smanjenja stope rasta. Ovi rezultati su slični onima pokazanim za *P. blakesleeanus* u studiji Žižića i saradnika gde je V(V) u koncentraciji do 5 mM imao stimulativan efekat na miceliju u eksponencijalnoj fazi rasta gajenu u petri kutijama (Žižić et al., 2013). Stimulativan efekat vanadijuma na rast kineskog kupusa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), je zabeležen u studiji Tian i saradnika koji su predložili povećanje rasta kao potencijalni mehanizam u detoksikaciji vanadijuma; odnosno da povećanjem rasta dolazi do razblaženja koncentracije metala unutar ćelija biljke (Tian et al., 2014). García-Jiménez i saradnici su takođe uvideli stimulativan efekat vanadata na rast biljke bibera (García-Jiménez et al., 2018). S obzirom da je micelijum gljive *P. blakesleeanus* tretiran visokim koncentracijama vanadata koje nisu značajno uticale na vijabilnost, može se zaključiti da ova vrsta pokazuje visoku toleranciju prema istom. Međutim, bilo bi dobro i ispitati ponašanje micelije gljive nakon dužeg izlaganja vanadatu (>5 h), jer je u ovom eksperimentu micelijum izlagan V(V) tokom 5 h, nakon čega je vraćan u minimalni medijum na 12 h.

Vanadat izaziva oksidativni stres kod *P. blakesleeanus* čime aktivira antioksidativne sisteme ove gljive

U fiziološkim uslovima, ROS su prisutni u ćelijama i odgovorni su za germinaciju, razvoj i međućelijsku komunikaciju kod gljiva (Gessler et al., 2007). Održavanje nivoa ROS u grancama normale se postiže odgovarajućim antioksidativnim sistemima odbrane koje čine neenzimski antioksidansi i antioksidativni

enzimi. Prilikom analize enzimskih aktivnosti i koncentracija neenzimskih antioksidanasa važno je biti obazriv, pošto promena aktivnosti/koncentracije umnogome zavisi od samog stresora, njegove doze, kao i dužine izloženosti, a i samog organizma.

Vanadijum, kao prelazni metal, može učestvovati i u nastanku, ali i neutralisanju ROS (Rehder, 2013), te je DCFH-DA esejem određen njihov sadržaj nakon kraćih i dužih izlaganja vanadatu. Povećanje fluorescencije uzoraka praćeno ovim esejem ukazuje na povećanje intracelularnih ROS, pre svega H_2O_2 (Kalyanaraman et al., 2012). U netretiranom micelijumu sadržaj ROS je bio najveći u stacionarnoj fazi što se i očekuje kod starijih micelija gljiva. Laun i saradnici su pokazali da postoji akumulacija ROS u ćelijama *S. cerevisiae* pre apoptoze (Laun et al., 2001), mada kod nekih filamentoznih gljiva, kao što je *P. chrysogenum*, ne dolazi do akumulacije ROS tokom stacionarne faze rasta (Sámi et al., 2003). De Kastro i saradnici su ukazali da oksidativni stres može igrati ulogu u starenju *P. blakesleeanus* (De Castro et al., 2013), što je u skladu sa dobijenim rezultatima, gde je uočeno da je kod micelijuma u stacionarnoj fazi razvoja smanjen potencijal za uklanjanje ROS, odnosno ukupna antioksidativna aktivnost uzorka je bila nešto manja nego kod mlađih micelija (starosti 20 h i 36 h).

Interesantno je uporediti podatke o sadržaju ROS u kontrolnim micelijama sa slika 4.6.1. A i B. Kao u svim eksperimentima, kontrole su prošle identičan skup koraka kao tretmani, osim izlaganja vanadatu, dakle ispiranje i prebacivanje u svež medijum. Kontrolne vrednosti fluorescencije na slici 4.6.1. A su daleko niže od onih na slici 4.6.1. B, iako su starosti od 36 i 56 h relativno uporedive sa onima od 20 + 24 i 36 + 24 h. Jedina razlika u ove dve grupe podataka je vreme koje je prošlo od prebacivanja u svež medijum do trenutka merenja. Ispiranje i prebacivanje micelije u svež medijum se svakako može smatrati stresom samo po sebi, ali postavlja se pitanje zašto duži period od trenutka stresa koji uključuje i prisustvo inicijalne koncentracije glukoze i asparagina (izvori nutrijenata i energije) u medijumu, nije omogućio snažniju aktivaciju antioksidativnih sistema koji bi smanjili koncentraciju ROS. Jedna od mogućnosti je da ovako povećan sadržaj ROS zapravo predstavlja signal za povećanu sintezu polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), što predstavlja čest odgovor na stres kod oleaginoznih mikroorganizama (Shi et al., 2017) o čemu će više reči biti kasnije. Sadržaj ROS u vremenskoj tački 36 + 24 h je čak za red veličine veći nego u druge dve vremenske tačke (Sl. 4.6.1.B), a ova tačka odgovara stacionarnom stanju krive rasta, te je visok nivo ROS i očekivan. Sa druge strane, u tački 56 + 24 h nivo ROS ponovo opada, i moguće je da je u ovoj izuzetno kasnoj stacionarnoj fazi metabolička aktivnost micelije tako niska da se to odražava i na nivou ROS.

Kada se analizira sadržaj ROS pri kraćem izlaganju vanadatu (1 h i 5 h), najizraženiji efekti, odnosno najviši nivoi ROS su uočeni u micelijama starim 20 h, tretiranim 10 mM V(V), dok u micelijama starosti 36 h i 56 h nije došlo do tako velikih promena. U micelijumu stacionarne faze, jedva primetno povećanje sadržaja ROS bi moglo biti posledica smanjene propustljivosti ćelijskog zida i membrane u micelijumu koji stari (Sousa-Lopes et al., 2004), kao i smanjene metaboličke aktivnosti. Takođe, treba imati u vidu i to da su bazalni nivoi ROS bili povišeni u ovoj fazi rasta. Paralelno je praćen i antioksidativni kapacitet micelije nakon 1 i 5 h od izlaganja vanadatu (Sl 4.7.1). Kraće izlaganje (1 h) je dovelo do smanjenja antioksidativnog kapaciteta kod sve tri starosne grupe, dok je tretman od 5 h imao ovakav efekat samo u 36 h staroj miceliji. Ovaj rezultat ukazuje na relativno brzu adaptaciju, koja može objasniti izostanak efekata V(V) na vijabilnost, koji je zabeležen jedino u 36 h staroj miceliji (Sl 4.5.1). Kao standard u ABTS esejima je korišćen askorbat, čiji analozi D-eritroaskorbat i D-eritroaskorbat monoglukozid se prirodno javljaju u miceliji gljive *P. blakesleeanus* i čije je antioksidativno dejstvo izrazito visoko; čak se mogu smatrati i potentnijim antioksidansima od same askorbinske kiseline, te se potencijalno može razmatrati njihova produkcija u industrijskim uslovima (Baroja-Mazo et al., 2005; Gutierrez-Larrainzar et al., 2010).

Kada se analiziraju duža izlaganja vanadatu, od 24 h, uočava se značajno povećanje ROS u svim tretiranim micelijama, nezavisno od faze razvoja, a najveće povećanje je uočeno kod 36 h stare micelije. Treba uzeti u obzir to da je kontrola stara 36 h + 24 h, zapravo bila stara 60 h i da je bila u stacionarnoj fazi, pa konačni sadržaj ROS-a može biti kumulativni efekat i vanadijuma i oksidativnog stresa izazvanog starenjem micelijuma (de Castro et al. 2013). S druge strane, sadržaj ROS-a je oko 4 puta bio niži kod micelijuma starog 56 h (stvarna starost 80 h), što može ukazivati na nisku metaboličku aktivnost micelijuma u ovoj kasnoj stacionarnoj fazi, a na osnovu rezultata ICP analize, utvrđeno je da je unos, odnosno sadržaj vanadijuma u miceliji ove starosti bio nizak.

Fenolna jedinjenja predstavljaju značajnu i raznovrsnu grupu metabolita koje odlikuje prisustvo aromatičnog prstena sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Sintetišu se u gljivama, a mogu ispoljavati antioksidativna, antimikrobna, antitumorska i antiinflamatorna dejstva (Abdelshafy et al., 2022). Zbog tih svojstava, neki od njih nalaze primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Antioksidativna aktivnost fenola i polifenola ogleda se u njihovoj sposobnosti da heliraju jone metala, čime se sprečava nastanak ROS-a, a pored toga, deluju i kao "hvatači" samih ROS, neutrališući ih i na taj način smanjujući oksidativni stres u ćelijama (Michalak, 2006). Takođe, određene grupe fenolnih jedinjenja, kao što su flavonoidi, učestvuju u reakcijama sa POD, pri čemu dolazi do razgradnje vodonik-peroksida što dodatno doprinosi njihovom antioksidativnom efektu (Michalak, 2006).

P. blakesleeanus proizvodi značajne količine galne i protokatehinske kiseline, posebno u sporangioforima, ali je micelijum takođe bogat ovim jedinjenjima (Weinkove et al., 1998). Fenolna jedinjenja mogu biti direktno uključena u redoks procese, kao i u reakcije kompleksacije sa vanadijumom u oksidacionim stanjima V(V) i V(IV), čime doprinose smanjenju toksičnosti vanadata (Garau et al., 2015). Redoks reakcije su izraženije pri nižim pH vrednostima, kao što su one u vakuolama, a kod micelije *P. blakesleeanus*, hidroksibenzojeve kiseline se nalaze uparvo u njima (Weinkove et al., 1998). Pored toga, lokalizacija elemenata mikro-XRF tehnikom je pokazala da je pretežna intracelularna lokalizacija vanadijuma kod *P. blakesleeanus* najverovatnije takođe u vakuoli (Žižić et al., 2015).

Upoređivanjem koncentracije fenola u kontrolnim micelijama, najveći sadržaj fenolnih jedinjenja je zabeležen u micelijumu u eksponencijalnoj fazi, dok je znatno manja koncentracija fenola uočena u starijim micelijama (36 h i 56 h). Ovaj rezultat se razlikuje od rezultata de Kastra i saradnika koji su u svojoj studiji pokazali da micelijum u stacionarnoj fazi razvoja ima najveću antioksidativnu aktivnost i da sadrži najviše polifenola (De Castro et al., 2013). Razlike u rezultatima se mogu objasniti različitim uslovima rasta, pre svega prisustvu ili odsustvu svetlosti, koja ima značajan uticaj na akumulaciju galne i protokatehinske kiseline (Barrero et al., 1996). Značajne promene u koncentraciji fenola kao rezultat tretmana sa V(V) primećene su u 20 h starim micelijama, gde se koncentracija fenola smanjila nakon jednočasovnih tretmana, pri svim koncentracijama V(V), dok su tretmani od 5 h doveli do povećanja koncentracije fenola u micelijama tretiranim 1 mM i 5 mM V(V). Utvrđeno je da su određene stresne situacije kao što su temperaturni šok (Fink-Boots et al., 1999) tretmani sa parakvatom i H₂O₂ doveli do porasta sadržaja fenola u kulturama bazidomicetnih gljiva (Jaszek et al., 2006). Ako je porast fenolnih jedinjenja povezan sa povećanom aktivnošću enzima uključenih u njihov metabolizam, može se govoriti o *de novo* sintezi fenola pod stresom izazvanim teškim metalima (Michalak, 2006). Povećano izlaganje hibridne pšenice bakru (Jańczak-Pieniążek et al., 2022) kao i kukuruza aluminijumu (Kidd et al., 2001) je dovelo do povećane sinteze fenola. Ovo može biti rezultat stimulativnog usmeravanja ugljenikovih jedinjenja ka sekundarnim metaboličkim putevima, odnosno da usled stresa dolazi do njihove redistribucije i usmeravanja ka sintezi sekundarnih metabolita, među kojima značajno mesto zauzimaju fenolna jedinjenja (Lattanzio, 2013). U micelijama starosti 36 h, jedino značajno povećanje koncentracije fenola je uočeno kod micelije tretirane 5 mM V(V), dok kod micelije u stacionarnoj fazi razvoja nisu zabeležene značajnije promene.

Glutation je neproteinski tiol sa veoma niskim redoks potencijalom, koji učestvuje u očuvanju strukture mitohondrija, integritetu ćelijske membrane, kao i u procesima ćelijske diferencijacije i razvoja (Pócsi et al., 2004). Jedan je od značajnijih nenezimskih antioksidanasa koji ima ključnu ulogu u odgovoru gljiva na različite stresne uslove, a deluje antioksidativno jer zahvaljujući svojoj -SH grupi reaguje sa ROS i RNS. Glutation može da redukuje V(V) do V(IV) i na taj način da smanji njegovu toksičnost (Soares et al., 2007; Willsky et al., 1984), jer se V(IV) može helirati u vakuoli (Žižić et al., 2015).

Analizom koncentracija ukupnog glutathiona u netretiranim micelijama, uočeno je da je najveća koncentracija ovog antioksidansa bila prisutna u 20 h starim micelijama, dok je najmanji sadržaj zabeležen u micelijama starim 56 h. Uzimajući u obzir da su kod 56 h stare micelije ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka i koncentracija ukupnih fenola bile najmanje i da ju je karakterisao najveći sadržaj ROS u odsustvu tretmana (bazalni nivo) i najmanja produkcija ROS-a pod uticajem vanadijuma, ne čudi to što je i koncentracija ukupnog glutathiona bila najmanja (u poređenju sa 20 h i 36 h starim micelijama). Smanjenje antioksidativnog kapaciteta, kao i smanjen nivo GSH je zabeležen tokom starenja, odnosno u stacionarnim kulturama *S. cerevisiae* (Jakubowski et al., 2000). Međutim, iako je koncentracija glutathiona bila niža u ovoj fazi razvoja, najveće promene u koncentraciji ovog nenezimskog antioksidansa nakon tretmana V(V) u trajanju od 1 h su zabeležene upravo u micelijama starim 56 h. Nakon jednočasovnih tretmana svim koncentracijama V(V), došlo je do smanjenja koncentracije ukupnog glutathiona, što ukazuje na njegovu „potrošnju“, odnosno oksidaciju do GSSG i/ili vezivanje za proteine u cilju njihove zaštite. Kod 20 h starih micelija, smanjenje koncentracije ukupnog glutathiona je zabeleženo nakon 5 h tretmana, što se može objasniti time da je u ovim micelijama visoka koncentracija ROS, zadržana i nakon duže izloženosti V(V), dovela do uključivanja i glutathiona u antioksidativnu odbranu. Kod micelija u kasnoj eksponencijalnoj fazi razvoja petočasovni tretman V(V) nije izazvao značajne promene u koncentraciji ovog antioksidansa.

Enzimski antioksidativni sistemi odlikuju se visokom specifičnošću prema ROS-u, raznovrsnom intracelularnom lokalizacijom, kao i prisustvom metala i metaloida, kao što su bakar, cink, mangan, gvožđe i selen u aktivnim centrima (Gessler et al., 2007). Među najvažnijim antioksidativnim enzimima filamentoznih gljiva, koji ujedno mogu biti i prva linija odbrane su CAT, SOD i POD, kao i GPx i GR (Bai et al., 2003), dok GST, koji učestvuje u uklanjanju ksenobiotika i toksičnih metabolita, može takođe imati značajnu ulogu u antioksidativnoj odbrani redukujući perokside (Prohaska & Ganther, 1977). Uloga enzima u antioksidativnoj zaštiti je ključna za normalno funkcionisanje ćelija.

U tretiranim micelijama nisu primećene značajnije promene u aktivnostima CAT i SOD kao rezultat izlaganja V(V), ali zanimljivo je da je u micelijumu stacionarne faze uočena dodatna izoforma Mn SOD, na čiju aktivnost V(V) takođe nije uticao. De Kastro i saradnici su u svojoj studiji pokazali da tretmani sa 50 mM H₂O₂ nisu doveli do promene aktivnosti SOD, dok su tretmani sa većom koncentracijom H₂O₂ (200 mM) smanjili aktivnosti SOD do nemerljivosti (De Castro et al., 2013). Pošto gubitak aktivnosti CAT u ćelijama kvasca nije imao uticaja na osetljivost prema H₂O₂ (Grant et al., 1998; Izawa et al., 1996), može se zaključiti da drugi enzimi poput peroksidaza mogu imati primarnu ulogu u uklanjanju H₂O₂ (Zadrag-Tecza et al., 2018) kod *P. blakesleeanus*. Manazu i saradnici su utvrdili da CAT nije neophodna za toleranciju *Hansenula polymorpha* prema vanadatu, odnosno rast mutanta sa nedostatkom katalaze, MCT75, je bio neometan u medijumu koji je sadržao V(V). Osim toga poznato je da citohrom c peroksidaze ove vrste, imaju tri puta veći afinitet prema H₂O₂, nego CAT (Mannazzu, 2000).

Zabeležene promene u aktivnosti POD su bile blage i statistički značajna povećanja su uočena u micelijumu starom 56 h tretiranom 10 mM V(V) nakon 1 i 5 h, i u miceliji staroj 36 h tretiranoj 10 mM V(V) tokom 1 h, dok su značajnije promene bile zabeležene u aktivnosti GPx. GPx aktivnost se značajno povećavala sa produženom inkubacijom V(V) u micelijumu starom 20 h i 56 h. Slično je zabeleženo i sa aktivnošću GR, koja je bila blago, ali ne značajno povećana u micelijama starosti 20 h, dok je kod

micelija starosti 56 h, povećanje bilo izraženije. Zbog velikih razlika između eksperimentalnih serija, samu aktivnost GST je teško protumačiti, odnosno govoriti o efektu V(V) na aktivnost ovog enzima. Tamas i saradnici su uočili da oksidativni stres, izazvan H_2O_2 u *P. chrysogenum* nije doveo do značajnih promena GST aktivnosti. (Emri et al., 1997).

Analizom dobijenih rezultata može se zaključiti da odgovor micelijuma gljive *P. blakesleeanus* na V(V) u velikoj meri zavisi od faze razvića u kojoj se organizam nalazi. Na slici 5.1. su prikazane realne starosti micelija, nakon tretmana, kao i efekti izlaganja micelija rastućim koncentracijama V(V) (sumirani u tabeli). Uočeno je da je i kraće (1 h) i duže (5 h) izlaganje 10 mM V(V) tokom eksponencijalne faze razvoja, kada je rast intenzivan, dovelo do povećane produkcije ROS-a i to oko četiri puta u odnosu na kontrolne micelije. Ipak, nisu zabeležene značajnije promene u aktivnosti antioksidativnih enzima. Ovakav rezultat se može objasniti visokim antioksidativnim potencijalom mlađih micelija, što potvrđuje i visoka koncentracija ukupnih fenola i glutaciona, koji su verovatno delovali kao prva linija neenzimske zaštite. Tek kasnije, nakon dužeg izlaganja V(V) je zabeležen porast aktivnosti enzima GPx i GR, što je moguće povezati sa padom koncentracije GSH, usled njegove oksidacije. Slične rezultate su dobili i De Kastro i saradnici, koji su pokazali da micelijum *P. blakesleeanus* u eksponencijalnoj fazi rasta pokazuje izraženu otpornost na oksidativni stres izazvan visokim koncentracijama H_2O_2 (De Castro et al., 2013).

U stacionarnoj fazi rasta, zabeležen je najveći sadržaj ROS-a u netretiranim micelijama, u poređenju sa micelijama starim 20 h i 36 h (nakon tretmana od 1 h i 5 h). Međutim, kada se ovaj sadržaj uporedi između različitih tretmana i kontrolnih micelija, povećanje nije bilo značajno izraženo. Ipak, smanjena koncentracija ukupnog glutaciona, uz povećanu aktivnost GPx i GR, koja redukuje GSSG, jasno ukazuje na njihovu ulogu u uklanjanju ROS tokom ove razvojne faze. Do sličnih zaključaka došli su i De Kastro i saradnici, koji su takođe uočili povećanu aktivnost GPx i GR, kao i smanjenje nivoa glutaciona u stacionarnoj fazi nakon tretmana H_2O_2 (De Castro et al., 2013). Takođe, oni su došli do zaključka da je micelija *P. blakesleeanus* u stacionarnoj fazi bila otpornija na H_2O_2 nego micelija u eksponencijalnoj fazi razvoja, u kojoj su uočeni izraženiji efekti H_2O_2 na rast, što se poklapa i sa rezultatima ove teze, u kojima V(V) nije imao uticaj na stopu rasta, odnosno vijabilnost micelije.

Samo tokom kasne eksponencijalne/rane stacionarne faze zabeležen je blagi inhibitorni efekat V(V) na stopu rasta micelijuma. Produkcija ROS je bila niža u poređenju sa eksponencijalnom fazom (nakon 1 h i 5 h tretmana) i najveći sadržaj ROS je zabeležen u miceliji tretiranoj 5 mM V(V) nakon jednočasovnog tretmana. Aktivnosti POD su bile blago povećane i jedino statistički značajno povećanje je uočeno kod micelije tretirane 10 mM V(V) nakon 1 h, što ukazuje na mogućnost da su POD u ovoj razvojnoj fazi imale važniju ulogu u eliminaciji H_2O_2 u odnosu na GPx, čije aktivnosti nisu bile izražene. Jedine značajnije promene su uočene upravo u miceliji tretiranoj 10 mM V(V), nakon 1 h tretmana gde je zabeleženo i smanjenje aktivnosti GR, kao i smanjenje ukupnog glutaciona.

Pošto promene u antioksidativnom sistemu (i enzimskoj i neenzimskoj komponenti), nakon 1 h i 5 h tretmana nisu bile jasno izražene te se njima ne može objasniti sposobnost micelije da neometano raste uprkos prisustvu vanadata, mehanizam adaptacije bi mogao biti povezan sa redukcijom i internalizacijom V(V), slično kao kod *G. lucidum*, gde akumulacija Se i istovremeno izbegavanje toksičnosti selenita prvenstveno zavisi od ekspresije transportera sa različitim kinetičkim svojstvima (M. Xu et al., 2024).

Iako V(V) nije značajno uticao na aktivnost antioksidativnih enzima i koncentraciju neenzimskih antioksidanasa kod micelije stare 36 h, njegov uticaj na vijabilnost i povećanu produkciju ROS nakon 24 h tretmana ukazuju na to da je upravo ova razvojna faza bila najosetljivija na njegovo delovanje.

P. blakesleeanus je potencijalni bioakumulator vanadijuma

Osim visoke tolerancije prema vanadatu, mnoge gljive imaju sposobnost da ga apsorbiraju iz podloge i akumuliraju, što ih čini potencijalnim kandidatima za bioakumulaciju i bioremedijaciju (Y.-H. Xu et al., 2019). U svojim studijama, Han i saradnici su pokazali da *Coprinus comatus* dobro raste u prisustvu 0,4% vanadata i akumulira ~3,5 mg vanadata po g biomase micelijuma (Han et al., 2009), dok su Hadžibrahimović i saradnici pokazali da *P. blakesleeanus* ima potencijal za bioakumulaciju vanadata (Hadžibrahimović et al., 2017). Ovo je jasno potvrđeno i rezultatima prikazanim u ovoj tezi. Naime, prilikom određivanja sadržaja vanadijuma u micelijumu, utvrđeno je da je tokom eksponencijalne faze rasta, sadržaj vanadijuma dostizao gotovo 1% suve mase micelijuma – tačnije 0,8% u srednjoj i 0,7% u kasnoj eksponencijalnoj fazi, nakon tretmana 10 mM V(V). Usvajanje vanadata bilo je koncentraciono zavisno, što ukazuje da je najveće usvajanje zabeleženo nakon tretmana najvišim primenjenim koncentracijama. U stacionarnoj fazi razvika, zabeleženo je znatno niže usvajanje i sadržaj V je iznosio 0,1% suve mase micelijuma. Ovo se može objasniti time da je u stacionarnoj fazi gljiva metabolički znatno manje aktivna. Osim vanadijuma, praćeno je i usvajanje fosfora i rezultati su pokazali da je vanadat stimulirao usvajanje fosfora, tokom srednje i kasne faze eksponencijalnog rasta, pogotovo nakon tretmana višim koncentracijama vanadata (5 mM i 10 mM). U supernatantu odgovarajućih uzoraka nije pronađen fosfor. Ovo može delovati kontradiktorno, s obzirom na pretpostavku da zbog svoje strukturne sličnosti sa fosfatom, vanadat deluje kao njegov kompetitor, ali takođe je u kompeticiji i sa drugim metalnim jonima (Rehder, 1992). Međutim, nekoliko studija je pokazalo da biljke usvajaju više fosfora kako koncentracija vanadata raste (Aihemaiti et al., 2019; García-Jiménez et al., 2018; Imtiaz et al., 2017). U ranijim ³¹P NMR eksperimentima Žižića i saradnika (Žižić et al., 2014), primećena je preraspodela signala fosfata u korist polifosfata i fosforilisanih šećera, a na štetu ortofosfata u citoplazmi. Kako su ovi eksperimenti izvedeni u medijumu bez fosfata, da bi se izbegla pojava signala fosfata iz medijuma, jasno je da je u prisustvu vanadata došlo do *de novo* sinteze polifosfata od prisutnih ortofosfata u citoplazmi. Sličan efekat vanadata je primećen u ćelijama kvasca *H. polymorpha* (Mannazzu et al. 1997). Polifosfati vezuju jone vanadila V(IV) nastalog redukcijom V(V), time smanjujući njihovu toksičnost. Sve ovo dovodi do zaključka da koncentracija ortofosfata u citoplazmi postaje premala za održavanje osnovnih ćelijskih funkcija zbog čega dolazi do usvajanja ortofosfata iz okolnog medijuma.

Pošto *P. blakesleeanus* nije gljiva koja prirodno raste u zemljištu, ne može se smatrati potencijalnim bioremedijatorom. Ipak, dobijeni rezultati ukazuju na njen značajan potencijal za usvajanje vanadata, što je čini pogodnim bioakumulatorom ovog metala.

Sadržaj lipida, proteina i ugljenih hidrata u micelijumu P. blakesleeanus se menja sa starošću, ali i sa V(V) tretmanom

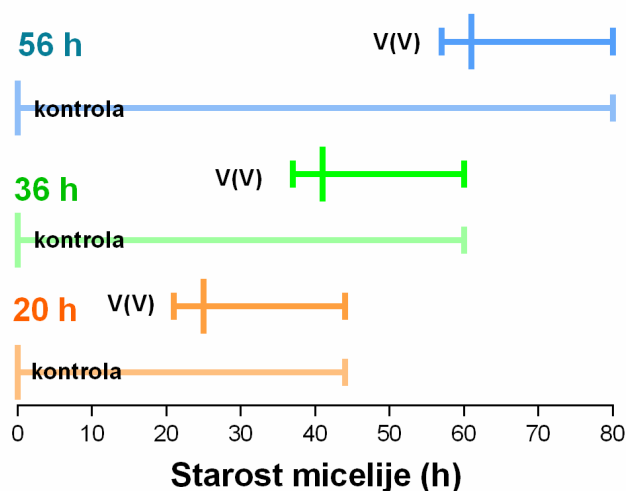
P. blakesleeanus pripada razdelu Mucoromycota, u okviru koga se nalaze brojne vrste koje imaju sposobnost da proizvode velike količine lipida, kao i drugih značajnih metabolita kao što su pigmenti, polifosfati i hitozan (Ferreira et al., 2013). Kada se gaji u minimalnom medijumu, sadržaj lipida u *P. blakesleeanus* može iznositi i do 41% suve mase micelije pri gajenju na neutralnoj pH jer je u ovim uslovima povećana konverzija ugljenih hidrata u lipide (Cerdá-Olmeda & Avalos, 1994). Lipidni sastav micelije zavisi od soja i uslova u kojima raste, pri čemu su dominantni trigliceridi i fosfolipidi, dok je znatno manji udeo sterola, estara sterola, masnih kiselina, kao i monoglicerida i diglicerida (Cerdá-Olmedo E., 1987). Najzastupljenije masne kiseline *P. blakesleeanus* su oleinska, linolna, linolenska, stearinska i palmitinska (Chenouda, 1970). Njihov sadržaj, kao i sadržaj ostalih lipida se menjaju u zavisnosti od faze razvoja gljive. Trigliceridi predstavljaju značajan izvor energije u uslovima gladovanja. Poznato je da nedostatak azota, koji je neizbežan prilikom starenja kultura, može dovesti do povećane sinteze lipida, što je zapaženo i kod micelije gljive *P. blakesleeanus*, u kojoj je uočen povećan broj lipidnih kapi kao odgovor na nedostatak azota (Pajić et al., 2022).

U proučavanju biohemijskih komponenti gljiva, uključujući lipide, ugljene hidrate, proteine i druge značajne metabolite se može koristiti FTIR spektroskopija, kao brza i pouzdana tehnika. Nie i saradnici su ovom tehnikom ispitivali sadržaj proteina i ugljenih hidrata u sporama i micelijama pet različitih vrsta roda *Fusarium*, uzgajanih u različitim uslovima (Nie et al., 2007), dok su Dzurendova i saradnici analizirali lipidni sastav kod devet različitih vrsta filamentoznih gljiva (Dzurendova, Zimmermann, Kohler, et al., 2020). Značaj FTIR spektroskopije ogleda se upravo u njenoj sposobnosti da brzo i precizno pruži informacije o „metaboličkom otisku“ micelije, kao i o promenama koje nastaju kao odgovor na različite ekološke i tehnološke uslove gajenja.

S obzirom na to da su gljive prepoznate kao značajni izvori ω -3 i ω -6 polinezasićenih masnih kiselina (Ochsenreither et al., 2016), lipida, karotenoida, pigmenata i drugih bioaktivnih jedinjenja (Diamantopoulou et al., 2014; Pilafidis et al., 2024; Shapaval et al., 2023) sa potencijalnom primenom u farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama, FTIR spektroskopija se nameće kao pouzdana i efikasna analitička tehnika sa širokom primenom u biotehnološkim istraživanjima različitih vrsta gljiva (Dzurendova, Zimmermann, Kohler, et al., 2020).

Korišćenjem FTIR analize micelije *P. blakesleeanus* uočene su promene u relativnom sadržaju gradivnih biomolekula tokom različitih faza razvića i nakon tretmana vanadatom. Analiza micelije je pokazala da sa starenjem dolazi do značajnog povećanja relativnog sadržaja lipida, kao i ugljenih hidrata u micelijumu gljive (SI 4.9.1). Povećan odnos lipidi /amid I i lipidi/ugljeni hidrati, u starijim kulturama može ukazivati i na bržu potrošnju azota, nego ugljenih hidrata koji su neophodni za sintezu masnih kiselina (X.-Y. Zhang et al., 2022). Kod tretmana sa vanadatom (SI 4.9.2) uočen je blagi pad u relativnom sadržaju ugljenih hidrata, dok je udeo lipida u odnosu na proteine i ugljene hidrate bio povećan. U micelijama starim 20 h u trenutku tretmana, uočen je porast udela lipida u odnosu na proteine i ugljene hidrate nakon 24 h tretmana, dok je kod micelija starih 36 h bilo dovoljno 5 h tretmana da do ove promene dođe. U micelijama starim 56 h na početku tretmana nisu zabeležene značajne promene, moguće zbog niske stope usvajanja V(V) u ovoj fazi rasta kao i opšte niske metaboličke aktivnosti. PCA analiza je pokazala da je glavni faktor promene udela biomolekula u biomasi starost micelije, ali da i tretman vanadatom ima jasan uticaj (SI 4.9.3).

Imajući u vidu da sadržaj lipida u miceliji *P. blakesleeanus* može biti veliki, da je njen uzgoj jednostavan, i da izlaganjem određenom stresoru (kao u ovom slučaju vanadatu) može dovesti do povećanje produkcije lipida, pomenuta gljiva se može potencijalno razmatrati kao kandidat za biotehnološku proizvodnju lipida. Ispitivanje lipidnog sastava i njegove promene sa starošću, kao i sa različitim tretmanima može pokazati da li su lipidi iz ove gljive pogodni za proizvodnju biodizela ili više odgovaraju nutritivnim uljima.



Tretmani V(V) (1 mM, 5 mM i 10 mM)			
	1 h	5 h	24 h
POD	↑*, ↑	↑	
GPx	/	↑, ↑	
GR	↓*	↑, ↑	
Glutation	↓*, ↓	↓	
Fenoli	↓, ↓	↑	
Vijabilnost	/	+	
ABTS esej	↓, ↓, ↓	↓*	
Produkcija ROS-a	↑	↑	↑, ↑, ↑
Usvajanje *	/	/	0,8%, 0,7%, 0,1%
Uticaj V(V) na sadržaj lipida	/	↑	↑, ↑
Uticaj V(V) na sadržaj ugljenih hidrata	/	↓	↓, ↓

Šema 5.1. Realne starosti micelije (h) nakon tretmana V(V). Prikazane su kontrole i odgovarajući tretmani (vertikalne linije obeležavaju dužinu tretmana - 1 h, 5 h i 24 h). U tabeli su sumirani efekti rastućih koncentracija V(V) na enzimске aktivnosti, koncentraciju neenzimskih antioksidanasa, vijabilnost, produkciju ROS-a i sadržaj lipida i ugljenih hidrata, nakon odgovarajućih tretmana. Strelicama je prikazano da li dolazi do pada ili porasta aktivnosti/koncentracije/sadržaja (broj strelica ne govori o intenzitetu promene, već da ona postoji); Za usvajanje V(V) su prikazane vrednosti sadržaja vanadijuma, izražene u % suve mase micelije nakon izlaganja 10 mM V(V). Boje u tabeli, odgovaraju odgovarajućim starostima micelije sa grafika.

Kod zelenih strelica, * se odnosi na micelijum tretiran 10 mM V(V), jer su jedino kod njega uočene promene.

6. Zaključci

- Uslovi gajenja micelijuma gljive *P. blakesleeanus* utiču na morfologiju, biomasu i ekspresiju antioksidativnih enzima. Prilikom gajenja micelijuma u petri kutijama konačna biomasa je manja, nakon 30 h razvića dolazi do vidljivog razvoja sporangiofora, aktivnost CAT i POD je najveća u mlađim stadijumima, dok aktivnost SOD nakon početnog pada ponovo raste sa pojavom sporangiofora. Sa primenom centrifugalne sile, odnosno prilikom gajenja na šejkeru, inhibira se razviće sporangiofora, biomasa se duplira, aktivnosti CAT i POD nakon početnog pada rastu u kasnoj ekspanencijskoj fazi, dok aktivnost SOD naglo raste u stacionarnoj fazi.
- Povećanje pH medijuma sa standardnih 4,5 na 6,7 ne utiče na prinos biomase.
- Vanadat u primenjenim koncentracijama i trajanju ima blagi inhibicioni efekat samo na micelijum u kasnoj ekspanencijskoj/ranoj stacionarnoj fazi
- Vanadat u primenjenim koncentracijama ima brz negativni efekat na antioksidativni kapacitet micelijuma (1 h), dok sa blago produženim izlaganjem od 5 h dolazi do adaptacije. Kod 20 h starog micelijuma, značajan porast ROS (4,63 puta) je zabeležen već nakon 30 min izlaganja 10 mM V(V), dok je kod ostalih vremenskih tačaka i koncentracija ovaj porast manji. Sa druge strane, 24 h izlaganje V(V) je dovelo do većeg porasta ROS kod micelija starih 36 i 56 h nego kod micelije stare 20 h, što ukazuje na najveće antioksidativne kapacitete micelije u ekspanencijskoj fazi.
- Iako je rana produkcija ROS u ekspanencijskoj fazi najviša, antioksidativni kapacitet micelijuma je očuvan najverovatnije zahvaljujući visokim koncentracijama neenzimskih antioksidanata poput GSH i fenola.
- U stacionarnoj fazi, osnovnu antioksidativnu ulogu nose GSH i peroksidaze, i to POD i GPx.
- Kasna ekspanencijska/rana stacionarna faza rasta se pokazala kao najosetljivija na efekte vanadata. Redukujući kapacitet micelije je ovde ostao umanjen i nakon 5 h tretmana i to je jedina faza na čiju vijabilnost je V(V) imao inhibicioni efekat. Značajno smanjenje aktivnosti GR je uticalo na oporavak redoks potencijala jer je time bilo sprečeno recikliranje GSH sistema.
- Micelijum gljive *P. blakesleeanus* usvaja V koncentraciono zavisno, a u ekspanencijskoj i kasnoj ekspanencijskoj/ranoj stacionarnoj fazi rasta udeo V u biomasu se približava 1% nakon 24 h inkubacije, što kandiduje ovu gljivu za upotrebu u bioakumulaciji vanadijuma.
- Usvajanje V iz medijuma dovodi do povećanog usvajanja fosfata. Povećan zahtev za fosforom i posledično intenzivnije usvajanje fosfata se najverovatnije javlja zato što polifosfati imaju ulogu helatora u citoplazmi i vakuolama, čime smanjuju toksične efekte V.
- Udeo lipida u micelijumu u odnosu na proteine raste sa starenjem i do 12 puta, dok udeo ugljenih hidrata u odnosu na proteine raste do 1,4 puta.

- Tretman vanadatom dodatno povećava udeo lipida u biomasi u odnosu na proteine. Kod micelijuma u kasnoj eksponencijalnoj/ranoj stacionarnoj fazi do ove promene dolazi već nakon 5 h tretmana sa svim primenjenim koncentracijama, dok je kod micelijuma u eksponencijalnoj fazi potrebno malo više vremena, i do povećanja udela lipida dolazi nakon 24 h tretmana. Udeo ugljenih hidrata u odnosu na proteine blago opada. Kod micelijuma u stacionarnoj fazi nema promena u udelima gradivnih biomolekula u biomasi sa primenom V(V).
- Glavni faktor u povećanju udela lipida u biomasi je starenje micelijuma, ali i tretman vanadatom ima jasan uticaj.
- Analiza lipidnog sastava može ukazati na potencijalnu upotrebnu vrednost *P. blakesleeanus* u proizvodnji biodizela ili nutritivnih ulja.

7. Literatura

- Abdelshafy, A. M., Belwal, T., Liang, Z., Wang, L., Li, D., Luo, Z., & Li, L. (2022). A comprehensive review on phenolic compounds from edible mushrooms: Occurrence, biological activity, application and future prospective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6204–6224. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1898335>
- Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D., & Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. In *Trends in Microbiology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 111–118). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.007>
- Aihemaiti, A., Jiang, J., Gao, Y., Meng, Y., Zou, Q., Yang, M., Xu, Y., Han, S., Yan, W., & Tuerhong, T. (2019). The effect of vanadium on essential element uptake of *Setaria viridis*’ seedlings. *Journal of Environmental Management*, 237, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.054>
- Akpınar-Bayizit, A. (2014). Fungal Lipids: The Biochemistry of Lipid Accumulation. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 5(5), 409–414. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.419>
- Al-Kelani, M., & Buthelezi, N. (2024). Advancements in medical research: Exploring Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy for tissue, cell, and hair sample analysis. *Skin Research and Technology*, 30(6), 1–13. <https://doi.org/10.1111/srt.13733>
- Alkan, S., Uysal, A., Kasik, G., Vlasisavljevic, S., Berežni, S., & Zengin, G. (2020). Chemical Characterization, Antioxidant, Enzyme Inhibition and Antimutagenic Properties of Eight Mushroom Species: A Comparative Study. *Journal of Fungi*, 6(3), 166. <https://doi.org/10.3390/jof6030166>
- Allen, R. G., Newton, R. K., Sohal, R. S., Shipley, G. L., & Nations, C. (1985). Alterations in superoxide dismutase, glutathione, and peroxides in the plasmodial slime mold *Physarum polycephalum* during differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 125(3), 413–419. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041250308>
- Andersson, I., Gorzsás, A., Kerezsi, C., Tóth, I., & Pettersson, L. (2005). Speciation in the aqueous $H^+/H_2VO_4^-/H_2O_2/phosphate$ system. *Dalton Transactions*, 22, 3658–3666. <https://doi.org/10.1039/b508273k>
- Asada, H., Paszkowiak, J., Teso, D., Alvi, K., Thorisson, A., Frattini, J. C., Kudo, F. A., Sumpio, B. E., & Dardik, A. (2005). Sustained orbital shear stress stimulates smooth muscle cell proliferation via the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 pathway. *Journal of Vascular Surgery*, 42(4), 772–780. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.05.046>
- Aureliano, M. (2016). Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities: V 10 or V 1 , Both or None? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016(1), 6103457. <https://doi.org/10.1155/2016/6103457>
- Aureliano, M., & Crans, D. C. (2009). Decavanadate (V10 O₂₈₆ -) and oxovanadates: Oxometalates with many biological activities. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), 536–546. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.11.010>
- Axelrod, J. D. (2001). Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signaling. *Genes & Development*, 15(10), 1182–1187. <https://doi.org/10.1101/gad.890501>

- Bai, Z., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 267–302). <https://doi.org/10.1080/07388550390449294>
- Baldrian, P. (2017). Microbial activity and the dynamics of ecosystem processes in forest soils. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 37, pp. 128–134). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.06.008>
- Baran, E. J. (2008). ChemInform Abstract: Vanadium Detoxification: Chemical and Biochemical Aspects. *ChemInform*, 39(45), 1475–1484. <https://doi.org/10.1002/chin.200845266>
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Vanadium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 265–278. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102425>
- Baroja-Mazo, A., Del Valle, P., Rúa, J., De Cima, S., Busto, F., De Arriaga, D., & Smirnov, N. (2005). Characterisation and biosynthesis of D-erythroascorbic acid in *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(5), 390–402. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.01.005>
- Baroja-Mazo, A., Valle, P. Del, Rúa, J., Busto, F., Cima, S. De, & Arriaga, D. De. (2004). A Transplasma Membrane Redox System in *Phycomyces blakesleeanus*: Properties of a Ferricyanide Reductase Activity Regulated by Iron Level and Vitamin K3. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(5), 481–492. <https://doi.org/10.1023/B:JOB.0000047330.65632.5d>
- Barrero, A. F., Oltra, J. E., & Poyatos, J. A. (1996). Acidic metabolites from *Phycomyces blakesleeanus*. *Phytochemistry*, 42(5), 1427–1433. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00146-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00146-X)
- Barwise, A. J. G. (1990). Role of Nickel and Vanadium in Petroleum Classification. *Energy and Fuels*, 4(6), 647–652. <https://doi.org/10.1021/ef00024a005>
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Bela, K., Riyazuddin, R., & Csiszár, J. (2022). Plant Glutathione Peroxidases: Non-Heme Peroxidases with Large Functional Flexibility as a Core Component of ROS-Processing Mechanisms and Signalling. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/antiox11081624>
- Belozerskaya, T. A., & Gessler, N. N. (2007). Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 506–515. <https://doi.org/10.1134/S0003683807050031>
- Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2013). Principles in redox signaling: From chemistry to functional significance. In *Antioxidants and Redox Signaling* (Vol. 18, Issue 13, pp. 1557–1593). <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4655>
- Bloomfield, G., & Pears, C. (2003). Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 16, pp. 3387–3397). <https://doi.org/10.1242/jcs.00649>
- Bode, H. P., Friebel, C., & Fuhrmann, G. F. (1990). Vanadium uptake by yeast cells. *BBA - Biomembranes*, 1022(2), 163–70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90110-A](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90110-A)
- Bothwell, J. H. F., & Griffin, J. L. (2011). An introduction to biological nuclear magnetic resonance spectroscopy. In *Biological Reviews* (Vol. 86, Issue 2, pp. 493–510). <https://doi.org/10.1111/j.1469->

- Bowman, B. J. (1983). Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system II. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 286–291. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.286-291.1983>
- Bowman, B. J., Allen, K. E., & Slayman, C. W. (1983). Vanadate-resistant mutants of *Neurospora crassa* are deficient in a high-affinity phosphate transport system. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 292–296. <https://doi.org/10.1128/jb.153.1.292-296.1983>
- Butler, A., & Eckert, H. (1989). Vanadium-51 NMR as a probe of vanadium(V) coordination to human apotransferrin. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8), 2802–2809. <https://doi.org/10.1021/ja00190a010>
- Calabrese, E. J. (2014). Hormesis: A fundamental concept in biology. *Microbial Cell*, 1(5), 145–149. <https://doi.org/10.15698/mic2014.05.145>
- Cardarelli, F. (2000). Less Common Nonferrous Metals. In *Materials Handbook* (pp. 75–244). Springer London. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-3648-4_3
- Catalán, R. E., Martínez, A. M., Aragonés, M. D., & Godoy, J. E. (1985). Activation of acetylcholinesterase by vanadate. *Neuropharmacology*, 24(11), 1119–1122. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(85\)90201-1](https://doi.org/10.1016/0028-3908(85)90201-1)
- Ceci, A., Maggi, O., Pinzari, F., & Persiani, A. M. (2012). Growth responses to and accumulation of vanadium in agricultural soil fungi. *Applied Soil Ecology*, 58, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.02.022>
- Ceci, A., Rhee, Y. J., Kierans, M., Hillier, S., Pendrowski, H., Gray, N., Persiani, A. M., & Gadd, G. M. (2015). Transformation of vanadinite [Pb₅(VO₄)₃Cl] by fungi. *Environmental Microbiology*, 17(6), 2018–34. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12612>
- Cerdá-Olmeda, E., & Avalos, J. (1994). Oleaginous fungi: carotene-rich from *Phycomyces*. *Progress in Lipid Research*, 33(1–2), 185–192. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0163-7827(94)90021-3)
- Cerdá-Olmedo, E. (2001). *Phycomyces* and the biology of light and color. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 25, Issue 5, pp. 503–512). [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(01\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00064-X)
- Cerdá-Olmedo E., and E. D. L. (1987). *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). [136] Assay of catalases and peroxidases. In *Methods in Enzymology* (pp. 764–775). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
- Chenouda, Mi. S. (1970). Investigation on lipid contents of *Phycomyces blakesleeanus*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 16(6), 501–509. https://doi.org/10.2323/jgam.16.6_501
- Cho, E. J., Oh, J. Y., Chang, H. Y., & Yun, J. W. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.013>
- Costa Pessoa, J., Garribba, E., Santos, M. F. A., & Santos-Silva, T. (2015). Vanadium and proteins: Uptake, transport, structure, activity and function. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vols. 301–302, pp. 49–86). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.03.016>
- Crans, D. C., Smee, J. J., Gaidamauskas, E., & Yang, L. (2004). The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chemical Reviews*,

- D’Cruz, O. J., Dong, Y., & Uckun, F. M. (1999). Spermicidal Activity of Oxovanadium(IV) Complexes of 1,10-Phenanthroline, 2,2'-Bipyridyl, 5'-Bromo-2'-Hydroxyacetophenone and Derivatives in Humans. *Biology of Reproduction*, 60(2), 435–444. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.435>
- Da Silva, J. A. L., Fraústo da Silva, J. J. R., & Pompeiro, A. J. L. (2013). Amavadin, a vanadium natural complex: Its role and applications. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 257, Issues 15–16, pp. 2388–2400). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.03.010>
- Dahl, J. U., Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Protein quality control under oxidative stress conditions. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 427, Issue 7, pp. 1549–1563). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.014>
- Dardik, A., Chen, L., Frattini, J., Asada, H., Aziz, F., Kudo, F. A., & Sumpio, B. E. (2005). Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery*, 41(5), 869–880. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2005.01.020>
- Das, B. K., Roy, A., Koschorreck, M., Mandal, S. M., Wendt-Potthoff, K., & Bhattacharya, J. (2009). Occurrence and role of algae and fungi in acid mine drainage environment with special reference to metals and sulfate immobilization. In *Water Research* (Vol. 43, Issue 4, pp. 883–894). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.046>
- Dawes, I. W. (2002). Stress responses. In *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae, 2nd Edition* (pp. 376–438). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9780203484135>
- De Castro, C., del Valle, P., Rúa, J., García-Armesto, M. R., Gutiérrez-Larraínzar, M., Busto, F., & de Arriaga, D. (2013). Antioxidant defence system during exponential and stationary growth phases of *Phycomyces blakesleeanus*: Response to oxidative stress by hydrogen peroxide. *Fungal Biology*, 117(4), 275–287. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.001>
- De Oliveira, F. K., Santos, L. O., & Buffon, J. G. (2021). Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. In *Food Research International* (Vol. 143). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>
- Dean, A. P., Sigee, D. C., Estrada, B., & Pittman, J. K. (2010). Using FTIR spectroscopy for rapid determination of lipid accumulation in response to nitrogen limitation in freshwater microalgae. *Bioresource Technology*, 101(12), 4499–4507. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.065>
- Del Río, L. A., Ortega, M. G., López, A. L., & Gorgé, J. L. (1977). A more sensitive modification of the catalase assay with the Clark oxygen electrode. Application to the kinetic study of the pea leaf enzyme. *Analytical Biochemistry*, 80(2), 409–415. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90662-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90662-5)
- Di Meo, S., Napolitano, G., & Venditti, P. (2019). Physiological and Pathological Role of ROS: Benefits and Limitations of Antioxidant Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4810. <https://doi.org/10.3390/ijms20194810>
- Diamantopoulou, P., Papanikolaou, S., Komaitis, M., Aggelis, G., & Philippoussis, A. (2014). Patterns of major metabolites biosynthesis by different mushroom fungi grown on glucose-based submerged cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(7), 1385–1400. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1112-2>
- Dinesh, R. (2021). The role of antioxidants and ROS scavenging machinery in wild mushrooms. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 245–251). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821005-5.00018-1>

- do Carmo Santos, M. L., Silva Santos, A., Pereira Silva de Novais, D., dos Santos Lopes, N., Pirovani, C. P., & Micheli, F. (2025). The family of glutathione peroxidase proteins and their role against biotic stress in plants: a systematic review. *Frontiers in Plant Science*, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1425880>
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016>
- Dragičević, D. (2017). Uticaj vanadijuma na aktivnost peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza u micelijumu gljive *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. *Master Rad, Univerzitet u Beogradu-Biološki Fakultet*.
- Drotar, A., Phelps, P., & Fall, R. (1985). Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*, 42(1), 35–40. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90025-1](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90025-1)
- Dzurendova, S., Zimmermann, B., Kohler, A., Tafintseva, V., Slany, O., Certik, M., & Shapaval, V. (2020). Microcultivation and FTIR spectroscopy-based screening revealed a nutrient-induced co-production of high-value metabolites in oleaginous Mucoromycota fungi. In *PLoS ONE* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234870>
- Dzurendova, S., Zimmermann, B., Tafintseva, V., Kohler, A., Horn, S. J., & Shapaval, V. (2020). Metal and phosphate ions show remarkable influence on the biomass production and lipid accumulation in oleaginous mucor circinelloides. *Journal of Fungi*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/jof6040260>
- Elzwai, J., & Ahmed, M. (2019). Fungal biomass production in mycological liquid medium by some ochratoxigenic fungi under static and shake culture conditions ochratoxigenic fungi under static and shake culture conditions . *Journal of Pure & Applied Sciences*, 7(1), 451–456.
- Emri, T., Pócsi, I., & Szentirmai, A. (1997). Glutathione metabolism and protection against oxidative stress caused by peroxides in *Penicillium chrysogenum*. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(5), 809–814. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00065-8)
- Fang, G. C., Hanau, R. M., & Vaillancourt, L. J. (2002). The SOD2 gene, encoding a manganese-type superoxide dismutase, is up-regulated during conidiogenesis in the plant-pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 36(2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00008-7)
- Faría de Rodríguez, C., Villalobos, H., & Nava de Leal, C. (1998). Teratogenic effects of ammonium metavanadate on the CNS of the offspring of albino rats. A histological and histochemical study. *Investigacion Clinica*, 39 Suppl 1, 55–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650461>
- Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., Edebo, L., & Taherzadeh, M. J. (2013). Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. *Bioresource Technology*, 135, 523–532. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.064>
- Fink-Boots, M., Malarczyk, E., & Leonowicz, A. (1999). Increased enzymatic activities and levels of superoxide anion and phenolic compounds in cultures of basidiomycetes after temperature stress. *Acta Biotechnologica*, 19(4), 319–330. <https://doi.org/10.1002/abio.370190407>
- Folkes, L. K., Candeias, L. P., & Wardman, P. (1995). Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1), 120–126. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.0017>

- Fomina, M. A., Alexander, I. J., Colpaert, J. V., & Gadd, G. M. (2005). Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 851–866. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.013>
- Fridovich, I. (1978). The Biology of Oxygen Radicals. *Science*, 201(4359), 875–880. <https://doi.org/10.1126/science.210504>
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 64, pp. 97–112). <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525>
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: A radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8), 1203–1209. <https://doi.org/10.1242/jeb.201.8.1203>
- Gadd, G. (1992). Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters*, 100(1–3), 197–203. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(92\)90209-7](https://doi.org/10.1016/0378-1097(92)90209-7)
- Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124(1), 25–60. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03796.x>
- Gallon, J. R. (1981). The oxygen sensitivity of nitrogenase: a problem for biochemists and microorganisms. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 6, Issue C, pp. 19–23). [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90008-6)
- Garau, G., Palma, A., Lauro, G. P., Mele, E., Senette, C., Manunza, B., & Deiana, S. (2015). Detoxification processes from vanadate at the root apoplasm activated by caffeic and polygalacturonic acids. *PLoS ONE*, 10(10), e0141041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141041>
- García-Jiménez, A., Trejo-Téllez, L. I., Guillén-Sánchez, D., & Gómez-Merino, F. C. (2018). Vanadium stimulates pepper plant growth and flowering, increases concentrations of amino acids, sugars and chlorophylls, and modifies nutrient concentrations. *PLOS ONE*, 13(8), e0201908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201908>
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2007). The pga1 gene of *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 encodes a heterotrimeric G protein alpha subunit that controls growth and development. *Research in Microbiology*, 158(5), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.03.001>
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., & Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), 1091–1109. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100070>
- Gessler, N. N., Rudchenko, M. N., & Belozerskaia, T. A. (2008). Stress factor-induced changes in the activity of antioxidant protective mechanisms in the wild type strain of *Neurospora crassa* and in its photoreceptor complex mutants. *Mikrobiologiya*, 77(2), 163–170.
- Gordon, J. A. (1991). [41] Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. In *Methods in Enzymology* (Vol. 201, Issue C, pp. 477–482). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)01043-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)01043-2)
- Gorzsás, A., Getty, K., Andersson, I., & Pettersson, L. (2004). Speciation in the aqueous H⁺/H₂VO₄⁻/H₂O₂/citrate system of biomedical interest. *Dalton Transactions*, 18, 2873–2882. <https://doi.org/10.1039/b409429h>
- Gostimskaya, I., & Grant, C. M. (2016). Yeast mitochondrial glutathione is an essential antioxidant with mitochondrial thioredoxin providing a back-up system. *Free Radical Biology and Medicine*, 94, 55–

65. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.015>

- Gralla, E. B., & Kosman, D. J. (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Advances in Genetics*, 30(C), 251–319. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60322-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60322-3)
- Grant, C. M., Perrone, G., & Dawes, I. W. (1998). Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 253(3), 893–898. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9864>
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Clijsters, H. (1999). Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 106(3), 262–267. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106302.x>
- Gutierrez-Larrainzar, M., De Castro, C., Del Valle, P., Rúa, J., García-Armesto, M. R., Busto, F., & De Arriaga, D. (2010). Production, stability, and antioxidative and antimicrobial activities of two l-ascorbate analogues from *Phycomyces blakesleeanus*: D-erythroascorbate and d-erythroascorbate glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10631–10638. <https://doi.org/10.1021/jf102202e>
- Gutjahr, C., Sawers, R. J. H., Marti, G., Andrés-Hernández, L., Yang, S. Y., Casieri, L., Angliker, H., Oakeley, E. J., Wolfender, J. L., Abreu-Goodger, C., & Paszkowski, U. (2015). Transcriptome diversity among rice root types during asymbiosis and interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(21), 6754–6759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504142112>
- Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–9.
- Hadžibrahimović, M., Sužnjević, D., Pastor, F., Cvetić Antić, T., Žižić, M., Zakrzewska, J., & Živić, M. (2017). The interactions of vanadate monomer with the mycelium of fungus *Phycomyces blakesleeanus*: reduction or uptake? *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0808-0>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1985). *Free radicals in biology and medicine* (Vol. 1, Issue 4). Oxford University Press Inc., New York. [https://doi.org/10.1016/0748-5514\(85\)90140-0](https://doi.org/10.1016/0748-5514(85)90140-0)
- Han, C., Cui, B., & Qu, J. (2009). Comparison of Vanadium-Rich Activity of Three Species Fungi of Basidiomycetes. *Biological Trace Element Research*, 127(3), 278–283. <https://doi.org/10.1007/s12011-008-8246-0>
- Hansberg, W., Salas-Lizana, R., & Domínguez, L. (2012). Fungal catalases: Function, phylogenetic origin and structure. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 525, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.014>
- Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabiscol, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1780, Issue 11, pp. 1217–1235). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>
- Hyde, K. D. (2022). The numbers of fungi. *Fungal Diversity*, 114(1), 1–1. <https://doi.org/10.1007/s13225-022-00507-y>
- Imlay, J. A. (2002). How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 46, pp. 111–153). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(02\)46003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(02)46003-1)

- Imtiaz, M., Rizwan, M. S., Mushtaq, M. A., Yousaf, B., Ashraf, M., Ali, M., Yousuf, A., Rizwan, M., Din, M., Dai, Z., Xiong, S., Mehmood, S., & Tu, S. (2017). Interactive effects of vanadium and phosphorus on their uptake, growth and heat shock proteins in chickpea genotypes under hydroponic conditions. *Environmental and Experimental Botany*, 134, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.11.003>
- Ito-Kuwa, S., Nakamura, K., Aoki, S., Osafune, T., Vidotto, V., & Pienthaweechai, K. (1999). Oxidative stress sensitivity and superoxide dismutase of a wild-type parent strain and a respiratory mutant of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, 37(5), 307–314. <https://doi.org/10.1046/j.1365-280X.1999.00224.x>
- Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: Analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 320(1), 61–67. <https://doi.org/10.1042/bj3200061>
- Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative Analysis of Reducing Sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). In *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology* (pp. 181–183). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43
- Jakubowski, W., Biliński, T., & Bartosz, G. (2000). Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(5), 659–664. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00266-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00266-X)
- Jańczak-Pieniążek, M., Cichoński, J., Michalik, P., & Chrzanowski, G. (2022). Effect of Heavy Metal Stress on Phenolic Compounds Accumulation in Winter Wheat Plants. *Molecules*, 28(1), 241. <https://doi.org/10.3390/molecules28010241>
- Jaszek, M., Grzywnowicz, K., Malarczyk, E., & Leonowicz, A. (2006). Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(3), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.002>
- K. Yadav, D., Lokhande, R. S., Pitale, S. M., Janwadkar, S. P., Navarkar, P. S., & Rana, P. K. (2014). Study of New Selective Reagent Acetophenone 2', 4'- Dihydroxy Semicarbazone for Extractive Spectrophotometric Determination of Vanadium. *World Journal of Analytical Chemistry*, 2(1), 10–14. <https://doi.org/10.12691/wjac-2-1-3>
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K. J. A., Dennery, P. A., Forman, H. J., Grisham, M. B., Mann, G. E., Moore, K., Roberts, L. J., & Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>
- Karlish, S. J. D., Beaugé, L. A., & Glynn, I. M. (1979). Vanadate inhibits (Na⁺ + K⁺)ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated form. *Nature*, 282(5736), 333–335. <https://doi.org/10.1038/282333a0>
- Kawasaki, L., & Aguirre, J. (2001). Multiple Catalase Genes Are Differentially Regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 183(4), 1434–1440. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1434-1440.2001>

- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunsé, B., & Barceló, J. (2001). The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1339–1352. <https://doi.org/10.1093/jxb/52.359.1339>
- Kim, Y., Nandakumar, M. P., & Marten, M. R. (2007). Proteomics of filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 25(9), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.07.008>
- Kioseoglou, E., Petanidis, S., Gabriel, C., & Salifoglou, A. (2015). The chemistry and biology of vanadium compounds in cancer therapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*, 301–302, 87–105. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.03.010>
- Knauert, S., & Knauer, K. (2008). The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. *Journal of Phycology*, 44(2), 311–319. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00471.x>
- Kobayashi, D., Kondo, K., Uehara, N., Otokozawa, S., Tsuji, N., Yagihashi, A., & Watanabe, N. (2002). Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3113–3117. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3113-3117.2002>
- Kosa, G., Zimmermann, B., Kohler, A., Ekeberg, D., Afseth, N. K., Mounier, J., & Shapaval, V. (2018). High-throughput screening of Mucoromycota fungi for production of low- and high-value lipids. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1070-7>
- Koua, D., Cerutti, L., Falquet, L., Sigrist, C. J. A., Theiler, G., Hulo, N., & Dunand, C. (2009). PeroxiBase: A database with new tools for peroxidase family classification. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkn680>
- Kowalski, S., Wyrzykowski, D., & Inkielewicz-Stępnik, I. (2020). Molecular and cellular mechanisms of cytotoxic activity of vanadium compounds against cancer cells. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 7, p. 1757). <https://doi.org/10.3390/molecules25071757>
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Niksic, M., Vrvic, M., & Van Griensven, L. (2015). Antioxidants of Edible Mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489–19525. <https://doi.org/10.3390/molecules201019489>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. *Frontiers in Microbiology*, 17(7), 2170. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>
- Kuzina, V., & Cerdá-Olmedo, E. (2007). Ubiquinone and carotene production in the Mucorales *Blakeslea* and *Phycomyces*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 991–999. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1069-7>
- Lamarre, C., LeMay, J.-D., Deslauriers, N., & Bourbonnais, Y. (2001). *Candida albicans* Expresses an Unusual Cytoplasmic Manganese-containing Superoxide Dismutase (SOD3 Gene Product) upon the Entry and during the Stationary Phase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 43784–43791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108095200>
- Lange, H., Taillandier, P., & Riba, J. (2001). Effect of high shear stress on microbial viability. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(5), 501–505. <https://doi.org/10.1002/jctb.401>
- Lattanzio, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction. In *Natural Products* (pp. 1543–1580). Springer

Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57

- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Fröhlich, K. U., & Breitenbach, M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1166–1173.
- Longo, V. D., Gralla, E. B., & Valentine, J. S. (1996). Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21), 12275–12280. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12275>
- M. Anke, H. Illing-Günther, U. S. (2005). Recent progress on essentiality of ultratrace element vanadium in nutrition of animal and man. *Biomed Res Trace Elements*, 16(3), 208–214. <https://doi.org/10.11299/brte.16.208>
- Ma, X., Deng, D., & Chen, W. (2017). Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In *Enzyme Inhibitors and Activators* (pp. 207–224). InTech. <https://doi.org/10.5772/65936>
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., & Ninnemann, H. (2001). Role of Nitric Oxide Synthase in the Light-Induced Development of Sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*. *Plant Physiology*, 126(3), 1323–1330. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1323>
- Malek, K., Wood, B. R., & Bambery, K. R. (2014). FTIR Imaging of Tissues: Techniques and Methods of Analysis. In *Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics* (Vol. 14, pp. 419–473). https://doi.org/10.1007/978-94-007-7832-0_15
- Mannazzu, I. (1997). Vanadium affects vacuolation and phosphate metabolism in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiology Letters*, 147(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00497-1)
- Mannazzu, I. (2000). Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1475(2), 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(00\)00062-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(00)00062-3)
- Mannazzu, I., Guerra, E., Strabbioli, R., Pediconi, D., & Fatichenti, F. (1998). The vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha* undergoes cellular reorganization during growth in, and recovery from, the presence of vanadate. *Microbiology*, 144(9), 2589–2597. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2589>
- Marcel Zamocky, C. O. (2010). Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. In *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7>
- Martínez-Cadena, G., Saavedra-Calixto, J., Messina-Valencia, G., Domínguez-Gutiérrez, G., & Novoa-Martínez, G. (1995). Effect of carbon source and pH of the growth medium on spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Archives of Microbiology*, 164(3), 231–234. <https://doi.org/10.1007/BF02529976>
- Matsumoto, S., Teshigawara, M., Tsuboi, S., & Ohmori, S. (1996). Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples Using Acrylonitrile as a Thiol-Blocking Reagent. *Analytical Sciences*, 12(1), 91–95. <https://doi.org/10.2116/analsci.12.91>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049–6055.
- Mendz, G. L., Hyslop, S. J., & Kuchel, P. W. (1990). Stimulation of human erythrocyte 2,3-

- bisphosphoglycerate phosphatase by vanadate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 276(1), 160–171. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90023-R)
- Michalak, A. (2006). Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. In *Polish J. of Environ. Stud* (Vol. 15, Issue 4).
- Michán, S., Lledías, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O., & Hansberg, W. (2002). Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 521–532. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00909-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00909-7)
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2004). Mushrooms. In *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203492086>
- Mir, A. A., Park, S.-Y., Sadat, M. A., Kim, S., Choi, J., Jeon, J., & Lee, Y.-H. (2015). Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 5(1), 11831. <https://doi.org/10.1038/srep11831>
- Missall, T. A., Cherry-Harris, J. F., & Lodge, J. K. (2005). Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates. *Microbiology*, 151(8). <https://doi.org/10.1099/mic.0.28132-0>
- Moore, D., Robson, G. D., & Trinci, A. P. J. (2020). *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108776387>
- Morgan, A. M., & El-Tawil, O. S. (2003). Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats. *Pharmacological Research*, 47(1), 75–85. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00241-4)
- Moskalyk, R. ., & Alfantazi, A. . (2003). Processing of vanadium: a review. *Minerals Engineering*, 16(9), 793–805. [https://doi.org/10.1016/S0892-6875\(03\)00213-9](https://doi.org/10.1016/S0892-6875(03)00213-9)
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & ur Rehman, D. I. (2008). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Mukherjee, B., Patra, B., Mahapatra, S., Banerjee, P., Tiwari, A., & Chatterjee, M. (2004). Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters*, 150(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.01.009>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>
- Narla, R. K., Dong, Y., D’Cruz, O. J., Navara, C., & Uckun, F. M. (2000). Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clinical Cancer Research*, 6(4), 1546–1556.
- Naumann, A. (2015). Fourier Transform Infrared (FTIR) Microscopy and Imaging of Fungi. In *Advanced Microscopy in Mycology* (Vol. 53, Issue 9). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22437-4>
- Nie, M., Luo, J., Xiao, M., Chen, J., Bao, K., Zhang, W., Chen, J., & Li, B. (2007). Structural differences between *Fusarium* strains investigated by FT-IR spectroscopy. *Biochemistry (Moscow)*, 72(1), 61–67. <https://doi.org/10.1134/S0006297907010075>
- Nikolić, M. (2014). Određivanje optimalnih uslova gajenja gljive *Phycomyces blakesleeanus* za izolaciju

- O'Neill, P. (1987). The Chemical Basis of Radiation Biology. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 52(6), 976–976. <https://doi.org/10.1080/09553008714552571>
- Ochsenreither, K., Glück, C., Stressler, T., Fischer, L., & Syltatk, C. (2016). Production Strategies and Applications of Microbial Single Cell Oils. *Frontiers in Microbiology*, 5(7), 1539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01539>
- Østergaard, H., Tachibana, C., & Winther, J. R. (2004). Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *The Journal of Cell Biology*, 166(3), 337–345. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402120>
- Pajić, T., Todorović, N. V., Živić, M., Nikolić, S. N., Rabasović, M. D., Clayton, A. H. A., & Krmpot, A. J. (2022). Label-free third harmonic generation imaging and quantification of lipid droplets in live filamentous fungi. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23502-4>
- Papagianni, M., Matthey, M., & Kristiansen, B. (1994). Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* PM 1. *Biotechnology Letters*, 16(9), 929–934. <https://doi.org/10.1007/BF00128627>
- Penninckx, M. (2002). An overview on glutathione in versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2(3), 295–305. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00081-8](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00081-8)
- Peraza, L., & Hansberg, W. (2002). *Neurospora crassa* Catalases, Singlet Oxygen and Cell Differentiation. *Biological Chemistry*, 383(3–4), 569–575. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.058>
- Pilafidis, S., Tsouko, E., Sougleri, G., Diamantopoulou, P., Gkatzionis, K., Ioannou, Z., & Sarris, D. (2024). Submerged cultivation of selected macro-fungi to produce mycelia rich in β -glucans and other bioactive compounds, valorizing side streams of the food industry. *Carbon Resources Conversion*, 7(2), 100198. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2023.09.002>
- Pócsi, I., Miskei, M., Karányi, Z., Emri, T., Ayoubi, P., Pusztahelyi, T., Balla, G., & Prade, R. A. (2005). Comparison of gene expression signatures of diamide, H₂O₂ and menadione exposed *Aspergillus nidulans* cultures – linking genome-wide transcriptional changes to cellular physiology. *BMC Genomics*, 6(1), 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-182>
- Pócsi, I., Prade, R. A., & Penninckx, M. J. (2004). Glutathione, Altruistic Metabolite in Fungi. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 49, pp. 1–76). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(04\)49001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(04)49001-8)
- Priya, B. K., Subrahmanyam, P., Kumar, J. D., & Chiranjeevi, P. (2006). Simple Sensitive Spectrophotometric Determination of Vanadium in Biological and Environmental Samples. *Journal of Chemistry*, 3(4), 286–297. <https://doi.org/10.1155/2006/731839>
- Prohaska, J. R., & Ganther, H. E. (1977). Glutathione peroxidase activity of glutathione-S-transferases purified from rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76(2), 437–445. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90744-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90744-6)
- Ransdell-Green, E. C., Baranowska-Kortylewicz, J., & Wang, D. (2025). Advances in Fluorescence Techniques for the Detection of Hydroxyl Radicals near DNA and Within Organelles and Membranes. *Antioxidants*, 14(1), 79. <https://doi.org/10.3390/antiox14010079>

- Rasoulnia, P., & Mousavi, S. M. (2016). V and Ni recovery from a vanadium-rich power plant residual ash using acid producing fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium simplicissimum*. *RSC Advances*, 6(11), 9139–9151. <https://doi.org/10.1039/C5RA24870A>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rehder, D. (1992). Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals*, 5(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/BF01079691>
- Rehder, D. (2008a). *Bioinorganic Vanadium Chemistry*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470994429>
- Rehder, D. (2008b). Is vanadium a more versatile target in the activity of primordial life forms than hitherto anticipated? *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6(6), 957–964. <https://doi.org/10.1039/b717565p>
- Rehder, D. (2013). The future of/for vanadium. *Dalton Transactions*, 42(33), 11749. <https://doi.org/10.1039/c3dt50457c>
- Rehder, D. (2015). The role of vanadium in biology. *Metallomics*, 7(5), 730–742. <https://doi.org/10.1039/C4MT00304G>
- Reid, T. J., Murthy, M. R. N., Sicignano, A., Tanaka, N., Musick, W. D., & Rossmann, M. G. (1981). Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(8), 4767–4771. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.4767>
- Riesz, P., Kondo, T., & Krishna, C. M. (1990). Sonochemistry of volatile and non-volatile solutes in aqueous solutions: e.p.r. and spin trapping studies. *Ultrasonics*, 28(5), 295–303. [https://doi.org/10.1016/0041-624X\(90\)90035-M](https://doi.org/10.1016/0041-624X(90)90035-M)
- Rivero, F., & Cerdá-Olmedo, E. (1994). Spore germination in *Phycomyces blakesleeanus*. *Mycologia*, 86(6), 781–786. <https://doi.org/10.1080/00275514.1994.12026484>
- Rondini, E. A., Walters, D. M., & Bauer, A. K. (2010). Vanadium pentoxide induces pulmonary inflammation and tumor promotion in a strain-dependent manner. *Particle and Fibre Toxicology*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-9>
- Rubin, M. B. (2001). The history of the ozone. The Schonbein period, 1839-1868. *Bulletin for the History of Chemistry*, 26(1), 40–56. <https://doi.org/10.70359/bhc2001v026p040>
- Rudnick, R. ., & Gao, S. (2003). Composition of the Continental Crust. In *Treatise on Geochemistry* (Vol. 4, pp. 1–64). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/03016-4>
- Sámi, L., Karaffa, L., Emri, T., & Pócsi, I. (2003). Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* under carbon starvation: respiration and glucose oxidase production. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 50(1), 67–76. <https://doi.org/10.1556/AMicr.50.2003.1.7>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 30, Issue 11, pp. 191–212). [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4)
- Schinagl, C. W., Vrabl, P., & Burgstaller, W. (2016). Adapting high-resolution respirometry to glucose-limited steady state mycelium of the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron*: Method development and standardisation. *PLoS ONE*, 11(1), 1–18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146878>

- Schlesinger, W. H., Klein, E. M., & Vengosh, A. (2017). Global biogeochemical cycle of vanadium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(52), E11092–E11100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715500114>
- Schwabe U, Puchstein C, Hannemann H, S. E. (1979). Activation of adenylate cyclase by vanadate. *Nature*, 277(5692), 143–145. <https://doi.org/10.1038/277143a0>
- Scior, T., Guevara-Garcia, A., Bernard, P., Do, Q.-T., Domeyer, D., & Laufer, S. (2005). Are Vanadium Compounds Drugable? Structures and Effects of Antidiabetic Vanadium Compounds: A Critical Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 5(11), 995–1008. <https://doi.org/10.2174/138955705774575264>
- Scior, T., Guevara-Garcia, J., Do, Q.-T., Bernard, P., & Laufer, S. (2016). Why Antidiabetic Vanadium Complexes are Not in the Pipeline of “Big Pharma” Drug Research? A Critical Review. *Current Medicinal Chemistry*, 23(25), 2874–2891. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160321121138>
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Marine Sciences*, 42(5), 556–564.
- Shapaval, V., Deniset-Besseau, A., Dubava, D., Dzurendova, S., Heitmann Solheim, J., & Kohler, A. (2023). Multiscale spectroscopic analysis of lipids in dimorphic and oleaginous *Mucor circinelloides* accommodate sustainable targeted lipid production. *Fungal Biology and Biotechnology*, 10(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s40694-023-00148-z>
- Shatzman, A. R., & Kosman, D. J. (1979). Biosynthesis and Cellular Distribution of the Two Superoxide Dismutases of *Dactylium dendroides*. *Journal of Bacteriology*, 137(1), 313–320. <https://doi.org/10.1128/jb.137.1.313-320.1979>
- Shi, K., Gao, Z., Shi, T.-Q., Song, P., Ren, L.-J., Huang, H., & Ji, X.-J. (2017). Reactive Oxygen Species-Mediated Cellular Stress Response and Lipid Accumulation in Oleaginous Microorganisms: The State of the Art and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8(1), 793. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00793>
- Siegel, H., Siegel, A. (1995). *Metal ions in biological systems* (vol. 31). Marcel Dekker.
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>
- Sigler, K., Chaloupka, J., Brozmanová, J., Stadler, N., & Höfer, M. (1999). Oxidative stress in microorganisms—I. Microbial vs. higher cells--damage and defenses in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44(6), 587–624. <https://doi.org/10.1007/BF02825650>
- Singh, B. N., Singh, A., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2011). *Trichoderma harzianum*- mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9792-4>
- Singh, J., Robert C., N., & Jorgenson, R. A. (1981). Vanadate: A potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 678(3), 477–482. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(81\)90129-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(81)90129-X)

- Singhal, S. S., Singh, S. P., Singhal, P., Horne, D., Singhal, J., & Awasthi, S. (2015). Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 289(3), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.10.006>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>
- Skoneczny, M. (2018). *Stress Response Mechanisms in Fungi* (M. Skoneczny (ed.)). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-00683-9>
- Smith, I. K., Vierheller, T. L., & Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry*, 175(2), 408–413. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(88\)90564-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90564-7)
- Soares, S. S., Gutiérrez-Merino, C., & Aureliano, M. (2007). Decavanadate induces mitochondrial membrane depolarization and inhibits oxygen consumption. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(5), 789–796. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.01.012>
- Soriano-Agueda, L. A., Ortega-Moo, C., Garza, J., Guevara-García, J. A., & Vargas, R. (2016). Formation of reactive oxygen species by vanadium complexes. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1077, 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2015.11.002>
- Sousa-Lopes, A., Antunes, F., Cyrne, L., & Marinho, H. S. (2004). Decreased cellular permeability to H₂O₂ protects *Saccharomyces cerevisiae* cells in stationary phase against oxidative stress. *FEBS Letters*, 578(1–2), 152–156. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.090>
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321–336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Sutter, R. P. (1975). Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(1), 127–130. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.1.127>
- Switala, J., & Loewen, P. C. (2002). Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 401(2). [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00049-8](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00049-8)
- Tang, J., Liu, L., Huang, X., Li, Y., Chen, Y., & Chen, J. (2010). Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos. *Canadian Journal of Microbiology*, 56(2), 121–127. <https://doi.org/10.1139/W09-110>
- Tian, L., Yang, J., Alewell, C., & Huang, J.-H. (2014). Speciation of vanadium in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) and soils in response to different levels of vanadium in soils and cabbage growth. *Chemosphere*, 111, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.051>
- Turton, H. E., Dawes, I. W., & Grant, C. M. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a yAP-1-mediated adaptive response to malondialdehyde. *Journal of Bacteriology*, 179(4), 1096–1101. <https://doi.org/10.1128/jb.179.4.1096-1101.1997>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Valverde, M. E., Hernández-Pérez, T., & Paredes-López, O. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1–14.

<https://doi.org/10.1155/2015/376387>

- Varjú, D., Edgar, L., & Delbrück, M. (1961). Interplay between the Reactions to Light and to Gravity in *Phycomyces*. *The Journal of General Physiology*, 45(1), 47–58. <https://doi.org/10.1085/jgp.45.1.47>
- Ventsislava Y Petrova 1, Diane Drescher, Anna V Kujumdzieva, M. J. S. (2004). Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochemical Journal*, 380(2), 393–400. <https://doi.org/10.1042/bj20040042>
- Volk, T. J. (2013). Fungi. In *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 624–640). Academic Press.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., & Moo-Young, M. (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, 23(2), 115–129. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.11.001>
- Weinkove, D., Poyatos, J. A., Greiner, H., Oltra, E., Avalos, J., Fukshansky, L., Barrero, A. F., & Cerdá-Olmedo, E. (1998). Mutants of *Phycomyces* with Decreased Gallic Acid Content. *Fungal Genetics and Biology*, 25(3), 196–203. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1998.1098>
- Whittaker, R. H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science*, 163(3863), 150–160. <https://doi.org/10.1126/science.163.3863.150>
- Willsky, G. R., White, D. A., & McCabe, B. C. (1984). Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21), 13273–13281. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90689-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90689-7)
- Wilschefski, S. C., & Baxter, M. R. (2019). Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>
- Wong, J., Lytle, F. W., Messmer, R. P., & Maylotte, D. H. (1984). K-edge absorption spectra of selected vanadium compounds. *Physical Review B*, 30(10), 5596–5610. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.30.5596>
- Woodbury, W., Spencer, A. K., & Stahmann, M. A. (1971). An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry*, 44(1), 301–305. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7)
- Xu, M., Meng, Q., Zhu, S., Yu, R., Chen, L., Shi, G., Wong, K.-H., Fan, D., & Ding, Z. (2024). The Performance and Evolutionary Mechanism of *Ganoderma lucidum* in Enhancing Selenite Tolerance and Bioaccumulation. *Journal of Fungi*, 10(6), 415. <https://doi.org/10.3390/jof10060415>
- Xu, Y.-H., Brandl, H., Osterwalder, S., Elzinga, E. J., & Huang, J.-H. (2019). Vanadium-basidiomycete fungi interaction and its impact on vanadium biogeochemistry. *Environment International*, 130, 104891. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.06.001>
- Yoshida, Y., & Hasunuma, K. (2004). Reactive Oxygen Species Affect Photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6986–6993. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310060200>
- Zadrag-Tecza, R., Maślanka, R., Bednarska, S., & Kwolek-Mirek, M. (2018). Response mechanisms to oxidative stress in yeast and filamentous fungi. In *Stress Response Mechanisms in Fungi: Theoretical and Practical Aspects* (pp. 1–34). https://doi.org/10.1007/978-3-030-00683-9_1

- Żądziński, R., Maszewski, J., & Bartosz, G. (1996). Transport of glutathione S-conjugates in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biology International*, 20(5), 325–330. <https://doi.org/10.1006/cbir.1996.0035>
- Zhang, X.-Y., Li, B., Huang, B.-C., Wang, F.-B., Zhang, Y.-Q., Zhao, S.-G., Li, M., Wang, H.-Y., Yu, X.-J., Liu, X.-Y., Jiang, J., & Wang, Z.-P. (2022). Production, Biosynthesis, and Commercial Applications of Fatty Acids From Oleaginous Fungi. *Frontiers in Nutrition*, 9(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.873657>
- Zhang, Z., Huang, C., Li, J., Leonard, S. S., Lanciotti, R., Butterworth, L., Shi, X., Zhang, Z., & Shi, X. (2001). Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 392(2), 311–320. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2464>
- Žižić, M., Dučić, T., Grolimund, D., Bajuk-Bogdanović, D., Nikolic, M., Stanić, M., Križak, S., & Zakrzewska, J. (2015). X-ray absorption near-edge structure micro-spectroscopy study of vanadium speciation in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(24), 7487–7496. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8916-7>
- Žižić, M., Miladinović, Z., Stanić, M., Hadžibrahimović, M., Živić, M., & Zakrzewska, J. (2016). 51V NMR investigation of cell-associated vanadate species in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Research in Microbiology*, 167(6), 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.04.012>
- Žižić, M., Stanić, M., Aquilanti, G., Bajuk-Bogdanović, D., Branković, G., Rodić, I., Živić, M., & Zakrzewska, J. (2022). Biotransformation of selenium in the mycelium of the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(20), 6213–6222. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04191-4>
- Žižić, M., Živić, M., Maksimović, V., Stanić, M., Križak, S., Antić, T. C., & Zakrzewska, J. (2014). Vanadate Influence on Metabolism of Sugar Phosphates in Fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *PLoS ONE*, 9(7), e102849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102849>
- Žižić, M., Živić, M., Spasojević, I., Bogdanović, J., Stanić, M., Cvetic-Antić, T., & Zakrzewska, J. (2013). The interactions of vanadium with *Phycomyces blakesleeanus* mycelium: enzymatic reduction, transport and metabolic effects. *Research in Microbiology*, 164(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.007>

Biografija autora

Jovana Lukičić rođena je 4. novembra 1991. godine u Smederevskoj Palanci, gde je završila osnovno i srednje obrazovanje. Godine 2010. je upisala Farmaceutski fakultet, smer – medicinska biohemija, Univerziteta u Beogradu. Diplomirala je 2015. godine, stekavši zvanje magistar farmacije – medicinski biohemičar. Iste godine upisala je multidisciplinarnu doktorsku studiju Univerziteta u Beogradu, studijski program Biofizika. Od 2016. godine zaposlena je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku, gde je angažovana u istraživačkom radu.

Tokom izrade doktorske disertacije, kandidatkinja se bavila proučavanjem efekta vanadata u micelijumu gljive *P. blakesleeanus*. U okviru eksperimentalnog rada primenjivala je različite savremene analitičke i fizičko-hemijske metode, uključujući NMR i FTIR spektroskopiju. Eksperimentalni deo istraživanja realizovan je na Institutu za multidisciplinarna istraživanja Univerziteta u Beogradu, na Odseku za nauku o živim sistemima, kao i na Institutu za botaniku i Botaničkoj bašti „Jevremovac“, na Katedri za fiziologiju biljaka, Biološkog fakulteta u Beogradu.

Tokom doktorskih studija učestvovala je u izvođenju dva master rada na Katedri za opštu fiziologiju i biofiziku. Rezultate svog rada predstavljala je na više nacionalnih i međunarodnih naučnih skupova, a iz istraživanja u okviru disertacije do sada su proistekle dve naučne publikacije u međunarodnim časopisima.

Jovana Lukičić je član Društva biofizičara Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора _____ Јована М. Лукичић

Број индекса 121/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај ванадата на ензимске и неензимске компоненте система антиоксидативне заштите
филаментозне гљиве *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff) [NRRL 1555(-)]

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Лукичић

Број индекса 121/2015

Студијски програм Биофизика

Наслов рада Утицај ванадата на ензимске и неензимске компоненте система антиоксидативне заштите филаментозне гљиве *Phycomyces blakesleeana* (Burgeff) [NRRL 1555(-)]

Ментори Др Марина Станић

Др Мирослав Живић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Утицај ванадата на ензимске и неензимске компоненте система антиоксидативне заштите филаментозне гљиве *Phycomyces blakesleeanus* (Burgeff) [NRRL 1555(-)] која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ③ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.