

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandar Z. Knežević

**LIGNINOLITIČKI POTENCIJAL I
MEDICINSKA SVOJSTVA EKSTRAKATA
VRSTA RODA *TRAMETES* FR.**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandar Z. Knežević

**LIGNINOLYTIC POTENTIAL AND
MEDICINAL PROPERTIES OF EXTRACTS
OF *TRAMETES* FR. SPECIES**

doctoral dissertation

Belgrade, 2015

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr Mirjana Stajić, vanredni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Jelena Vukojević, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Dr Ilija Brčeski, vanredni profesor, član komisije
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo doktorske disertacije urađen je na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu uz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, koje je finansiralo projekat „Karakterizacija i primena metabolita gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ br. 173032.

Srdačno se zahvaljujem mentorima prof. dr Mirjani Stajić i prof. dr Jeleni Vukojević na profesionalnom vođenju eksperimentalnog rada, konstruktivnim diskusijama i korisnim sugestijama prilikom pisanja teze.

Posebno se zahvaljujem prof. dr Iliji Brčeskom na korisnim savetima i nepresušnoj kreativnosti u nalaženju eksperimentalnih rešenja.

Zahvaljujem se dr Ladi Živković i dr Tatjani Stanojković koje su stručno i eksperimentalno pomogle ovo istraživanje kao i dr Vladimiru Jovanoviću na statističkoj obradi rezultata.

Zahvalnost dugujem i mojim kolegama dr Ivanu Milovanoviću i dr Jasmini Čilerdžić koji su u odsudnim trenucima eksperimentalnog rada pružili bezrezervnu pomoć i bili nezamenljiva podrška i ohrabrenje.

Takođe se zahvaljujem svim kolegama sa Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji su pomogli u izradi disertacije.

Beskrajnu zahvalnost dugujem svojoj porodici koja je kroz zahtevan period doktorskih studija i izrade teze bila uz mene.

Autor

REZIME

Rod *Trametes* Fr. obuhvata vrste širokog rasprostranjenja sa dobro razvijenim ligninolitičkim enzimskim sistemom i značajnim kapacitetom u sintezi raznovrsnih biološki aktivnih jedinjenja, zbog čega sve više nalaze primenu u mnogobrojnim biotehnološkim procesima.

Ciljevi ovog istraživanja bili su optimizacija uslova kultivacije za produkciju ligninolitičkih enzima i degradaciju odabranog biljnog otpada sa *T. gibbosa*, praćenje varijabilnosti u kapacitetu lignocelulolize unutar roda *Trametes* kao i određivanje antifungalnog, antioksidativnog, genoprotektivnog, citotoksičnog i anti-neurodegenerativnog efekta ekstrakata plodonosnih tela i micelije.

Pšenična slama je bila bolji izvor ugljenika nego piljevina bukve za produkciju Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *T. gibbosa* koji je maksimalni stepen delignifikacije (48,3%) postigao nakon 19 dana čvrste fermentacije u prisustvu 10,0 mM azota u formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i 10% pšeničnih mekinja kao dodatnog izvora azota. Prisustvo Fe^{2+} i Zn^{2+} u koncentraciji od 0,5 mM, kao i 0,1 mM *p*-anizidina i 0,5% veratril alkohola je značajno stimulisalo ligninolizu.

Značajna inter- i intra-specijska varijabilnost u sintezi proučavanih enzima, degradaciji polimera biljnog ćelijskog zida kao i u selektivnosti delignifikacije je takođe uočena između 6 vrsta i 11 sojeva. *T. hirsuta* BEOFB 30 je bio najefikasniji i najselektivniji razlagač lignina (56,0% razloženog lignina prema 17,4% hidrolizovane celuloze), posebno u prisustvu *p*-anizidina koji je stimulisao produkciju Mn-oksidujućih peroksidaza. Dvofaktorskom analizom varijanse je pokazano da su soj, prisustvo indukujućih supstanci kao i njihova interakcija faktori koji značajno utiču na stepen ligninolize.

Etanolni ekstrakti bazidiokarpa i micelije *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor*, su imali slab antifungalni potencijal koji se ogledao u slaboj inhibiciji rasta testiranih humanih patogena a jedino je micelijski ekstrakt *T. hirsuta* pokazao fungicidno dejstvo na *Aspergillus glaucus* (MFC = 32,0 mg/mL). Ekstrakt plodonosnih tela *T. versicolor* je pokazao najveći kapacitet neutralizacije DPPH i ABTS radikala (dobijene EC_{50} vrednosti su 15,22 odnosno 8,46 mg/mL), a glavni nosioci ove aktivnosti su bili fenoli čija je

koncentracija bila u pozitivnoj korelaciji sa antioksidativnim kapacitetom. Etanolni ekstrakti plodonosnih tela i micelije ovih vrsta su imali i značajnu genoprotektivnu aktivnost u odnosu na H₂O₂ indukovana DNK oštećenja humanih leukocita. Ekstrakti testiranih vrsta su pokazali značajan citotoksični efekat na ćelijske linije humanog adenokarcinoma grlića materice, humanog karcinoma debelog creva i humanog adenokarcinoma pluća a najselektivniji su bili ekstrakti bazidiokarpa i micelije *T. hirsuta* (IC₅₀ vrednosti u opsegu od 42,40 do 86,12 µg/mL). Testirani ekstrakti su bili značajni inhibitori aktivnosti acetilholinesteraze a posebno tirozinaze, u *in vitro* uslovima. Ekstrakti *T. versicolor* su bili najjači inhibitori tirozinaza a u koncentraciji od 100,0 µg/mL su bili efikasniji od kojične kiseline, komercijalnog inhibitora ovog enzima (stopa inhibicije se kretala u opsegu od 77,4 do 90,4% prema 51,8% kojičnom kiselinom).

Dobijeni rezultati sugerišu da postoji značajan potencijal ispitivanih vrsta roda *Trametes* za primenu u procesima delignifikacije i dobijanja jedinjenja sa antioksidativnom, genoprotektivnom, citototoksičnom i antineurodegenerativnom aktivnošću.

Ključne reči: *Trametes* spp., ligninolitički enzimi, biodegradacija, biološka aktivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

UDK broj: 582.287.237Trametes:[547.992: 577.151.3]:577.121:[579.61:616-092]:543.637.4: 575.224.46.044:616-006.6: 616.8-003.8(043.3)

ABSTRACT

The genus *Trametes* Fr. encompasses widely distributed species with strongly developed ligninolytic enzyme system and significant capacity to synthesize diverse biologically active compounds, because of which are increasingly used in numerous biotechnological processes.

The aims of this research were the optimization of cultivation conditions for ligninolytic enzyme production and degradation of selected plant residues with *T. gibbosa*, assessment of the variability in capacity of lignocellulolysis within the genus *Trametes* and determination of antifungal, antioxidative, genoprotective, cytotoxic and antineurodegenerative effects of basidiocarp and mycelial extracts.

In comparison with beach sawdust wheat straw was better carbon source for production of Mn-oxidizing peroxidases and laccase by *T. gibbosa* which maximum rate of delignification (48.3%) was achieved after 19 day of solid-state fermentation in the presence of 10.0 mM of nitrogen in the form of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and with 10% of wheat bran as additional nitrogen source. Supplementation of wheat straw with Fe^{2+} and Zn^{2+} in concentration of 0.5 mM, *p*-anisidine in concentration of 0.5% and veratryl alcohol in solutions' concentration of 0.5% significantly stimulated lygninolysis.

Significant inter- and intraspecific variability in synthesis of studied enzymes, degradation of plant cell wall polymers and selectivity in delignification was noticed among 6 species and 11 strains. *T. hirsuta* BEOFB 30 was the most efficient and the most selective lignin degrader (56.0% of degraded lignin vs. 17.4% of hydrolysed cellulose), particularly in the presence of *p*-anisidine which stimulated Mn-oxidizing peroxidises production. Results of two-way analysis of variance showed that strain, presence of inducers and their interaction represent factors which significantly affect rate of lygninolysis.

Ethanolic extracts of basidiocarps and mycelia of *T. gibbosa*, *T. hirsuta* and *T. versicolor* showed weak antifungal potential which reflected in low growth inhibition of tested human pathogens and only mycelial extract of *T. hirsuta* BEOFB 30 showed fungicidal effect on *Aspergillus glaucus* (MFC = 32.0 mg/mL). Basidiocarp extract of *T. versicolor* showed the highest capacity in neutralization of DPPH and ABTS radicals

(obtained EC₅₀ values were 15.22 and 8.46 mg/mL, respectively), and the main carriers of this activity were phenolic compounds, which concentration was positively correlated with antioxidative capacity. Ethanolic extracts of basidiocarps and mycelia of tested species also showed significant genoprotective activity against H₂O₂ induced DNA damages in human leucocytes. Extract of studied species possess significant cytotoxic effect on human cervical adenocarcinoma, human colonic adenocarcinoma and human lung carcinoma cell lines, and the most selective were the basidiocarp extracts of *T. hirsuta* (IC₅₀ values ranged from 42.40 to 86.12 µg/mL). All tested extract were significant inhibitors of acetylcholinesterase and particularly tyrosinase activity under *in vitro* conditions. *T. versicolor* extracts were the strongest inhibitors of tyrosinase and in concentration of 100.0 µg/mL were more efficient than kojic acid, commercial inhibitor of this enzyme activity (rates of inhibition ranged from 77.4 to 90.4% vs. 51.8% of inhibition by kojic acid).

Results of this study suggest significant potential of studied *Trametes* species for application in delignification processes and in obtaining of compounds with antioxidative, genoprotective, cytotoxic, and antineurodegenerative activity.

Ključne reči: *Trametes* spp., ligninolitički enzimi, biodegradacija, biološka aktivnost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Algologija i mikologija

UDK broj: 582.287.237Trametes:[547.992: 577.151.3]:577.121:[579.61:616-092]:543.637.4: 575.224.46.044:616-006.6: 616.8-003.8(043.3)

LISTA SKRAĆENICA

A – apsorbanca

AAD – aril alkohol dehidrogenaza

AAEC – ekvivalent askorbinske kiseline

AAO – aril alkohol oksidaza

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

ACE1 – bakar zavisni transkripcioni faktor

AChE – acetilholinesteraza

ADF – vlakana dobijena nakon tretmana kiselim deterdžentom

ADS – rastvor kiselog deterdženta

AIC – Akaike informacioni kriterijum

ANOVA – jednofaktorska analiza varijanse

ARE – antioksidativni regulatorni elementi

ATCC – Kolekcija američkog centra kultura (American Type Culture Collection)

A549 – ćelijska linija humanog adenokarcinoma pluća

B16 – ćelijska linija melanoma

BEOFB – Institut za botaniku, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

BHA – butil hidroksianizol

BHT – butil hidroksitoluen

bp – bazni par

BSA – albumin telećeg seruma

BTEX – benzen, toluen, etilbenzen, ksileni

cAMP – ciklični adenzin monofosfat

CAT – katalaza

CBB – Coomassie brilliant blue

CFU – broj ćelija koje formiraju koloniju

CHO/HPRT test – test ćelijskih mutacija jajnika kineskog hrčka

cis-DDP – *cis*-diamindihlorplatina

creA – gen regulacije katabolizma

CTAB – cetiltrimetilamonijum bromid
DDT – dihlordifeniltrihlor etan
dH₂O – destilovana voda
DMSO – dimetilsulfoksid
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH• – 2,2-difenil-2-pikril-hidrazil radikal
DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva) kiselina
EC broj – numerička klasifikacija enzima
EC₅₀ – efektivna koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% radikala
EDTA – etilendiamintetrasirćetna kiselina
Fe (II)-TPTZ – fero-tripiridiltriazin
Fe (III)-TPTZ – feri-tripiridiltriazin kompleks
FRAP – antioksidativni potencijal redukcije Fe³⁺ jona
GAE – ekvivalent galne kiseline
GLM – generalizovani linearni model
GPx – glutation peroksidaza
GR – glutation reduktaza
HAI – Institut za evoluciju, Univerzitet u Haifi, Izrael
HeLa – ćelijska linija humanog adenokarcinoma grlića materice
HEPES – 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonskom kiselinom
HL-60 – ćelijska linija promijeloidna leukemija
HPRT – hipoksantin fosforiboziltransferaza
OH• – hidroksil radikal
IC₅₀ – koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50%
IEA – Međunarodna agencija za energiju
IEF – izoelektrično fokusiranje
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
LAS – linearni alkilbenzen sulfonati
LC – sadržaj lignina
L-DOPA – L-3,4-dihidroksifenilalanin

lip gen – gen koji kodira lignin peroksidazu
LiP – lignin peroksidaza
LMP – niska tačka topljenja
LOO[•] – lipid peroksil radikal
LS174 – ćelijska linija humanog karcinoma debelog creva
MA – malt agar
MFC – minimalna fungicidna koncentracija
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija
MIG protein – protein cinkovog prsta
MnIP – Mn-nezavisna peroksidaza
mnp gen – gen koji kodira Mn-oksidujuće peroksidaze
MnP – Mn-zavisna peroksidaza
MRC5 – ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta
MRE – metal-vezujući elementi
MTT boja – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid
MTT test – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) test
Na₂EDTA – dinatrijum etilendiamintetrasirćetna kiselina
NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NB-4 – ćelijska linija promijeloidne leukemije
NDF – vlakana dobijena nakon tretmana neutralnim deterdžentom
NDS – rastvor neutralnog deterdženta
NMP – niska tačka topljenja
O²⁻ – superoksid radikal
PAH – policiklični aromatični ugljovodonici
PCB – polihlorovani bifenili
pH – mera aktivnosti vodonikovih jona
pI – izoelektrična tačka
PSK – polisaharid Krestin
PSP – polisaharid-peptid
QE – ekvivalent kvercetina

QR – hinon reduktaza

R^2 – koeficijent determinacije

Raji – čelijska linija Burkittovog limfoma

RPMI – Roswell Park memorijalni institut

SDA – Saburo-dekstrozni agar

SDB – Saburo-dekstrozni bujon

SDS – natrijum-dodecilsulfat

SOD – superoksid dismutaza

TCA – trihlorsirćetna kiselina

TCE – trihloretilen

TNB²⁻ – 5-tio-2-nitrobenzoatni anjon

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazin

Tris – tris-(hidroksimetil)-aminometan

Triton X-100 – polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil etar

Trp – triptofan

UV svetlost – ultra ljubičasta svetlost

VP – verzatil peroksidaza

XRE – vezujući elementi za ksenobiotike

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karakteristike odabranih vrsta roda <i>Trametes</i>	1
1.2. Uloga gljiva u razgradnji biljnog otpada	7
1.2.1. Lignoceluloza.....	7
1.2.2. Ekofiziološki aspekti razgradnje lignoceluloze	8
1.2.3. Enzimski sistemi gljiva bele truleži	9
1.2.3.1. <i>Lignin modifikujuće peroksidaze</i>	10
1.2.3.2. <i>Lakaze</i>	13
1.2.4. Regulacija ekspresije gena za ligninolitičke enzime	16
1.2.5. Uticaj uslova kultivacije na svojstva ligninolitičkih enzima	18
1.2.5.1. <i>Izvori ugljenika i azota</i>	19
1.2.5.2. <i>Mikroelementi</i>	20
1.2.5.3. <i>Jedinjenja male molekulske mase</i>	20
1.3. Primena ligninolitičkih enzima u biotehnologiji.....	21
1.3.1. Konverzija poljoprivrednog otpada	22
1.3.1.1. <i>Proizvodnja hrane</i>	24
1.3.1.2. <i>Proizvodnja hraniva</i>	25
1.3.1.3. <i>Proizvodnja papirne pulpe</i>	27
1.3.1.4. <i>Proizvodnja biogoriva</i>	27
1.3.2. Bioremedijacija	29
1.4. Medicinski značaj vrsta roda <i>Trametes</i>	31
1.4.1. Biološki aktivna jedinjenja	31
1.4.2. Antimikrobna aktivnost	34
1.4.3. Antioksidativna aktivnost	35
1.4.4. Genoprotektivna aktivnost	37
1.4.5. Antitumorska aktivnost.....	37
1.4.6. Antineurodegenerativna aktivnost	38

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	40
3. MATERIJAL I METODE.....	41
3.1. Proučavane vrste i sojevi.....	41
3.2. Priprema inokuluma	42
3.3. Karakterizacija Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza	42
3.3.1. Kultivacija i priprema ekstrakata	42
3.3.2. Određivanje aktivnosti proučavanih enzima.....	43
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina	44
3.3.4. Elektroforeza.....	44
3.4. Određivanje sadržaja hemiceluloze, celuloze i lignina.....	45
3.4.1. Određivanje sadržaja hemiceluloze	45
3.4.2. Određivanje sadržaja celuloze i lignina	46
3.5. Određivanje bioloških aktivnosti ekstrakata	46
3.5.1. Kultivacija micelije	46
3.5.2. Ekstrakcija.....	47
3.5.3. Određivanje antifungalne aktivnosti	47
3.5.3.1. Priprema suspenzija spora	47
3.5.3.2. Mikrodiluciona metoda	48
3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti.....	48
3.5.4.1. DPPH test.....	48
3.5.4.2. ABTS test	49
3.5.4.3. FRAP test.....	49
3.5.4.4. Određivanje sadržaja fenola i flavonoida	50
3.5.5. Određivanje stepena DNK oštećenja	51
3.5.6. Određivanje citotoksične aktivnosti.....	52
3.5.6.1. Tretman ćelijskih linija.....	53
3.5.6.2. Određivanje stepena preživljavanja ćelija (MTT test)	53
3.5.7. Određivanje potencijala prevencije i suzbijanja neurodegenerativnih promena	54

3.5.7.1. Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze.....	54
3.5.7.2. Inhibicija aktivnosti tirozinaze	54
3.6. Statistička analiza	55
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	56
4.1. Optimizacija uslova kultivacije za produkciju i aktivnost	
Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza <i>Trametes gibbosa</i>	56
4.1.1. Efekat tipa fermentacije i vrste biljnog otpada	56
4.1.2. Efekat dužine kultivacije.....	60
4.1.3. Efekat izvora azota.....	63
4.1.4. Efekat mikroelemenata	74
4.1.5. Efekat indukujućih supstanci	79
4.2. Inter- i intraspecijska varijabilnost u svojstvima Mn-oksidujućih peroksidaza	
i lakaza i nivou degradacije pšenične slame unutar roda <i>Trametes</i>.....	81
4.2.1. Varijabilnosti u aktivnosti enzima	82
4.2.2. Varijabilnosti u izoenzimskim profilima enzima.....	89
4.2.3. Varijabilnosti u kapacitetu degradacije polimera pšenične slame	95
4.3. Biološke aktivnosti ekstrakata bazidiokarpa i micelije	
odabranih vrsta roda <i>Trametes</i>	107
4.3.1. Prinos ekstrakcije	107
4.3.2. Antifungalna aktivnost.....	108
4.3.3. Antioksidativna aktivnost	112
4.3.3.1. Sadržaj fenola i flavonoida	113
4.3.4. Genoprotektivna aktivnost.....	115
4.3.5. Citotoksična aktivnost.....	119
4.3.6. Potencijal inhibicije acetilholinesteraze i tirozinaze.....	121
5. ZAKLJUČCI.....	124
6. LITERATURA.....	127

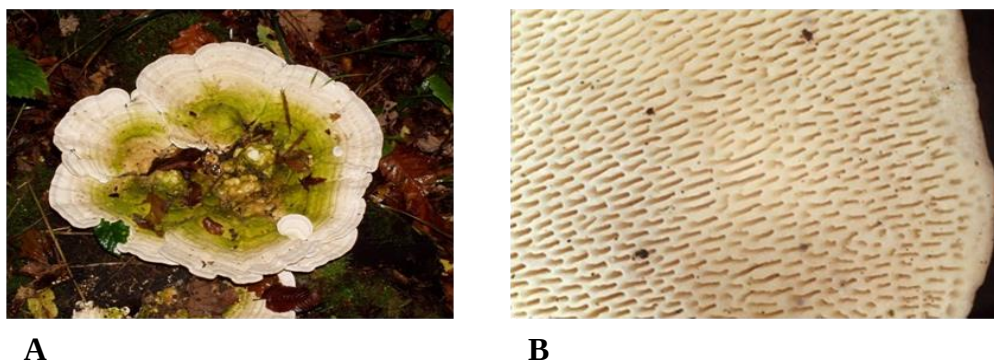
1. UVOD

Rod *Trametes* je ustanovio Fries 1835. godine. Pripada familiji Polyporaceae i obuhvata oko 50 vrsta koje se karakterišu konzolastim plodonosnim telom, cevastim himenoforom, glatkim sporama i odsustvom cistidija. Izazivači su belog truljenja i široko su rasprostranjene u različitim biotopima. U Evropi je rod zastupljen sa 9 vrsta: *Trametes cervina*, *T. gibbosa*, *T. hirsuta*, *T. junipericola*, *T. ljubarskiy*, *T. multicolor*, *T. pubescens*, *T. suaveolens* i *T. versicolor* (Tomšovský i dr., 2006; Cui i dr., 2011).

1.1. Karakteristike odabranih vrsta roda *Trametes*

Trametes gibbosa (Pers.) Fr.

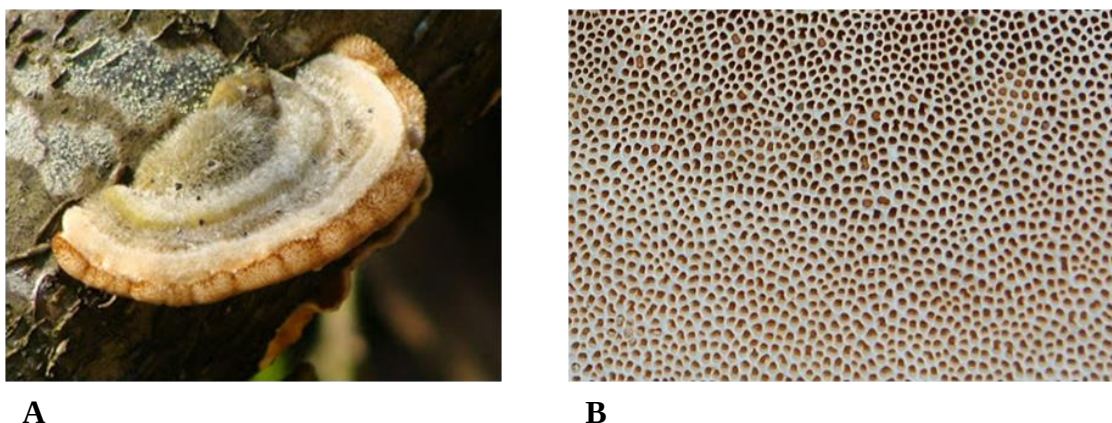
Trametes gibbosa je prvi put opisao Kristijan Hendrik Person (Christiaan Hendrick Persoon) 1796. godine kao *Merulius gibbosus*. Sadašnji naziv dobija 1836. godine od strane švedskog mikologa Elijasa Magnusa Frisa (Elias Magnus Fries). U narodu je ova vrsta poznata kao **zelenkasta obojenica** (Vukojević i Hadžić, 2013). Formira konzolasta plodonosna tela koja su često grupisana u rozete. **Pileus** je polukružan, dužine 5,0 - 20,0 cm, širine 8,0 - 12,0 cm i debljine 1,0 - 8,0 cm (Slika 1A). Gornja površina je glatka, sa ispupčenjem na sredini po čemu je vrsta i dobila naziv (*gibbosa* – grbava), bela, belo-siva, ponekad žućkasta ili boje cimeta, često zelenkasta naročito bliže centru zbog prisustva algi. Ivice su u početku zadebljale a kasnije postaju oštre. **Cevčice** cevastog himenofora su beličaste do žute, dužine 3,0 - 15,0 mm i otvaraju se sitnim i izduženim porama (Slika 1B). **Meso** je belo i plutaste konzistencije. **Spore** su subcilindrične, glatke, bele, neamiloidne, dimenzija 4,0 - 5,0 × 2,0 - 2,5 µm. Plodonosna tela se mogu naći u toku cele godine a sporulacija se dešava u kasno proleće. Rasprostranjena je u Evropi i Aziji, a 2007. godine je nađena i u Severnoj Americi pa se pretpostavlja da je introdukovana. Saprobnost je na panjevima listopadnih vrsta, najčešće na bukvi (Phillips, 1981; Kout i Vlasák, 2007).



Slika 1. *Trametes gibbosa* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofora

Trametes hirsuta (Wulf.:Fr.) Pil.

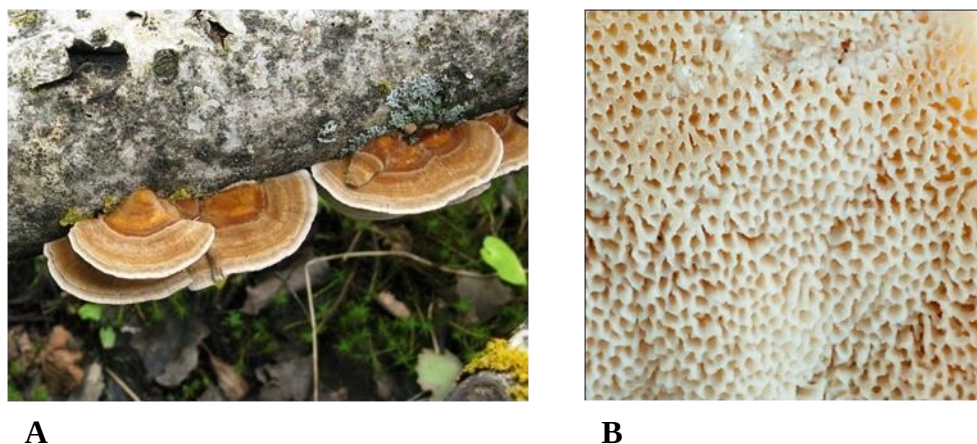
Austrijski mikolog Franc Havijer fon Vulfen (Franz Xavier von Wulfen) je 1789. godine opisao *Polyporus hirsutus*, vrstu koju je američki mikolog Kertis Gejts Lojd (Curtis Gates Lloyd) reklasifikovao u rod *Trametes* i dao joj sadašnji naziv. U narodu je poznata kao **siva obojenica** (Vukojević i Hadžić, 2013). Plodonosna tela se javljaju pojedinačno ili u preklapajućim grupama, a susedni pileusi vrlo često mogu i da srastu. **Pileus** je dugačak 4,0 - 10,0 cm, širok 2,0 - 6,0 cm i debljine 0,5 - 1,0 cm, sa koncentrično zoniranom beličastom do žuto-braon ili sivom gornjom površinom svetlijih ivica koja je prekrivena srebrnastim dlakama po čemu je vrsta i dobila naziv (*hirsutus* – dlakav) (Slika 2A). **Meso** je žilavo i kožasto, bele boje, gorkog ukusa i mirisa anisa dok je mlado. **Cevčice** himenofora su dugačke 1,0 - 5,0 mm, bele do žućkaste i završavaju se porama čiji su otvori subcirkularni, u početku beli a kasnije tamno-sivi (Slika 2B). **Spore** su elipsoidne do subcilindrične, glatke, beličaste, neamiloidne, dimenzija 5,5 - 7,5 × 1,5 - 2,5 μm. Nastanjuje mrtva stabla i panjeve listopadnih vrsta a najčešće bukve. Mlada plodonosna tela se razvijaju u kasno leto i jesen a mogu se zadržati i u toku zimskih meseci ukoliko su zaklonjena. Mladi bazidiokarpi su veoma slični bazidiokarpima *T. pubescens*, ali kako stare dolazi do formiranja koncentričnih i obojenih grebenastih zona što je primarna makroskopska razlika između ove dve vrste. Rasprostranjena je u Evropi, Aziji i Severnoj Americi (Phillips, 1981).



Slika 2. *Trametes hirsuta* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofora

Trametes multicolor (Schaeff.) Jülich

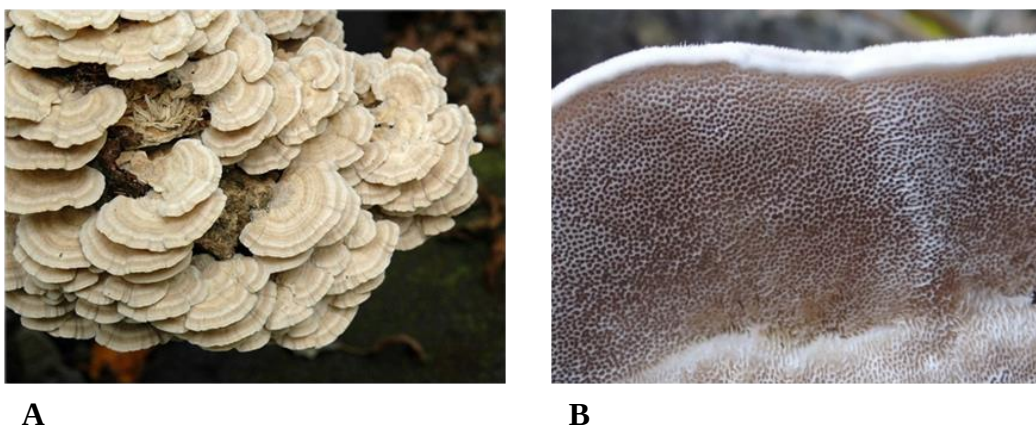
Trametes multicolor je prvi opisao nemački prirodnjak Jakob Kristijan Šefer (Jacob Christian Schaeffer) 1774. godine pod nazivom *Boletus multicolor*. Današnji naziv je ustanovio švajcarski mikolog Valter Julih (Walter Jülich) 1982. godine. Sinonimi koji se vrlo često upotrebljavaju u popularnoj i naučnoj literaturi su *T. ochracea* (Pers.) Gilb. & Ryvarden i *T. zonata* (Nees) Pilát. **Pileus** je dužine 1,5 - 5,0 cm, širine do 4,3 cm i debljine do 15 mm, polukružnog do kružnog oblika, široko srasta za supstrat i razvija se individualno a povremeno više njih formira rozete. Gornja površina je prekrivena sitnim dlakama, koncentrično obojena različitim nijansama braon, oker ili narandžaste boje (plava i purpurna kod ove vrste po pravilu odsustvuju po čemu se lako može razlikovati od morfološki slične *T. versicolor*) po čemu je vrsta dobila naziv (*ochracea* – oker) (Slika 3A). **Cevčice** himenofora su dugačke 1,0 - 4,0 mm i otvaraju se porama koje su uglavnom okrugle, oker ili braon boje (Slika 3B). **Meso** je bez mirisa i ukusa, plutaste konzistencije. **Spore** su cilindrične i povijene, glatke, neamiloidne, dimenzija 5,5 - 7,5 × 2,5 - 3,5 µm. Plodonosna tela se formiraju u jesen a mogu se naći u toku cele godine. Rasprostranjena je u Evropi i nije česta (Phillips, 1981).



Slika 3. *Trametes multicolor* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofora

Trametes pubescens (Schum.:Fr.) Pil.

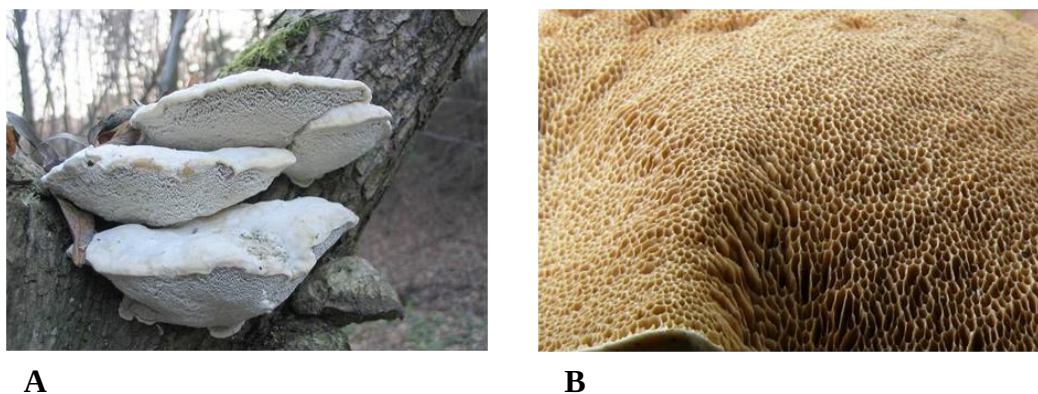
Danski mikolog Hajnrih Kristijan Fridrih Šumacher (Heinrich Christian Friedrich Schumacher) je 1803. godine opisao *Boletus pubescens*, vrstu koju je češki mikolog Albert Pilat (Albert Pilát) 1939. godine reklasifikovao u rod *Trametes* i dao joj današnji naziv. U narodu je poznata kao **dlakava obojenica** (Vukojević i Hadžić, 2013). **Pileusi** su polukružnog oblika dužine do 8,0 cm, širine 1,5 - 5,0 cm i debljine oko 0,5 cm, bele ili oker boje, formiraju manje grupe a ponekada i bočno srastaju. Gornja površina je somotasta, obrasla sitnim dlakama (*pubescent* – obrastao finim dlakama), ponekad sa slabo uočljivim grebenastim zonacijama ujednačene boje (Slika 4A). **Meso** je žilavo, plutaste konzistencije, bele boje, bez mirisa i ukusa. **Cevčice** himenofora su dugačke 1,0 - 4,0 mm, a otvaraju se blago uglastim sitnim porama bele boje i različite veličine koje mogu da srastaju (Slika 4B). **Spore** su cilindrične do izrazito izdužene, glatke, neamiloidne, dimenzija 5,0 - 6,0 × 1,5 - 2,5 µm. Ova vrsta nastanjuje mrtva stabla i panjeve listopadnih vrsta a najčešće bukve i vrsta roda *Prunus*. Plodonosna tela se javljaju u toku leta i jeseni a na južnijim lokalitetima se mogu naći i u toku zime. Rasprostranjena je u Evropi i Severnoj Americi (Phillips, 1981).



Slika 4. *Trametes pubescens* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofora

Trametes suaveolens (L.) Fr.

Trametes suaveolens je opisao Karl Line (Carl Linnaeus) 1753. godine kao *Boletus suaveolens*. Vrstu je 1838. godine reklasifikovao Elias Magnus Fris i dao joj današnji naziv. U narodu je poznata kao **lišćarska obojenica** (Vukojević i Hadžić, 2013). Mlada plodonosna tela su u početku loptasta a kasnije dobijaju oštrije ivice, naročito na spoju između sterilne i fertilne površine pileusa. **Pileus** je u poređenju sa ostalim vrstama ovog roda najkrupniji, dužine 6,0 - 12,0 cm, širine 1,0 - 10,0 cm i debljine 1,0 - 4,0 cm, oker-bele ili svetlo-sive boje. Gornja površina je blago talasasta, obrasla veoma sitnim dlakama i ponekada nastanjena zelenim algama (Slika 5A). **Meso** je bele boje, izrazito žilavo i tvrde konzistencije, jakog mirisa koji podseća na anis (*suaveolens* – prijatnog mirisa) i bez ukusa. **Cevčice** himenofora su bele, dužine 10,0 - 15,0 mm i otvaraju se okruglim do elipsoidnim mrkim, bledo-sivim do žutim porama koje mogu biti i izdužene ako je bazidiokarp postavljen pod određenim uglom, i koje su međusobno udaljene 0,5 - 1,0 mm (Slika 5B). **Spore** su krupne i izdužene, glatke, neamiloidne, dimenzija 8,0 - 12,0 × 4,0 - 4,5 μm. Nastanjuje mrtva stabla listopadnih vrsta a najčešće se nalazi na topoli i vrbi. Plodonosna tela se javljaju tokom cele godine a sporulišu u jesen. Retka je vrsta a areal rasprostranjenja obuhvata Evropu, Severnu Ameriku i delove Azije. U Velikoj Britaniji i Irskoj se nalazi na Crvenoj listi ugroženih vrsta (Phillips, 1981).



Slika 5. *Trametes suaveolens* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofor

Trametes versicolor (L.:Fr.) Lloyd

Trametes versicolor je prvi opisao Karl Line 1753. godine pod nazivom *Boletus versicolor*, a današnji naziv dobija 1939. godine od strane češkog mikologa Alberta Pilata. U narodu je poznata kao **raznobojna obojenica** ili **ćuranov rep** (Vukojević i Hadžić, 2013). **Pileusi** su dužine 4,0 - 10,0 cm, širine 3,0 - 5,0 cm i debljine 0,1 - 0,3 cm, kožasti i obično formiraju velike preklapajuće grupe. Gornja površina bazidiokarpa je somotasta a starenjem postaje glatka, koncentrično zonirana sa crno-zelenim, sivo-plavim, sivo-braon ili oker do boje rde zonama, sa belim do drap ivicama, po čemu je vrsta i dobila naziv (*versicolor* – raznobojan) (Slika 6A). **Meso** je žilavo, bele boje, bez mirisa i ukusa. **Cevčice** himenofora su dužine 0,5 - 1,0 mm, bele do žućkaste i otvaraju se porama koje su kružne ili nepravilno uglaste, bele, žućkaste ili svetlo braon boje (Slika 6B). **Spore** su elipsoidne, glatke, žute, neamiloidne, dimenzija 5,5 - 6,0 × 1,5 - 2,0 μm. Nastanjuje mrtva stabla i panjeve listopadnih vrsta, vrlo je česta i može se naći u toku cele godine. Rasprostranjena je u Evropi, Aziji i Severnoj Americi (Phillips, 1981).

**A****B**

Slika 6. *Trametes versicolor* – **A:** izgled plodonosnog tela; **B:** izgled himenofora

1.2. Uloga gljiva u razgradnji biljnog otpada

Kontinuirani rast svetske populacije je praćen povećanjem poljoprivredne i industrijske proizvodnje što za posledicu ima stvaranje velike količine raznovrsnih biljnih ostataka i drugog otpada, narušavanje životne sredine i brzu potrošnju prirodnih izvora energije i vlakana. U različitim regionima sveta dominantni su različiti usevi. Na primer, pirinač je najviše gajena žitarica u Aziji, kukuruz u Americi a pšeniča u Evropi, a rezultat toga je akumuliranje različitog lignoceluloznog otpada. Prema podacima Gupta i Verma (2015), 2010. godine svetska proizvodnja ostataka iz kultivacije pirinča je bila 104507×10^4 tona, pšenice 98104×10^4 tona, a kukuruza 84031×10^4 tona. Takođe, ne treba zanemariti ni komercijalni otpad koji sadrži i lignocelulozne ostatke u obliku papira, ostataka hrane i baštenskog otpada i čini oko 10% ukupno produkovanog otpada (Blumenthal, 2011).

1.2.1. Lignoceluloza

Lignoceluloza je kompleks koji se sastoji od tri polimera, celuloze, hemiceluloze i lignina, koji su čvrsto isprepletani i vezani kovalentnim vezama. Celuloza je linearni polimer u kome se molekuli D-glukoze vezuju β -(1,4) glikozidnim vezama u dugačke lance koji se međusobno povezuju vodoničnim vezama. Hemiceluloza je granati polisaharid koga grade D-ksiloza, D-manoza, D-galaktoza, D-glukoza, L-arabinoza, 4-O-metil glukuronska,

D-glukuronska i D-galakturonska kiselina međusobno povezani β -(1,4) a ponekada i β -(1,3) glikozidnim vezama (Sánchez, 2009). Lignin je nerastvorljivi aromatični heteropolimer zastupljen sa 10 - 30% u lignocelulozi biljnog ćelijskog zida kome daje čvrstinu, štiti strukturne polisaharide od hidrolitičkih enzima a vaskularni sistem od patogena (Kelley i Glasser, 1987). Nakon celuloze, lignin predstavlja najrasprostranjeniji obnovljivi izvor ugljenika na planeti. Procenjena količina lignina prisutnog u kopnenim ekosistemima iznosi približno 300 milijardi tona, a godišnja stopa produkcije je u proseku oko 20 milijardi tona (Hammel, 1992; Argyropoulos i Menachem, 1998). Heterogenost u strukturi lignina je rezultat načina vezivanja njegove tri monomerne jedinice: *p*-kumaril, koniferil i sinapil alkohola. U toku lignifikacije ćelijskih zidova dolazi do formiranja fenoksi radikala putem jedno-elektronske oksidacije alkohola u prisustvu peroksida. Tako nastali radikali iz svih monomernih jedinica se javljaju u više mezomernih formi a do sparivanja dolazi gotovo među svim tim formama što dovodi do nastanka 12 različitih međujediničnih C–C i C–O–C veza za svaki alkohol (Kirk i Obst, 1988). Sastav, nivo grananja, tip veza sa strukturnim polisaharidima kao i sadržaj lignina variraju od vrste do vrste a zavise i od stadijuma razvića biljke i njenih delova. Na primer, kod smrče odnos *p*-hidroksifenil, guacil i siringil jedinica je 2:98:0, kod breze 0:24:76, a kod pšenične slame 5:49:46 (Lapierre, 1993). Po fizičko-hemijskim karakteristikama mogu se izdvojiti tri osnovna tipa lignina: (i) **GS-lignin**, lignin mekog drveta (golosemenice), (ii) **G-lignin**, lignin tvrdog drveta (skrivenosemenice) i (iii) **GSH-lignin**, lignin trava i zeljastih biljaka (Faix, 1991).

1.2.2. Ekofiziološki aspekti razgradnje lignoceluloze

Gljive predstavljaju jedne od najboljih razlagača lignoceluloze u prirodi. U odnosu na put kojim vrše degradaciju biljne mase, gljive se mogu svrstati u tri grupe: (i) gljive bele truleži, (ii) gljive braon truleži i (iii) gljive meke truleži (Eriksson i dr., 1990). **Gljive bele truleži** su jedini organizmi koji u potpunosti mogu da depolimerizuju i razgrade lignin, celulozu i hemicelulozu. Najveći broj, od oko 1500 vrsta, pripada podrazdelu Basidiomycotina a manji broj podrazdelu Ascomycotina (Schwarze, 2007). **Gljive braon truleži** razlažu celulozu i hemicelulozu dok je razgradnja lignina delimična, ograničena na

proces demetilacije metoksil grupa i oksidaciju i depolimerizaciju koje iniciraju hidroksil ($\text{OH}\bullet$) radikali (Rayner i Boddy, 1988). Ovoj grupi pripada svega 6% ukupnog broja vrsta koje mogu da razlažu drvenu masu, gotovo sve nastanjuju četinarske vrste i uglavnom su pripadnici familije Polyporaceae (Rayner i Boddy, 1988; Hibbett i Donoghue, 2001). **Gljive meke truleži** razlažu celulozu i hemicelulozu dok je proces modifikacije lignina ograničen na demetilaciju. Tipično za ovu grupu gljiva je da napadaju drvenu masu sa visokim nivoom vlažnosti i niskim sadržajem lignina. Po prirodi razlaganja drveta ova grupa se može okarakterisati kao sporija i manje agresivna u odnosu na prethodne dve, a po kvantitativnom udelu u razgradnji kao najmanje značajna grupa. Vrste koje izazivaju meko truljenje drveta pripadaju podrazdelima Ascomycotina i Basidiomycotina (Kirk i Cullen, 1998; Schwarze, 2007).

1.2.3. Enzimski sistemi gljiva bele truleži

Gljive bele truleži proizvode tri grupe enzima: **A.** lignocelulolitičke enzime koji uključuju ligninaze, celulaze i hemicelulaze; **B.** enzime koji deluju zajedno sa enzimima prve grupe ali nikada samostalno (superoksid dismutaze i glioksal oksidaze) i **C.** enzime povratne sprege koji uključuju glukozo 1-oksidge, aril alkohol oksidge, piranozo 2-oksidge, celobiozo dehidrogenaze i celobiozo hinon oksidoreduktaze koje indirektno učestvuju u depolimerizaciji lignina a direktno u degradaciji celuloze (Leonowicz i dr., 1999; Sánchez, 2009).

Tri enzima različite specifičnosti grade enzimski kompleks (celulaze) koji hidrolizuje celulozu. To su: (i) endo-1,4- β -glukanaze ili karboksimetilcelulaze (EC 3.2.1.4) koje vrše inicijalni napad na nekoliko mesta unutar molekula celuloze, (ii) celobiohidrolaze ili egzoglukanaze (EC 3.2.1.91) koje uklanjaju monomere i dimere sa krajeva lanaca i (iii) β -glukozidge (EC 3.2.1.21) koje hidrolizuju dimere glukoze a ponekada i oligosaharide do glukoze (Sánchez, 2009).

Hemicelulaze kao i pomoćni enzimi su neophodni za potpunu degradaciju hemiceluloze do monomernih šećera i sirćetne kiseline. Hemicelulaze se prema svom dejstvu na supstrat klasifikuju na (i) endo-1,4- β -ksilanaze (EC 3.2.1.8) koje katalizuju raskidanje veza u

ksilanu i nastanak oligosaharida i (ii) ksilan-1,4- β -ksilozidaze (EC 3.2.1.37) koje hidrolizuju oligosaharide do ksiloze. Ksilan esteraze, ferulične i *p*-kumarične esteraze, α -4-O-metilglukuronozidaze i α -1-arabinofuranozidaze su pomoćni enzimi koji deluju sinergistički i hidrolizuju ksilane i manane (Sánchez, 2009).

Veličina molekula i nivo grananja, specifične veze i nerastvorljivost u vodi su svojstva lignina koja leže u osnovi njegove rezistentnosti na razgradnju (Hammel, 1997). Zbog toga je delignifikacija ekstracelularni, oksidativni, nespecifičan i spor proces koji uključuje raskidanje inter-monomernih veza, demetilaciju, hidroksilaciju, modifikaciju bočnih lanaca i cepanje aromatičnih prstenova praćeno disimilacijom alifatičnih metabolita koji tom prilikom nastaju (Vicuña, 1988). Sve ove biohemijske reakcije se u manjoj ili većoj meri odvijaju simultano i katalizovane su brojnim enzimima (Eriksson i dr., 1990). Ključnu ulogu u degradaciji lignina imaju tri ekstracelularna enzima koja se sintetišu u toku sekundarnog metabolizma gljiva: (i) lignin peroksidaza (LiP), (ii) mangan-oksidujuće peroksidaze i (iii) lakaza (Tien i Kirk, 1983, 1984; Souza i dr., 2005; Sánchez, 2009). Međutim, još tri enzima su uključena u ovaj proces (Kersten, 1990; Ferreira i dr., 2009a; Sánchez, 2009). Prvi od njih je aril alkohol oksidaza (EC 1.1.3.7; AAO), flavoenzim koji oksiduje različita aromatična jedinjenja kao i alifatične polinezasićene alkohole i stvara H₂O₂ neophodan za aktivnost lignin- i Mn-oksidujućih peroksidaza, kao i OH• koji vrši inicijalni napad na lignocelulozu (Evans i dr. 1991; Gutiérrez i dr. 1994; Varela i dr. 2001). Ovi enzimi deluju sinergistički sa lakazama i sprečavaju repolimerizaciju produkata degradacije lignina i drugih aromatičnih jedinjenja (Guillén i dr. 2000). Pored ovih enzima u delignifikaciju su uključeni i aril-alkohol dehidrogenaza (EC 1.1.1.90; AAD) koja katalizuje konverziju aromatičnih alkohola u aromatične aldehide i hinon reduktaza (EC 1.6.5.5; QR) koja katalizuje dobijanje semihinona iz hinona.

1.2.3.1. Lignin modifikujuće peroksidaze

Peroksidaze gljiva bele truleži tipično imaju izoelektrične tačke (pI) u kiseloj oblasti (3,0 - 4,0), dobro konzervativne amino-kiselinske sekvence, dva Ca²⁺ vezujuća mesta i 8 cisteinskih ostataka koji formiraju disulfidne mostove u cilju stabilizacije proteinske

strukture i aktivnih centara (Piontek i dr., 1993; Petersen i dr., 1994; Mester i Field, 1998; Camarero i dr., 1999; Hatakka, 2001; Martínez i dr., 2002).

Lignin peroksidaze (EC 1.11.1.14) su otkrivene 1983. godine kod *Phanerochaete chrysosporium* a kasnije su zabeležene i kod drugih gljiva i filamentoznih bakterija (Tien i Kirk, 1983). To su H_2O_2 zavisni glikozilovani hem-enzimi molekulske mase od 38,0 do 43,0 kDa (Schmidt i dr., 1990). Snažni su oksidansi jer je gvožđe (III) iz porfirinskog prstena sklono redukciji pa može direktno da oksiduje i fenolna ali i nefenolna jedinjenja. Sposobnost oksidacije nefenolnih komponenata je posebno značajna za proces delignifikacije pošto one čine 90% molekula lignina (Hamel i Cullen, 2008). U sastav enzima ulazi 243 - 245 amino-kiselina a za aktivnost je neophodan terminalan triptofan (Trp171) pošto učestvuje u transferu elektrona sa supstrata koji ne mogu da ostvare direktan kontakt sa aktivnim centrom (Schmidt i dr., 1990; Gold i Alic, 1993; Doyle i dr., 1998; Choinowski, i dr., 1999; Mester i Tien, 2001). Ovi enzimi katalizuju jedno-elektronsku oksidaciju supstrata do slobodnog radikala koristeći H_2O_2 kao akceptor elektrona. U nativnom enzimu je gvožđe u feri stanju (Fe^{3+}), H_2O_2 oksiduje enzim do Fe^{4+} -okso-porfirin-radikal kompleksa (**jedinjenje I**) koji dalje oksiduje supstrat a sam se redukuje do Fe^{4+} -okso-porfirin kompleksa (**jedinjenja II**). Sledeća oksidacija drugog molekula supstrata vraća enzim u nativno stanje (Vidossich i dr., 2010). Zbog svoje jedinstvene sposobnosti da vrše epoksidaciju i hidroksilaciju aromatičnog prstena uz pomoć H_2O_2 ovi enzimi su pre svega aromatične peroksidaze (Hofrichter i dr., 2010). Lignin peroksidaze se sintetišu u nekoliko izoformi (može ih biti do 16) koje kodiraju *lip* geni (Kirk, 1987; Boominathan i dr., 1993; Johansson i dr., 1993; Reddy, 1993). Introni u ovim genima su prosečne veličine 50 bp, njihov broj varira od vrste do vrste i kreće se u opsegu od 8 do 17, a u najvećem broju gena jednog organizma zadržavaju identičnu poziciju. Nasuprot intronima, veličina egzonskih sekvenci je znatno varijabilnija i kreće se od 5 do 240 bp (Gold i Alic, 1993; Miki i dr., 2010; Janusz i dr., 2013).

Brojne vrste podrazdela Basidiomycotina imaju sposobnost da sintetišu Mn-oksidujuće peroksidaze koje se prema specifičnosti za supstrat dele na Mn-zavisne peroksidaze (EC 1.11.1.13; MnP) i Mn-nezavisne peroksidaze (EC 1.11.1.16; MnIP) (Fernández-Fueyo i dr., 2014). Obe Mn-oksidujuće peroksidaze poseduju Mn^{2+} oksidujuće mesto, a MnIP još i

mesto za direktnu oksidaciju jedinjenja srodnih ligninu niskog i visokog redoks potencijala (Perez-Boada i dr., 2005). Zbog ovog svojstva MnP, glikozilovani hem-proteini molekulske mase od 38,0 do 62,5 kDa (najčešće oko 45,0 kDa), u prisustvu H_2O_2 oksiduju Mn^{2+} u Mn^{3+} , visokoreaktivni intermedijer koji može da difunduje iz aktivnog centra enzima i da oksiduje fenolni supstrat kao nespecifični oksidans a u prisustvu različitih medijatora i nefenolne strukture (Gold i Alic, 1993; Glenn i Gold, 1985; Bonnarme i Jeffries, 1990; Giardina i dr., 2000; Martinez, 2002; Hofrichter, 2002). Martinez (2002) je opisao katalitički put MnP koji otpočinje u prisustvu H_2O_2 , ili nekog organskog peroksida, koji donira elektron hemu enzima pri čemu nastaje **jedinjenje I** (Fe^{4+} -okso-porfirin-radikal kompleks) i oslobađa se molekul vode. U prisustvu supstrata, fenola ili Mn^{2+} jedinjenje I se redukuje do **jedinjenja II** (Fe^{4+} -okso-porfirin kompleks) a ono do nativnog enzima u prisustvu Mn^{2+} koji se nalazi u lignocelulozi i koji se oksiduje do Mn^{3+} uz oslobađanje drugog molekula vode. Mn^{3+} je mali, nestabilni oksidans koga stabilizuju organske kiseline (oksalna, malonatna, vinska ili mlečna) i koji difunduje u biljni ćelijski zid i katalizuje cepanje veza u fenolnim subjedinicama lignina produkujući fenoksil radikal kao intermedijer. Helati Mn^{3+} sa kiselinama oksiduju i nefenolna aromatična, amino-aromatična i tiol jedinjenja, kao i nezasićene masne kiseline do određenih radikala koji dalje kidaju veze u nefenolnim delovima lignina. Ovi helati takođe mogu reagovati jedan sa drugim stvarajući alkil radikale koji spontano reaguju sa kiseonikom formirajući superoksid radikal koga nativni enzim može koristiti u odsustvu H_2O_2 . Međutim, Hofrichter (2002) je pokazao da visoke koncentracije H_2O_2 ili O_2 vode nastanku katalitički neaktivnog **jedinjenja III** ($\text{O}_2\text{-Fe}^{3+}\text{=Fe}^{2+}\text{-O}_2$) koje prouzrokuje inaktivaciju MnP.

Martinez i dr. (1996) su prvi izolovali i okarakterisali dve MnIP posle tečne kultivacije *Pleurotus eryngii* u medijumu koji je sadržao glukozu, pepton i ekstrakt kvasca i nazvali ih verzatil peroksidazama (VP). Kasnije su Hofrichter (2002) i Hammel i Cullen (2008) pokazali da i druge vrste roda *Pleurotus* kao i vrste rodova *Bjerkandera*, *Lentinus*, *Panus* i dr. mogu da sintetišu MnIP. Katalitička svojstava i poreklo MnIP još uvek nisu u potpunosti poznati. Martínez i dr. (1996) su pokazali da vrste roda *Pleurotus* vrše Mn-nezavisnu oksidaciju fenolnih supstrata katalitičkom aktivnošću verzatil peroksidaza, a Heinfling i dr. (1998a,b) da izoenzimi MnP *Bjerkandera adusta* mogu da oksiduju veratril

alkohol ($C_9H_{12}O_3$) i 2,6-dimetoksifenol u odsustvu Mn^{2+} ali uz znatno nižu katalitičku aktivnost nego u njegovom prisustvu. Zbog sposobnosti da oksiduju i Mn^{2+} i aromatična jedinjenja Martinez (2002) ove enzime smatra hibridima MnP i LiP.

Mn-oksidujuće peroksidaze se proizvode u više izoformi (i do 11 kod *Ceriporiopsis subvermisporea*) koje se karakterišu određenom strukturom i svojstvima, posebno izoelektričnim tačkama i molekulskim masama, i koje kodiraju familije blisko povezanih *mnp* gena koji su do sada nađeni kod predstavnika redova Agaricales, Corticiales, Polyporales i Hymenochaetales (Gold i Alic, 1993; Lobos i dr., 1994; Urzua i dr., 1995; Martinez i dr., 1996; Camarero i dr., 1999; Li i dr., 1999; Tello i dr., 2000; Hofrichter, 2002; Stajic i dr., 2006a, 2010; Morgenstern i dr., 2010; Janusz i dr., 2013; Lanfermann i dr., 2015). Što se tiče organizacije intronskih i egzonskih sekvenci postoje značajne razlike u njihovom broju i strukturi između predstavnika redova Corticiales, Polyporales i Hymenochaetales, sa jedne strane, i predstavnika reda Agaricales, sa druge strane. Kod prvih *mnp* geni imaju mali broj (4 - 7) visoko konzervativnih intronskih sekvenci približno istih pozicija, a kod drugih *mnp* geni mogu imati i do 15 intronskih sekvenci koje po pozicijama više odgovaraju genu koji kodira LiP (Alic i dr., 1997; Giardina i dr., 2000; Hilden i dr., 2005; Hakala i dr., 2006).

1.2.3.2. Lakaze

Lakaze (EC 1.10.3.2) ili polifenol-oksidge katalizuju jedno-elektronsku oksidaciju polifenola i drugih aromatičnih jedinjenja redukujući molekulski kiseonik do vode (Canas i Camarero, 2010; Lundell i dr., 2010). Predstavljaju jedne od prvih ispitivanih enzima koji su opisani još u XIX veku u eksudatu lakovog drveta (*Toxicodendron vernicifluum*, stari naziv *Rhus vernicifera*) (Yoshida, 1883), a nekoliko godina kasnije su detektovani i kod gljiva (Bertrand, 1896). Lakaze su široko rasprostranjene, ulaze u sastav enzimskih sistema bakterija (Givaudan i dr., 1993; Sanchez-Amat i Solano, 1997; Martins i dr., 2002), gljiva gde su aktivne u procesima morfogeneze, delignifikacije i detoksifikacije (Clutterbuck, 1972; Sarkanen i dr., 1991; Thurston, 1994; Leonowicz i dr., 2001) i biljaka gde učestvuju u sintezi lignina (Mayer, 1987, Bao i dr., 1993; Dean i Eriksson, 1994).

Lakaze gljiva su ekstracelularni glikoproteini čija ugljovodonična komponenta čini 10 - 30% (retko 49% ili svega 1%) molekula, molekulске mase od 60,0 do 80,0 kDa (velika heterogenost postoji između vrsta iz podrazdela Ascomycotina) i pI koje se kreću u pH opsegu od 3,0 do 6,0 (Thurston, 1994; Muñoz i dr., 1997; Baldrian, 2006). Najveći broj lakaza gljiva su monomerni proteini, a kod vrsta gde su homodimerne strukture subjedinice imaju molekulsku masu tipičnu za monomerne lakaze (Baldrian, 2006). Sadrže četiri atoma bakra raspoređena u dva aktivna centra, T1 i T2/T3 i koordinisana sa 10 konzervativnih histidinskih i jednim cisteinskim ostatkom (Morozova i dr., 2007). Lakaze pojedinih vrsta gljiva mogu umesto bakra da vežu i druge metale kao što su Zn, Fe i Mn ali one ne pripadaju grupi takozvanih „plavih lakaza“ (Palmieri dr., 1997; Min i dr., 2001). Mada postoji značajan diverzitet na nivou amino-kiselinskih sekvenci, tercijerna struktura enzima pokazuje visoku konzervativnost naročito u regionima koji imaju ulogu u oksido-redukcionim reakcijama (Lundell i dr., 2010). Konzervativne amino-kiseline su locirane u četiri regiona (L1, L2, L3, L4) po čemu se lakaze gljiva razlikuju od lakaza drugih organizama (Thurston, 1994; Kumar i dr., 2003; Morozova i dr., 2007). Na osnovu amino-kiselinskog sastava Rodríguez i dr. (2008) su lakaze Ascomycotina i Basidiomycotina svrstali u dve grupe.

Katalizuju dva tipa reakcija: (i) oksidaciju molekula supstrata do odgovarajućeg radikala pri njenoj direktnoj interakciji sa katalitičkim centrom enzima i (ii) oksidaciju molekula supstrata hemijskim medijatorima (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) ili 1-hidroksibenzotrijazol) koji zbog veličine ili visokog redukcionog potencijala ne može da prođe do aktivnog centra enzima (Riva, 2006; Canas i Camarero, 2010).

Lakaze se kod filamentoznih gljiva sintetišu u nekoliko izoformi a regulišu ih familije strukturno povezanih gena (4 - 12) koji kodiraju polipeptide od 520 do 550 amino-kiselina (Blaich i Esser, 1975; Chen i dr., 2003; Hoegger, 2006; Salony i dr., 2008; Janusz i dr., 2013). Kod vrsta roda *Pleurotus* na hromozomu VI prisutno je 11 ili 12 lakaznih gena koji se mogu izdvojiti u nekoliko genskih podfamilija (Sannia i dr., 1986; Palmieri i dr., 1993, 1997, 2003; Giardina i dr., 1999; Larraya i dr., 2000; Pezzella i dr., 2012; Castanera i dr., 2012). Pretpostavlja se da je do umnožavanja gena došlo zbog različitih funkcija enzima

(Morozova i dr., 2003). Geni koji kodiraju lakaze kod Ascomycotina imaju 1 - 6, a kod Basidiomycotina 8 - 13 introna koji se sastoje od 50 do 90 bp, izuzeci su *Neurospora crassa* koja ima samo jedan intron sa 57 bp i *Pleurotus ostreatus* gde je nađeno 19 introna dužine 47 - 64 bp (Germann i dr., 1988; Giardina i dr., 1995; Kiiskinen, 2004; Janusz i dr., 2013). Mada se kod većine vrsta introni karakterišu konzervativnim rasporedom, Janusz i dr. (2013) su zabeležili da su samo 4 pozicije 8 postojećih introna kod *Coprinus cinereus* raspoređenih na 16 pozicija unutar kodirajuće egzonske sekvence konzervativne. Ovi autori su takođe saopštili da iako se sa povećanjem broja introna povećava i broj mogućih kombinacija koje nastaju iskrajanjem introna do alternativnog povezivanja egzona gena za lakaze ne dolazi.

Smatra se da ovi geni imaju monofiletsko poreklo i da su evoluirali nezavisno kroz nekoliko duplikaciono-divergentnih događaja (Valderrama i dr., 2003). U prilog ovoj tezi govore rezultati filogenetskih studija Kilaru i dr. (2006) prema kojima blisko postavljeni lakazni geni pokazuju veću međusobnu sličnost u konzervativnoj poziciji introna, promotorskim i terminatorskim sekvencama kao i u amino-kiselinskom sastavu enzima. To su potvrdili rezultati Rodríguez i dr. (2008) i Uzan i dr. (2010) prema kojima je sličnost u amino-kiselinskim sekvencama lakaza, na nivou iste vrste, išla od svega 57% (*Pleurotus eryngii*) do čak 95% između izolata vrsta roda *Pycnoporus* sa različitih kontinenata. Međutim, i pored toga se izoforme lakaza mogu znatno razlikovati zbog post-translacionih modifikacija (Janusz i dr., 2013). Hoegger i dr. (2006) su istakli da filogenija lakaznih gena ne prati striktno filogeniju vrste, pa se postavlja pitanje da li su ovi geni evoluirali paralelno sa načinom života ili zbog nekog drugog nepoznatog faktora.

Činjenice da se sinteza lakaza može pospešiti različitim indukujućim supstancama i da ovi enzimi koriste O₂ kao finalni akceptor elektrona za razliku od peroksidaza koje zahtevaju kontinuirano prisustvo H₂O₂ daju im prednost u industrijskoj i *in situ* primeni, a zahvaljujući mogućnosti oksidacije određenih jedinjenja medijatorima mogu se koristiti i u procesima bioremedijacije (Baldrian, 2006).

1.2.4. Regulacija ekspresije gena za ligninolitičke enzime

Ekspresija gena koji kodiraju ligninolitičke enzime kod gljiva izazivača belog truljenja je diferencijalno regulisana i predstavlja odgovor na širok spektar sredinskih faktora, pre svega na izvore i koncentracije ugljenika i azota, prisustvo jona metala i ksenobiotika, temperaturni šok i dužinu dana (Ramirez i dr., 2010; Janusz i dr., 2013). Glavni razlog za diferencijalnu ekspresiju ovih gena je prisustvo velikog broja enzimskih izoformi različitih fizičko-hemijskih karakteristika i funkcija u toku životnog ciklusa gljiva (Bollag i Leonowicz, 1984; Rogalski i Leonowicz, 1992; Mansur i dr., 1998; Pezzela i dr., 2012). Molekularni mehanizmi regulacije su na nivou DNK transkripcije, translacije, reparacije i degradacije proteina (Janusz i dr., 2013).

Sinteza ligninolitičkih enzima se u najvećoj meri dešava u toku sekundarnog metabolizma, indukovana je nedostatkom pre svega ugljenika i azota kao stresnim stimulansom, a koncentracije ova dva elementa u supstratu utiču na nivoe enzimskih aktivnosti (Jeffries i dr., 1981; Kirk i Ferrell, 1987; Gold i Alic, 1993; Ronne, 1995; Galhaup i dr., 2002a). Transkripcija *lip* gena se dešava u slučaju kada je ugljenik slabo dostupan što je suprotno genima za MnP do čije ekspresije dolazi pre svega u uslovima nedostatka azota i prisustva Mn^{2+} (Bonnarme i dr., 1991; Gold i Alic, 1993). Boominathan i Reddy (1992) su pokazali da produkciji lignin- i Mn-oksidujućih peroksidaza kod *Phanerochaete chrysosporium* prethodi značajan porast koncentracije intracelularnog cikličnog adenzin monofosfata (cAMP) koji se inače sintetiše kada je nivo glukoze u ćeliji nizak. Kod filamentoznih gljiva CreA i MIG proteini pod uticajem glukoze vrše represiju ekspresije celulaza i ksilanaza što ukazuje na to da su oni regulatori produkcija svih enzima uključenih u razlaganje lignoceluloze (Ilmen i dr., 1996; Mach i dr., 1996; Strauss i dr., 1999; Suto i Tomita, 2001). U uslovima kada je količina hranljivih materija ograničena a koncentracija azota visoka kod jednih vrsta gljiva (*Ph. chrysosporium*) dolazi do smanjenja a kod drugih (*Pleurotus ostreatus* i *Trametes trogii*) do povećanja aktivnosti ligninolitičkih enzima (Leatham i Kirk, 1983; Hatvani i Mecs, 2002; Levin i dr., 2002, 2010). Međutim, postoje i takve vrste, kao što je *Dichomitus squalens*, kod kojih se MnP sintetišu kako pri niskim tako i pri visokim koncentracijama azota (Perie i Gold, 1991). Odnos između

prisutnog ugljenika i azota u supstratu (C/N) takođe može biti od značaja za indukciju enzimske aktivnosti. Tako kod nekih vrsta (*Agaricus blazei*, *Cerrena unicolor*, *Lentinus edodes*, *P. ostreatus*, *Ph. chrysosporium*) aktivnost stimulišu veće koncentracije ugljenika dok kod drugih (*Rhizoctonia praticola*) tu ulogu ima azot (Rothschild i dr., 1995; Janusz i dr., 2006, 2007; Agostini i dr., 2011). Sa druge strane, ekspresija gena za lakaze ne zavisi od nedostatka hranljivih materija u podlozi (Silva, 2013). Lakaze se kod većine Basidiomycotina sintetišu prve (Scheel i dr., 2000) a degradacioni produkti dalje po principu povratne sprege iznova indukuju ekspresiju njihovih gena kao i gena za druge ligninolitičke enzime (Smith i dr., 1998). Ekspresija lakaza može biti dodatno povećana u prisustvu induktora kao što je 2,5-ksilidin (C₈H₁₁N) (Silva, 2013).

Joni mangana i bakra indukuju ekspresiju gena koji kodiraju lakaze i Mn-oksidujuće peroksidaze (Collins i Dobson, 1997; Palmieri i dr., 2000; Rogalski i dr., 2006; Cordi i dr., 2007), a inhibiraju sintezu LiP iako ne deluju direktno na transkripciju njihovih gena (Bonnarme i Jeffries, 1990; Gold i Alic, 1993; Belinky i dr., 2006). Nasuprot LiP, Mn²⁺ je direktno uključen u regulaciju transkripcije *mnp* gena mehanizmima koji zavise od njegove koncentracije i koji su specifični za fazu životnog ciklusa, a imaju i važnu ulogu u post-transkripcionoj obradi tj. sekreciji aktivnih MnP (Brown i dr., 1991; Manubens i dr., 2003; Kamei i dr., 2008). Kako se ekspresija *mnp* gena istovremeno nalazi pod kontrolom i metal-vezujućeg elementa (MRE) koga aktiviraju Mn joni i ACE1 transkripcionog faktora koji vezuje Cu²⁺, Gettemy i dr. (1998) i Alvarez i dr. (2009) su istakli i da Cu joni imaju važnu ulogu u regulaciji sinteze Mn-oksidujućih peroksidaza. Međutim, i Ag²⁺, Cd²⁺ i Zn²⁺ značajno utiču na ekspresiju gena koji kodiraju MnP (Manubens i dr., 2003; Kamei i dr., 2008). Litvintseva i Henson (2002) su pokazali da Cu joni regulišu i sintezu lakaza posredstvom transkripcionog faktora ACE1 pošto kod pojedinih vrsta gljiva do ove indukcije dolazi i u odsustvu MRE.

Različiti ksenobiotici, kao što su etanol, jedinjenja arsena, 2,4-dihlorfenol, *N,N*-dimetilformamid ali i H₂O₂ i O₂, takođe mogu indukovati ekspresiju gena za lakaze i Mn-oksidujuće peroksidaze mehanizmom koji je na transkripcionom nivou regulisan vezujućim elementima za ksenobiotike (XRE) i antioksidativnim regulatornim elementima (ARE) koji se nalaze u promotorskom regionu ovih gena (Li i dr., 1995; Piscitelli i dr., 2011). I

temperaturni šok, u situaciji kada je količina azota u podlozi mala, može privremeno da indukuje transkripciju *mnp* i lakaznih gena, pošto postoje elementi temperaturnog šoka u promotorskom regionu ovih gena (Mayfield i dr., 1994). Brown i dr. (1993) i Wang i dr. (2012) su pokazali da temperatura od 45 °C može da predstavlja temperaturni šok koji dovodi do akumulacije iRNK koja odgovara sekvenci *mnp* gena čak i pri potpunom odsustvu Mn^{2+} u supstratu.

Pri nedostatku hranljivih materija, prisustvu teških metala i povišenoj temperaturi ključnu ulogu u regulaciji sinteze ligninolitičkih enzima ima ubikvitin/26S proteazom koji je uključen u visoko-selektivnu proteolizu (Jentsch, 1992; Staszczak, 2008). Male količine dostupnog ugljenika i azota stimulišu aktivnost proteazoma kod *Trametes versicolor* i *Phlebia radiata* i tako inhibiraju sintezu enzima (Staszczak i Jarosz-Wilkolazka, 2005; Staszczak, 2002, 2007), dok prisustvo Cd^{2+} kod *T. versicolor* inhibira njegovu aktivnost a stimuliše aktivnost lakaza (Staszczak i Jarosz-Wilkolazka, 2005).

Sa biotehnološkog aspekta poznavanje mehanizama regulacije ekspresije gena koji kodiraju ligninolitičke enzime ima veliku važnost s obzirom da odgovarajući tretman može da doprinese povećanju produkcije određenog enzima i nekoliko hiljada puta (Camarero i dr., 2012).

1.2.5. Uticaj uslova kultivacije na svojstva ligninolitičkih enzima

U odnosu na to da li je slobodna voda prisutna ili ne, mogu se razlikovati dva tipa kultivacije, tečna i čvrsta (Jain i dr., 2013). Pokazano je da je tečna kultivacija znatno pogodnija za bakterije zbog povećane potrebe za aktivnom vodom a čvrsta za filamentozne gljive i kvasce (Thomas i dr., 2013). Međutim, i pri čvrstoj kultivaciji supstrat poseduje određenu vlažnost kako bi metabolički procesi organizama mogli da se odvijaju normalno. Kao supstrat pri čvrstoj kultivaciji gljiva može se koristiti ili neka hemijski inertna supstanca (poliuretanska pena) čija je jedina uloga davanje fizičke potpore za rast i razvoj organizma ili neki izvor nutrijenata kao što je različiti biljni otpad. U aplikativnom smislu tečna fermentacija se u većoj meri koristi kada postoji potreba za dobijanje značajne količine polisaharida i sekundarnih metabolita koji se koriste u tečnom stanju, dok je za

produkciju enzima optimalna čvrsta fermentacija jer su uslovi najpribližniji onima na staništu, produkcija biomase je značajna a nivo proteolize smanjen (Pandey i dr., 1999; Viniegra-González, 2003; Barrios-González, 2012; Subramaniam i Vimala, 2012). Međutim, sinteza željenog produkta u velikoj meri zavisi i od fizičko-hemijskih svojstava supstrata ali i od njegovog pre-tretmana, pH, inicijalne vlažnosti, temperature i nivoa aeracije u toku inkubacije, količine i starosti inokuluma, kao i od prisustva dodatnih izvora nutrijenata i induktora i dr. (Pandey, 2003).

1.2.5.1. Izvori ugljenika i azota

Izvori ugljenika i azota, i pri čvrstoj i pri tečnoj kultivaciji, mogu da u zavisnosti od svojih fizičko-hemijskih svojstava kao i od vrste i soja gljive utiču u većoj ili manjoj meri na vrstu enzima koji se sintetiše i na nivo njegove aktivnosti (Mikiashvili i dr., 2005, 2006; Knežević i dr., 2011; Kenkebashvili i dr., 2012).

Kao izvor ugljenika gljive za svoje metaboličke procese mogu koristiti monosaharide (glukoza, fruktoza), disaharide (celobioza, maltoza, laktoza, saharoza), polisaharide (dekstrin, skrob, celuloza, hemiceluloza), polihidroksilne alkohole (glicerol, manitol), lignin i druga polifenolna jedinjenja (Mikiashvili i dr., 2005; Sati i Bisht, 2006; Sánchez, 2009). Dosadašnje studije su pokazale da sa aspekta produkcije ligninolitičkih enzima gljive iz podrazdela Basidiomycotina različito reaguju na izvor i koncentraciju ugljenika u medijumu (Galhaup i dr., 2002b; Elisashvili i dr., 2002, 2006; Mikiashvili i dr., 2005; Wang i dr., 2008). Wang i dr. (2008) su saopštili da se sa smanjenjem koncentracije prostih šećera, pre svega glukoze, u medijumu kod nekih vrsta povećava aktivnost ligninaza, dok su Mikiashvili i dr. (2005) pokazali da u pojedinim slučajevima prisustvo rastvorljivih šećera u poljoprivrednom otpadu inhibira sintezu MnP a indukuje produkciju lakaza.

Kako bi obezbedile azot za metaboličke procese gljive mogu da koriste različite neorganske (NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NaNO_3 , KNO_3) i organske (pepton, hidrolizat kazeina, goveđi ekstrakt) izvore (Mikiashvili i dr., 2006; Stajić i dr., 2010; Johnsy i Kaviyarasan, 2014; Prasher i Chauhan, 2015). Po istom principu kao i izvori ugljenika i različiti izvori azota u zavisnosti od hemijskih svojstava i koncentracije

mogu da indukuju ili suprimiraju sintezu ligninolitičkih enzima (Mester i Field, 1997; Gianfreda i dr., 1999; Galhaup i dr., 2002b). Najčešće je produkcija ligninolitičkih enzima stimulisana organskim izvorima azota, dok je neorganski izvori mogu u nekim slučajevima inhibirati (Mikiashvili i dr., 2006).

1.2.5.2. Mikroelementi

Pojedini mikroelementi su u malim količinama neophodni za normalno odvijanje metaboličkih procesa pošto se nalaze u aktivnom centru ili su kofaktori enzima, dok u većim koncentracijama mogu da suprimiraju micelijski rast, inhibiraju respiratorne procese i odložie enzimске reakcije i tako predstavljaju ozbiljan ograničavajući faktor sa aspekta korišćenja kontaminiranog supstrata (Baldrian i Gabriel, 2002; Baldrian 2003; Jellison i dr., 1997; Stajić i dr., 2006b; Knežević i dr., 2014). Brojna istraživanja su pokazala da Fe, Zn i Se mogu uticati kako na transkripciju gena za ligninolitičke enzime i post-transkripcionu obradu produkta tako i na pojavu oksidativnog stresa (Thiele, 1992; Faraco i dr., 2003; Catal i dr., 2008).

1.2.5.3. Jedinjenja male molekulske mase

Neka jedinjenja male molekulske mase (<900 Da) mogu stimulisati produkciju ligninolitičkih enzima ili skratiti vreme potrebno da se dostigle maksimum njihove aktivnosti što je našlo primenu u brojnim biotehnološkim procesima. Neke od ovih jedinjenja (veratril alkohol, oksalna kiselina, monomerna aromatična jedinjenja) mogu sintetisati same gljive u procesima sekundarnog metabolizma, dok se druga mogu ciljano dodavati medijumu (Elisashvili i Kachlishvili, 2009; Mäkelä, 2009). Mäkelä (2009) ističe da različita fenolna jedinjenja mogu biti supstrat u reakcijama oksido-redukcije a formirani slobodni radikali mogu oksidovati lignin. Neka od jedinjenja male molekulske mase mogu da stabilizuju reaktivne oksidanse nastale u reakcijama koje katalitizuju ligninolitički enzimi, a neka od njih se mogu u ovim reakcijama prevesti u formu katjonskih radikala sposobnih da difunduju u lignocelulozni supstrat i na taj način oksiduju lignin što je od

izuzetnog značaja naročito u inicijalnoj fazi razgradnje kada molekuli enzima zbog svoje veličine ne mogu da prodru u supstrat i dođu u direktan kontakt sa polifenolnim lancima (Evans i dr., 1994; Blanchette i dr., 1997; Goodell i dr., 1997). Aktivnost ligninolitičkih enzima mogu da indukuju *p*-anizidin, alifatični alkoholi, 2,5-ksilidin, gvajakol ($C_7H_8O_2$), 2,6-dimetoksifenol, 3,4-dimetoksibenzoeva kiselina, 3,5-dihidroksitoluen, 2,4,6-trinitrotoluen, vanilinska kiselina, katehol ($C_6H_6O_2$), vitamini i dr. (Galhaup i Haltrich, 2001; Elisashvili i Kachlishvili, 2009).

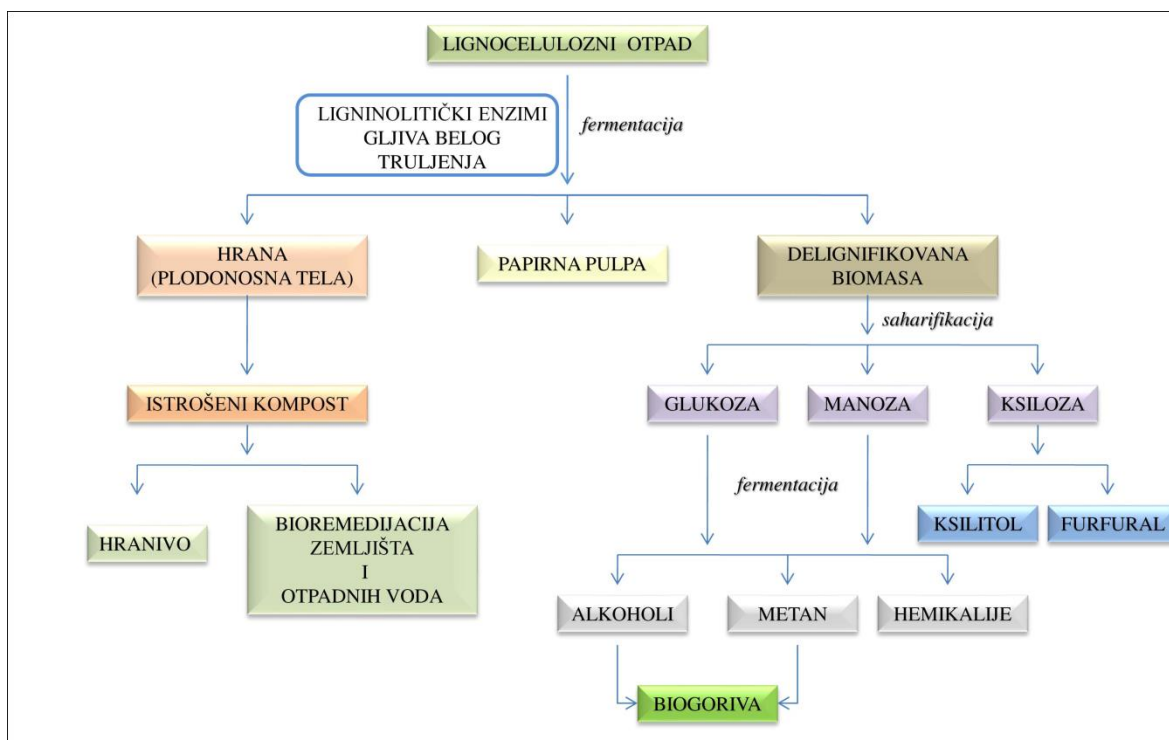
1.3. Primena ligninolitičkih enzima u biotehnologiji

Ligninolitičke enzime sintetišu i biljke i životinje ali sa aspekta primene u biotehnologiji bakterije i gljive predstavljaju njihove najvažnije producente (Niladevi i Prema, 2005). Mada vrste rodova *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* i *Bacillus* sintetišu znatne količine ovih enzima komercijalna produkcija je ograničena tek na nekoliko vrsta i sojeva (Ramachandra i dr., 1987; Pasti i dr., 1990; Givaudan i dr., 1993; Martins i dr., 2002; Arias i dr., 2003; Suzuki i dr., 2003; Niladevi i Prema, 2005; Yang i dr., 2006). Gljive se u najvećoj meri koriste kao producenti ligninolitičkih enzima jer u poređenju sa bakterijama daju znatno veće količine u odnosu na produkovanu biomasu (Nigam i Pandey, 2009). Svojstvo ovih enzima da razlažu različite fenolne i nefenolne komponente lignina je potencijal koji je našao primenu u različitim komercijalnim procesima (Niladevi, 2009). Ligninolitički enzimi imaju široku primenu u smanjenju zagađenja, naročito u tretmanu industrijskih otpadnih voda koje sadrže opasna hemijska jedinjenja kao što su boje, fenoli i drugi ksenobiotici. Lakaze se kao medijatori koriste za izbeljivanje papirne pulpe, ali i za stabilizaciju vina i voćnih sokova. Ovi enzimi se upotrebljavaju za pranje tkanina, u kozmetičkoj industriji i kao biosenzori (Aaslyng i dr., 1996; Call i Mücke, 1997; Minussi i dr., 2002; Ferry i Leech, 2005; Pazarlioglu i dr., 2005). Kao posledica povećane potražnje ligninolitičkih enzima u industriji javlja se potreba za njihovom jeftinom proizvodnjom. Različit lignocelulozni otpad može biti dobar supstrat za njihovu produkciju gljivama (Niladevi, 2009).

1.3.1. Konverzija poljoprivrednog otpada

Poljoprivredni otpad u najvećoj meri čine slama, mekinje, pulpa šećerne repe, kukuruzovina, uljane pogače, otpadni drveni materijal i dr. Uglavnom se ne koristi ni za ishranu ljudi i stoke ni u prerađivačkim industrijama i sa godišnjom proizvodnjom koja se procenjuje na $150 - 170 \times 10^9$ tona predstavlja balast u životnoj sredini (Pauly i Keegstra, 2008; Sarath i dr., 2008; Zhang, 2008). Međutim, poljoprivredni otpad može biti odličan resurs za proizvodnju hrane, hraniva, papirne pulpe, biogoriva i brojnih hemikalija, ali proces njegove obrade do fermentabilnih ugljenih hidrata zahteva složen i skup pre-tretman neophodan za uklanjanje lignina (Hadar, 2013). Danas se sve veća pažnja posvećuje korišćenju ovih lignoceluloznih ostataka kao lako dostupne, obnovljive i jeftine sirovine za proizvodnju alternativnih energenata, pre svega bioetanola, i različitih hemijskih jedinjenja kao što su organske kiseline, glicerol, polioli, metanol, etanol, itd. (Slika 7). Naročito se veliki značaj pridaje dobijanju bioetanola s obzirom da prema procenama Međunarodne agencije za energiju (IEA) 50% potreba čovečanstva za energijom u XXI veku može biti zadovoljeno iz biomase (Vandamme, 2009). Prema podacima Kim i Dale (2004) konverzijom poljoprivrednog otpada se godišnje može dobiti i do 1×10^9 L bioetanola čijom se upotrebom poboljšava kvalitet vazduha jer se smanjuje emisija gasova koji vode do efekta „staklene bašte“ (Mosier i dr., 2005). Iako se prva generacija bioetanola dobija fermentacijom useva, pre svega šećerne repe i kukuruza, koji se koriste i u ishrani, kompetitivni odnos „hrana-gorivo“ sve više postavlja zahtev da se nova generacija bioetanola dobija iz biljnog otpada prevođenjem celuloze u prostije šećere koji se zatim fermentišu u etanol (Lin i Tanaka, 2006; Alonso i dr., 2008; Balat i Balat, 2009; Kullander, 2010; Valentine i dr., 2012; Iqbal i dr., 2013). Međutim, taj proces zahteva određeni pre-tretman ovog lignoceluloznog otpada koji može biti hemijski, fizički ili biološki tj. enzimski, koji je i najprihvatljiviji sa aspekta održivog razvoja (Cardona i Sánchez, 2007; Chandra i dr., 2007; Yang i Wyman 2008; Yang i dr., 2011; Hamzeh i dr., 2013). Prednost fizičkih i hemijskih metoda pripreme lignoceluloznog materijala je kratko vreme neophodno da se dođe do produkta spremnog za saharifikaciju, dok su glavni nedostaci značajan utrošak energije i korišćenje hemikalija koje zagađuju životnu sredinu (Akhtar i

dr., 1998; Kang i dr., 2003). Zato se danas sve više pažnje posvećuje alternativnom tretmanu koji se bazira na kombinaciji fizičkih i hemijskih metoda sa korišćenjem gljiva bele truleži kojim se i pored značajnog utroška energije i upotrebe hemikalija može dobiti i do 20% veća iskoristljivost celuloze (Wan i Li, 2012).



Slika 7. Biokonverzija lignoceluloznog otpada u prisustvu gljiva bele truleži

Proces delignifikacije koji za rezultat ima veći stepen saharifikacije znatno je efikasniji kada se dešava u uslovima čvrste fermentacije a glavnu ulogu u tom procesu imaju peroksidaze, pre svega lignin peroksidaze (Pinto i dr., 2012). Međutim, glavni ograničavajući faktori čvrste fermentacije su odsustvo ili vrlo mala količina slobodne vode čime se u značajnoj meri ograničava transfer nutrijenata i enzima kao i slabija provodljivost čvrstog biljnog materijala zbog čega dolazi do formiranja temperaturnog gradijenta usled metaboličke aktivnosti gljiva (Wan i Li, 2012). Kako bi se temperatura ujednačila koriste se različiti tipovi reaktora koji mešaju supstrat, instalacione cevi ispunjene vodom ili se povećava vlažnost vazduha u samim reaktorima (Mitchell i dr., 2006).

Jedan od važnih faktora efikasne konverzije poljoprivrednog otpada je i odabir vrste pošto neke gljive lignin razlažu neselektivno a neke selektivno (Wan i Li, 2012). Gljive koje neselektivno razlažu lignin simultano razlažu i celulozu i hemicelulozu koje im procesom delignifikacije postaju dostupne. Na taj način u biljnom materijalu ostaju nedostupni ili teže razgradivi polisaharidi a gubitak holoceluloze se može kretati u opsegu od 17 do 50% čime se u znatnoj meri umanjuje prinos produkata procesa saharifikacije. Nasuprot njima, gljive koje su selektivni razlagači u znatno većoj meri razlažu lignin u odnosu na holocelulozu, s tim da je taj odnos specifičan za vrstu i soj.

S obzirom da se gljive karakterišu sporim rastom i da se njihovim korišćenjem u pretretmanu može izgubiti deo holoceluloze, brza delignifikacija lignoceluloznih ostataka se vrši direktnom upotrebom ligninolitičkih enzima (Palonen i Viikari, 2004; Ramos i dr., 2004; Tabka i dr., 2006; Wan i Li, 2012; Chandel i dr., 2013). Pokazano je da u tom procesu lakaze imaju sinergistički efekat na celulaze čime se dobija veći prinos glukoze i rešava problem paralelne degradacije holoceluloze koja se dešava u toku fermentacije gljivama (Rodrigues i dr., 2008).

1.3.1.1. Proizvodnja hrane

Produkcijom lignocelulolitičkih enzima gljive bele truleži ne samo da razlažu biljni otpad već i produkuju nutritivno visoko vrednu hranu, tj. plodonosna tela bogata proteinima, vlaknima, vitaminima, mineralima i brojnim biološki aktivnim jedinjenjima. Različiti lignocelulozni otpad iz poljoprivrede, šumarstva i prehrambene industrije se može koristiti za pripremu komposta za komercijalnu kultivaciju brojnih jestivih vrsta gljiva. Prema podacima Gupta i Verma (2015), u Evropi je 2010. godine produkcija ostataka žitarica kao i otpada iz proizvodnje šećerne repe i krtolastog povrća bila izuzetno visoka (55585×10^4 odnosno 5899×10^4 tona) a time i količina potencijalnog supstrata za kultivaciju makromiceta. Ako se ovome doda činjenica da se samo trećina svetske proizvodnje slame žitarica iskoristi u ove svrhe može se pretpostaviti potencijal za proizvodnju makromiceta. Zahvaljujući sintezi ligninolitičkih enzima posebno Mn-oksidišućih peroksidaza neke vrste mogu efikasno koristiti različite biljne ostatke (slamu,

piljevinu, pulpu šećerne trske, kukuruzovinu, otpad iz proizvodnje pamuka i dr.) bez bilo kakvog tretmana i obogaćivanja. Ginterová i Lazarová (1987) i Kuijk i dr. (2015) su saopštili da vrste roda *Pleurotus* imaju visoku biološku aktivnost (100 g suvog lignoceluloznog otpada mogu konvertovati u 50 do 70 g svežih plodonosnih tela za samo nekoliko nedelja) koja značajno može varirati u zavisnosti od sastava supstrata i soja gljive.

Ligninolitički enzimi, a prvenstveno lakaze, se mogu primeniti i u određenim procesima prerade hrane i pića kako bi se uklonila nepoželjna fenolna jedinjenja odgovorna za tamnjenje, pojavu zamućenja i taloga u voćnim sokovima, pivu i vinu i smanjili troškovi proizvodnje (Rodríguez i Toca, 2006). Mogu se koristiti i za geliranje pektina šećerne repe i u pekarstvu (Maciel i dr., 2010). Prilikom geliranja pektina, lakaze utiču na dodatno povezivanje pektinskih feruloil grupa u procesu oksidativnog sparivanja a dobijeni gel postaje termo-ireverzibilan pa se želatinozno stanje održava i prilikom zagrevanja namirnica, što je poželjan efekat u prehrambenoj industriji. Ovi procesi mogu biti katalizovani i peroksidazama ali je zbog neophodnosti kontinuiranog prisustva H_2O_2 poželjnije koristiti lakaze (Minussi i dr., 2002). Selinheimo i dr. (2006) su pokazali da lakaze koje proizvodi *Trametes hirsuta* zbog sposobnosti da povezuju biopolimere utiču na smanjenje rastegljivosti i povećanje otpornosti testa, poboljšavaju teksturu, aromu i izdašnost peciva. LiP i MnP mogu imati primenu u proizvodnji prirodnih aroma pošto pri degradaciji lignina metabolišu fenolne monomere (*p*-koniferil i *p*-sinapil alkohol) u isparljiva aromatska jedinjenja kao što su 1-okten-3-ol, vanilin, benzaldehid, fenilacetaldehid, 1-feniletanon i metil benzoat, ili u terpenoide kao što su citronelol ($C_{10}H_{20}O$) i linalool ($C_{10}H_{18}O$) (Abraham i Berger, 1994; Lomascolo i dr., 1999; Zorn i dr., 2003; Barbosa i dr., 2008).

1.3.1.2. Proizvodnja hraniva

Većina poljoprivrednog i industrijskog otpada koji se koristi za ishranu životinja je bogata slabo svarljivim vlaknima a siromašna nutrijentima, posebno proteinima i vitaminima. Pored proizvodnje nutritivno visoko vredne hrane, rezultat kultivacije makromiceta je i proizvodnja ogromne količine istrošenog supstrata koji može biti važna

komponenta hraniva. Micelija makromiceta je bogata proteinima, esencijalnim amino-kiselinama i hitinom i može biti važan izvor azota, dok β -glukani i drugi ekstra- i intracelularni polisaharidi mogu biti dodatni izvori glukoze i imunostimulatora (Reis i dr., 2012; Cheung, 2013). Kuijk i dr. (2015) su saopštili da se sadržaj proteina u pšeničnoj slami nakon kultivacije *Pleurotus ostreatus* može povećati za čak 89% što vodi prevazilaženju glavnog ograničavajućeg faktora korišćenja slame kao hraniva, tj. nedostatka azota. Proteini povećavaju i populaciju mikroorganizama u rumenu i na taj način svarljivost celuloze i hemiceluloze kao i oslobađanje energije. Istrošeni kompost je takođe bogat vitaminima, mineralima, antimikrobnim agensima, probioticima i drugim biološki aktivnim jedinjenjima koja modifikuju metabolizam životinja, poboljšavaju njihov rast i imunski sistem i povećavaju rezistentnost na različite bolesti (Enshasy i Hatti-Kaul, 2013).

Zahvaljujući dobro razvijenom ligninolitičkom enzimskom sistemu, posebno Mn-oksidujućih peroksidaza, makromicete mogu transformisati lignin u svarljiva jedinjenja što predstavlja još jedan njihov doprinos proizvodnji hraniva. I pored toga što preživari u rumenu imaju celulolitičke mikroorganizme koji mogu depolimerizovati celulozu i hemicelulozu iz biljnog ćelijskog zida, kovalentne ili etarske veze ovih polisaharida sa ligninom otežavaju njihovu svarljivost pod anaerobnim uslovima u rumenu. Rodrigues i dr. (2008) su pokazali da kultivacija različitih makromiceta bele truleži na pšeničnoj slami može povećati svarljivost lignina u rumenu za čak 13%. Istraživanja su takođe demonstrirala da je istrošeni kompost na bazi pšenične slame nakon kultivacije *Pleurotus ostreatus*, *P. sajor-caju* i *Ganoderma* sp., kao i onaj na bazi pirinčane slame nakon gajenja *Coprinus fimetarius* svarljiviji od biološki netretirane slame i ovce i koze ga rado koristile u ishrani za razliku od krava koje su uzimale hranivo sa maksimalno 17% istrošenog *P. ostreatus* supstrata (Calzada i dr., 1987; Adamović i dr., 1998; Rai i dr., 1989; Fazaeli i dr., 2006; Shrivastava i dr., 2012).

1.3.1.3. *Proizvodnja papirne pulpe*

S ciljem zaštite šuma, biljni ostaci koji se proizvode u ogromnim količinama ali ne koriste predstavljaju važan prirodni resurs za proizvodnju papira. Tradicionalni metod proizvodnje papirne pulpe koji se bazirao na korišćenju baznih sulfida se poslednjih nekoliko decenija zamenjuje alternativnim biološkim procesom u kome glavnu ulogu imaju gljive bele truleži ili njihovi enzimi zbog zaštite životne sredine, ekonomske opravdanosti i poboljšanog kvaliteta pulpe (Bajpai i dr., 2001). Yang i dr. (2008) su pokazali da se pre-tretmanom drvne mase eukaliptusa sa *Trametes hirsuta* može povećati jačina unutrašnjih veza u vlaknima za čak 32%, a Singh i Singh (2014) da ligninolitički enzimi gljiva, pre svega peroksidaze, jedno-elektronskom oksidacijom fenolnih grupa u molekulu lignina i stvaranjem fenoksi radikala na površini vlakana povećavaju adheziju. Pored povećanja jačine veza i adhezije, brojnim istraživanjima je pokazano da se pre-tretmanom drvne mase eukaliptusa sa *Phlebia radiata* i *Poria subvermispora*, odnosno bora i smrče sa *Bjerkandera* sp. i *Trametes versicolor* može ukloniti i do 90% sloja bogatog lipofilnim jedinjenjima (rezinom, masnim kiselinama i trigliceridima) i tako povećati kvalitet papira (Martínez-Iñogi i dr., 2001; Strebotnik i Hammel, 2000; Dorado i dr., 2001; Gutiérrez i dr., 2006; Van Beek i dr., 2007; Maciel i dr., 2010). Na taj način enzimski sistemi gljiva bele truleži, pre svega lakaze, igraju važnu ulogu i u procesu izbeljivanja papirne pulpe a time i u povećanju sjaja, jačine, indeksa čvrstoće i cepanja papira, zaštiti životne sredine i uštedi energije (Jimenez i dr., 1997; Bajpai i dr., 2001; Jerusik, 2010). Martínez-Iñogi i dr. (2001) su zabeležili da su lakaze ovih gljiva veoma efikasne i u uklanjanju slobodnih i esterifikovanih sitosterola koji dovode do pojave rupa u papiru što opet utiče na kvalitet.

1.3.1.4. *Proizvodnja biogoriva*

Intenzivna industrijalizacija ima za posledicu povećanje potrebe za gorivom. Danas se 80% potrebne energije dobija upotrebom fosilnih goriva što ima čitav niz štetnih efekata na životnu sredinu. Ako se tome doda brzo smanjenje njihovih izvora opravdani su pokušaji pronalaženja novih, alternativnih, obnovljivih i održivih izvora energije. Jedan od takvih

izvora su biogoriva i procenjuje se da će se 2020. godine 20% energije dobijati njihovim korišćenjem (Nigam i Singh, 2011). Biogoriva se dele u dve grupe, primarna (drvo, piljevina, peleti i dr.) i sekundarna koja nastaju tretmanom biomase (etanol, biodizel i dr.). Glavna prednost korišćenja biogoriva je široka distribucija održivih prirodnih bioresursa kao i manja emisija CO₂ i policikličnih aromatičnih ugljovodonika (Demirbas, 2009).

Mada su usevi bogati šećerom ili jedinjenjima koja se mogu konvertovati u šećere (skrob ili celuloza) sadašnji trend je razvoj tehnika za proizvodnju biogoriva iz korovskih biljaka koje brzo rastu (na primer trava *Miscanthus sinensis* 5 - 6 puta brže raste od žitarica) ili iz otpada iz prehrambene industrije kao što je otpad od južnog voća koji se samo u SAD proizvodi u godišnjoj količini od čak 800000 tona (Zechendorf, 1999; Tabka i dr., 2006). Međutim, da bi se celuloza razgradila do glukoze a ona dalje fermentisala do etanola neophodna je depolimerizacija lignina koji gradi rezistentnu mrežu oko celuloznih vlakana. Tako se opet dolazi do gljiva bele truleži i njihovih peroksidaza koje su glavni učesnici u prvoj fazi proizvodnje bioetanola. Pre-tretman lignoceluloznog otpada zavisi od vrste i soja gljiva, uslova kultivacije, produkcije i aktivnosti enzima i oksidativnih mehanizama (Dias i dr., 2010; Wan i Li, 2010; Salvachúa i dr., 2011). Dias i dr. (2010) i Salvachúa i dr. (2011) su saopštili da se vrste gljiva razlikuju po stepenu i načinu razgradnje lignoceluloze u toku čvrste fermentacije. Tako na primer delignifikacija pšenične slame može biti u opsegu od 2 do 65% u zavisnosti od vrste. Sa druge strane, nasuprot *Panus tigrinus* i *Phlebia radiata* koje istovremeno degraduju lignin i polisaharide, *Pleurotus eryngii* i *Phellinus robustus* selektivno i brže uklanjaju lignin. Međutim, stepen delignifikacije nije uvek u korelaciji sa produkcijom ligninolitičkih enzima kao i sa svarljivošću vlakana i produkcijom šećera što je pokazano na primeru *Ph. radiata* i *Ph. robustus* koji se karakterišu i visokom aktivnošću Mn-oksidujućih peroksidaza i efikasnim uklanjanjem lignina nasuprot *Bjerkandera adusta* i *Coriolopsis rigida* dobrim razlagačima lignina čiji su enzimi slabo aktivni.

U drugoj fazi produkcije bioetanola, tj. u enzimskoj hidrolizi celuloze i hemiceluloze, *Pycnoporus coccineus* je efikasan u degradaciji hemiceluloze (98%) ali veoma slab razlagač celuloze (31%), *Bjerkandera adusta* skoro podjednako depolimerizuje ove polimere (43% odnosno 54%), *Stereum hirsutum* značajno razlaže samo celulozu (43%),

dok se najveća količina glukoze dobija kultivacijom *Poria subvermispora* (69%) i *Irpex lacteus* (66%) a najmanja gajenjem *P. eryngii* i *Ph. robustus*.

1.3.2. Bioremedijacija

Upotreba odgovarajućih mikroorganizama na kontaminiranim lokalitetima pruža efikasan i ekonomski opravdan način uklanjanja različitih zagađivača. I bakterije i gljive mogu da razlažu brojna hemijska jedinjenja, ali dok ih bakterije razgrađuju intracelularno u procesima katalizovanim dioksigenazama gljive to rade ekstracelularno pod dejstvom ligninolitičkih enzima (Kästner i dr., 1994; Johnsen i dr., 2005; Haderlein i dr., 2006). Pored toga što razlažu lignin, zbog svoje nespecifičnosti i nestereoselektivnosti, ligninolitički enzimi mogu da razlažu i širok spektar aromatičnih i alifatičnih jedinjenja sličnih ligninu među kojima su različiti ksenobiotici koji su vrlo često ozbiljni zagađivači životne sredine (Tuomela i Hatakka, 2011). Procesi degradacije polutanata gljivama bele truleži katalizovani su peroksidazama, lakazama i drugim enzimima zaslužnim za produkciju slobodno-radikalnih grupa i H_2O_2 koji raskidaju C–C i C–O veze (Reddy i Mathew, 2001). Od kada su Bumpus i dr. (1985) pokazali da *Phanerochaete chrysosporium* može da razlaže širok spektar različitih jedinjenja koja se mogu smatrati zagađivačima, intenzivna su proučavanja mogućnosti korišćenja brojnih vrsta gljiva bele truleži u procesima bioremedijacije. Reddy i Mathew (2001) i Tigrini i dr. (2009) su saopštili da gljive bele truleži sinergističkim delovanjem ligninolitičkih enzima sa jedne strane i celulaza odnosno hemicelulaza sa druge strane mogu da razlažu različite policiklične aromatične ugljovodonike (PAH), dioksine, polihlorovane bifenile (PCB), hlorofenole, nitroaromatična jedinjenja, određene grupe boja, pesticide, BTEX jedinjenja (benzen, toluen, etilbenzen, ksileni), hlorobenzene, trihloretilen (TCE), linearne alkilbenzen sulfonate (LAS) i dr. Pored toga što poseduju sposobnost degradacije ksenobiotika, gljive imaju i niz drugih prednosti kao što su sposobnost kolonizacije zemljišta, mogućnost dugog preživljavanja u restrikcionim uslovima, kompetitivnost sa ostalim organizmima koji nastanjuju zemljište i otpornost na visoke koncentracije toksičnih i slabo rastvorljivih

hazardnih jedinjenja, koje se zasnivaju na njihovom ekstracelularnom razlaganju (Reddy i Mathew, 2001; Anastasi i dr., 2013).

Gljive bele truleži su se pokazale kao dobri prečišćivači otpadnih voda iz prehrambene i papirne industrije pošto imaju visoki kapacitet uklanjanja prisutnih polifenola. Tako se *Corioloropsis gallica* karakteriše značajnim potencijalom uklanjanja tanina poreklom iz industrije piva, vrste roda *Trametes* su efikasne u odstranjivanju otpada iz destilerija (vinaza), a lakaze *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus* i *T. versicolor* imaju značajnu ulogu u prečišćavanju i obezbojavanju otpadnih voda koje nastaju u procesima pravljenja maslinovog ulja, piva i drugih alkoholnih napitaka (Yague i dr., 2000; Minussi i dr., 2002). Takođe, lignin- i Mn-oksidujuće peroksidaze posebno *T. pubescens*, *Phanerochaete chrysosporium*, *P. ostreatus* i *Heterobasidion annosum* su visoko efikasne u degradaciji različitih rezistentnih fenolnih jedinjenja i boja prisutnih u otpadnim vodama papirne industrije (McMichel i dr., 1991; Choudhury i dr., 1998; Prasad i Gupta, 1997; Moreira i dr., 2003; González i dr., 2010; Zhang i dr., 2012). Ako se u obzir uzme činjenica da je za proizvodnju tone papira potrebno oko $45 - 227 \times 10^3$ L vode što za posledicu ima oslobađanje iste količine otpadnih voda i dalje nanošenje štete zooplanktonu i ribljem fondu, formiranje sluzi i pene i narušavanje životne sredine može se sagledati ogroman značaj gljiva bele truleži (Pokhrel i Viraraghavan, 2004).

Gljive braon truleži su najviše proučavane sa aspekta uklanjanja metala iz drvnog otpada zbog tolerancije na bakar i visokog nivoa produkcije oksalne kiseline, mada su se pokazale i kao dobri razlagači antibiotika, 2,4-dihlor fenola, dihlordifeniltrihlor etana (DDT) i PAH-ova (Martens i dr., 1996; Schlosser i dr., 2000; Andersson i dr., 2003; Purnomo i dr., 2008; Kim i dr., 2009).

Generalno, može se reći da je taksonomski, genetički i fiziološki diverzitet gljiva koje se potencijalno mogu koristiti u procesima bioremedijacije ogroman i svaka ekofiziološka grupa može direktno da učestvuje u razgradnji složenih organskih jedinjenja putem enzimskog katabolizma. Međutim, najveći broj dosadašnjih istraživanja je vršen u laboratorijskim uslovima pa je neophodno da se uzmu u obzir kompleksni i heterogeni odnosi koji vladaju u ekosistemima kako bi se formulisale efikasnije bioremedijacione strategije (Anastasi i dr., 2013).

1.4. Medicinski značaj vrsta roda *Trametes*

Najviše proučavana vrsta roda *Trametes* sa aspekta sinteze biološki aktivnih jedinjenja i njihovih efekata je *T. versicolor*. Dalekoistočni narodi koriste ovu vrstu već nekoliko hiljada godina u narodnoj medicini. U Kini je poznata pod nazivom Yun-Zhi (gljiva oblak) a u Japanu kao Kawaratake (gljiva sa obale reke) (Hobbs, 1995; Chu i dr., 2002; Wan, 2006). Prema delu „Metodika kineskih lekovitih biljaka“ (*Compendium of Chinese Materia Medica*) iz vremena dinastije Ming, u kineskoj medicinskoj praksi korišćena su suva i mlevena plodonosna tela više od 120 sojeva *T. versicolor* za pripremu čajeva, a smatralo se da pomažu pri uklanjanju toksičnih materija, da poboljšavaju imunitet, energetsko stanje i funkcionisanje jetre i slezine (Yang i dr., 1993; Ng, 1998; Chu i dr., 2002; Cui i Chisti, 2003). Ng (1998) je istakao da se pomenuti efekti naročito ispoljavaju pri dugotrajnoj upotrebi preparata dobijenih iz plodonosnih tela ove vrste. Danas se preparati dobijeni iz bazidiokarpa i micelije u konvencionalnoj medicini koriste pre svega u tretmanima nekoliko vrsta kancera ali i za lečenje hroničnog hepatitisa, reumatoidnog artritisa i infekcija respiratornog, urinarnog i digestivnog trakta, a određene supstance imaju i značajnu antivirusnu i antioksidativnu aktivnost (Hobbs, 1995; Ming, 1996; Sakagami i dr., 1993; Kobayashi i dr., 1995; Collins i Ng, 1997; Ng, 1998; Cui i Chisti, 2003; Lindequist i dr., 2005; Standish i dr., 2008; Wasser, 2010; Sheikh i dr., 2014).

1.4.1. Biološki aktivna jedinjenja

Gljive sve više privlače pažnju kao funkcionalna hrana i izvor biološki aktivnih jedinjenja (Chang, 1996; Wasser i Weis, 1999; Lindequist i dr., 2005). Približno 38% svih aktivnih jedinjenja izolovanih do 2005. godine je bilo poreklom iz gljiva a taj trend se do danas nije značajno promenio (Bérđy, 2005; Teles i dr., 2013). Jedna od prednosti gljiva u odnosu na biljke kao izvora bioaktivnih jedinjenja je ta što se plodonosna tela i micelija pod kontrolisanim uslovima mogu dobiti u znatnim količinama za relativno kratko vreme (Ferreira i dr., 2009a).

PSK (Krestin) je β -glukan-protein kompleks molekulske mase 94,0 kDa izolovan iz *T. versicolor* CM-101 (Zong i dr., 2012). Dobija se ekstrakcijom plodonosnih tela vrućom vodom uz dodatak amonijum sulfata (Cui i Chisti, 2003). Najveći deo ovog makromolekula čine lanci β -(1,3)-D-glukana sa po jednom β -(1,6)-glukopiranozidnom granom na svakih 5 monomera lanca dok proteinski deo čini 25 - 38% (Mantovani i dr., 2008). To je čvrsta supstanca, tamnobraon boje, rastvorljiva u vodi a nerastvorljiva u organskim rastvaračima. Sadrži fukozu po čemu se razlikuje od polisaharid-peptid kompleksa (PSP) koga takođe proizvodi ova vrsta. Proučavanja PSK su započela ranih 1970-ih godina u Japanu, a 1977. godine je u Japanu i Kini uveden u kliničku upotrebu kao pomoćno terapijsko sredstvo u lečenju kancera (Yang, 1997; Kidd, 2000; Fisher i Yang, 2002). Ovo jedinjenje ima imunostimulativnu aktivnost (indukuje produkciju interleukina-6, interferona, imunoglobulina-G, makrofaga i T-limfocita), imunosupresivni efekat pri hemoterapiji, zračenju i transfuziji krvi, inhibira proliferaciju različitih tumorskih linija stimulišući produkciju superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, poboljšava imunski sistem i funkcionisanje jetre, povećava apetit, ima umirujuće dejstvo i antimikrobnu aktivnost i podiže prag osetljivosti na bol (Cui i Chisti, 2003; Cheng i Leung, 2008).

PSP je takođe proteoglukan molekulske mase od približno 100,0 kDa izolovan iz *T. versicolor* Cov-1 (Zong i dr., 2012). Dobija se ekstrakcijom plodonosnih tela u vrućoj vodi dodavanjem alkohola (Cui i Chisti, 2003). Polisaharidnu komponentu čini pet monosaharida (galaktoza, glukoza, manoha, arabinoza i ksiloza) među kojima je glukoza najzastupljenija (Yang i dr., 1993; Ooi i Liu, 2000). PSP je čvrsta supstanca, svetlobraon boje, rastvorljiva u vodi a nerastvorljiva u organskim rastvaračima, koja ima imunomodulirajuću, antitumorsku, antimikrobnu, antivirusnu i analgetsku aktivnost (Collins i Ng, 1997; Cheng i Leung, 2008).

Fenolna jedinjenja su aromatična hidroksilovana jedinjenja sa jednim ili više aromatičnih prstenova koja se obično nalaze u voću i povrću, a mnoga od njih imaju značajna terapijska svojstva. Sve veći broj istraživanja potvrđuje da se ova jedinjenja mogu naći i u plodonosnim telima i miceliji gljiva i to najčešće u vidu fenolnih kiselina (hidroksibenzoeve i hidroksicinaminske kiseline) koje su derivati nefenolnih jedinjenja, benzoeve i cinaminske kiseline (Ferreira i dr., 2009a). Prekursori fenolnih jedinjenja gljiva

su intermedijeri puta šikimatske kiseline u kome se sintetišu fenilalanin, tirozin i triptofan (Cheung, 2008). Pokazano je da imaju antimikrobni, antioksidativni, citotoksični i genoprotektivni efekat (Osaki i dr., 1994; Harhaji i dr., 2008; Ferreirai dr., 2009a; Alves i dr., 2013).

Terpenoidi su široko rasprostranjena klasa organskih jedinjenja koja se izvode iz C_5 izoprenskih jedinica koje se mogu kombinovati na više načina. U odnosu na broj izoprenskih jedinica podeljeni su na: monoterpenoide (C_{10}), seskviterpenoide (C_{15}), diterpenoide (C_{20}), sesterterpenoide (C_{25}), triterpenoide (C_{30}) i karotenoide (C_{40}) (Hanson, 2008). Iako se najveći broj istraživanja bavio terpenoidima biljaka ova jedinjenja su važni sekundarni metaboliti gljiva. Terpenoidi gljiva imaju različite uloge pa tako mogu biti faktori virulencije, mikotoksini i hormoni. Neki od njih imaju antimikrobnu (pleuromutilin – $C_{22}H_{34}O_5$), citotoksičnu (iludini, izoveleral – $C_{15}H_{20}O_2$, antrocin) i antitumorsku (dehidroebrikonska i fomitelinska kiselina) aktivnost (Zaidman i dr., 2005; Wawrzyn i dr., 2012). Iako je poznato da se terpenoidi mogu naći u plodonosnim telima makromiceta, dosadašnje studije se nisu bavile njihovom karakterizacijom kod vrsta roda *Trametes*.

Koriolin ($C_{15}H_{20}O_5$) je seskviterpenoid rastvorljiv u metanolu, etanolu, etil acetatu i acetonu a slabo rastvorljiv u benzenu, ugljen-tetrahloridu i vodi. Prvi put je izolovan iz *Trametes consors* 1969. godine u Japanu. Inhibira rast Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija a gotovo da nema antifungalni efekat osim na *Candida utilis* (Takeuchi i dr., 1969).

Kateholi (1,2-dihidroksibenzeni) su organska bezbojna jedinjenja formule $C_6H_4(OH)_2$. Nastaju kao intermedijerni proizvodi u procesu degradacije aromatičnih jedinjenja i lignina. Grade stabilne komplekse sa di- i trivalentnim jonima metala i mogu da učestvuju u redoks reakcijama. Poseduju antioksidativni potencijal koji se ogleda u sprečavanju peroksidacije lipida, a mogu da deluju i kao pro-oksidansi na čemu se zasniva njihova genotoksična aktivnost. Imaju i antimikrobni efekat. U određenim koncentracijama su toksični za ljude i životinje pošto dovode do produkcije reaktivnih vrsta kiseonika u redoks reakcijama, oksidativnih oštećenja DNK molekula i proteina i poremećaja transporta elektrona na membrani (Schweigert i dr., 2001).

Cinaminska kiselina (3-fenil-2-propenska kiselina) je nezasićena karboksilna kiselina formule $C_9H_8O_2$. To je kristalno jedinjenje bele boje, mirisa meda, rastvorljivo u vodi i različitim organskim rastvaračima. Derivati ove kiseline imaju antibakterijsko, antifungalno i antitumorsko dejstvo (Ekmekcioglu i dr., 1998).

Askorbinska kiselina ((5*R*)-[(1*S*)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksifuran-2(5*H*)-on) ili vitamin C je organsko jedinjenje formule $C_6H_8O_6$, dobro rastvorljivo u vodi a slabije u organskim rastvaračima (etanol, propilen-glikol i glicerol). Neophodna je za normalno funkcionisanje organizma a određen broj životinja i čovek moraju da je unose putem hrane zbog nemogućnosti sinteze. Ima zaštitnu ulogu od različitih vidova oksidativnog stresa. Antioksidativna uloga se zasniva na sprečavanju peroksidacije lipida ćelijskih membrana neutralizacijom superoksid, hidroksil i peroksil radikala i singletnog kiseonika. Najveći stepen aktivnosti ostvaruje u sinergističkoj interakciji sa vitaminom E. Može se naći u plodonosnim telima različitih vrsta makromiceta uključujući i *T. versicolor* (Ferreira i dr., 2009a; Sheikh i dr., 2014).

Linolna kiselina (*cis*, *cis*-9,12-oktadekadienična kiselina) je polinezasićena omega-6 masna kiselina formule $C_{18}H_{32}O_2$, dobro rastvorljiva u vodi. Pripada grupi esencijalnih masnih kiselina i ljudski organizam ne može da je sintetise pa je neophodno njeno unošenje putem hrane. Ovoj supstanci i njenim konjugovanim izoformama, koje su izolovane iz *Trametes lactinea*, pripisuje se antitumorska, imunomodulatorna i genoprotektivna aktivnost (Osaki i dr., 1994; Aydin, 2005; Yahaya i Don, 2012).

1.4.2. Antimikrobna aktivnost

Makromicete su evolutivno razvile sposobnost sinteze različitih antibakterijskih i antifungalnih jedinjenja kako bi mogle da opstanu na svojim staništima (Yamaç i Bilgili, 2006). Nakon što je 1950. godine iz *Agrocybe molesta* (sin. *Agrocybe dura*) izolovan pleuromutilin, jedinjenje za koje je potvrđena antimikrobna aktivnost, mnogobrojne studije su pokazale da se jedinjenja sa ovim efektom prisutna kako u plodonosnim telima tako i u miceliji više od 2000 vrsta makromiceta (Kavanagh i dr., 1950; Hatvani, 2001; Rosa i dr., 2003; Gao i dr., 2005; Lindequist i dr., 2005; Sivaprakasam i dr., 2011). Međutim, nemaju

sve vrste makromiceta podjednako dobar antimikrobni kapacitet. Naime, ekstrakti nekih vrsta inhibiraju rast jedne ili više vrsta bakterija i/ili gljiva dok pojedini ekstrakti mogu da imaju i baktericidnu/fungicidnu aktivnost (Yamaç i Bilgili, 2006). Takođe je pokazano i da različiti sojevi iste vrste mogu da imaju značajno različit antimikrobni potencijal pa se aktivnost *a priori* ne treba pripisivati određenoj vrsti (Möller i dr., 1996; Suay i dr., 2000). Antimikrobni kapacitet ekstrakata zavisi od tipa i vrste rastvarača kao i temperature na kojoj se vrši ekstrakcija. Pokazano je da se na temperaturama višim od 60 °C aktivnosti ekstrakata smanjuju ili potpuno gube (Yamaç i Bilgili, 2006).

Vrste roda *Trametes* poseduju značajnu antimikrobnu aktivnost (Yamaç i Bilgili, 2006, Sivaprakasam i dr., 2011; Lukáš i dr., 2014; Pranitha i dr., 2014). Iako je za ekstrakte gljiva karakteristično da su efikasniji protiv Gram-pozitivnih bakterija, ekstrakti *T. versicolor* imaju visok potencijal i protiv Gram-negativnih bakterija (Yamaç i Bilgili, 2006). Nosioci antimikrobne aktivnosti kod vrsta ovog roda su PSK, koriolin, terpenoidi, hidrohlinoni, steroidi, nukleozidi i fenolna jedinjenja (Takeuchi i dr., 1969; Harada i dr., 1989; Stamets, 2002; Zjawiony, 2004; Karaman i dr., 2012).

1.4.3. Antioksidativna aktivnost

Reaktivne vrste kiseonika (superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($OH^{\cdot}$), lipid peroksid radikal ($LOO^{\cdot}$) i H_2O_2) se normalno produkuju kod svih organizama u aerobnim uslovima života, a najčešće kao sporedni proizvod određenih metaboličkih puteva koji su endogeno ili egzogeno kontrolisani (Jayakumar i dr., 2007; Lushchak, 2011). Ovi radikali nastaju u mitohondrijama, endoplazminom retikulumu, aktivnošću NADPH oksidaza, citohroma P450, ksantin dehidrogenaza, lipoksigenaza, ciklooksigenaza, faktora rasta i kao posledica inflamatornih procesa (Lykkesfeldt i Svendsten, 2007; Puddy i dr., 2008; Burton i Jauniaux, 2010). Najčešći egzogeni faktori koji vode nastanku slobodnih radikala su lekovi, toksični ksenobiotici i pesticidi, teški metali i metaloidi, PAH-ovi, duvanski dim i jonizujuće zračenje (Limon-Pacheco i Gonsebatt, 2009).

Reaktivne vrste kiseonika se neutrališu mehanizmima koji mogu biti enzimski (specifični) i neenzimski (nespecifični) (Burton i Jauniaux, 2010). Enzimski mehanizmi

odbrane uključuju aktivnost superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GR) (Fridovich, 1998; Ferreira i dr., 2009a), a neenzimski askorbinsku kiselinu (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutation i lipoinsku kiselinu (Lykkesfeldt i Svendsten, 2007). Čelijski mehanizmi kontrole produkcije i neutralizacije ovih radikala u normalnim uslovima uspevaju da održe njihovu koncentraciju na vrlo niskom nivou ($<10^{-8}$ M), ali pod određenim uslovima može doći do poremećaja tog balansa što vodi pojavi **oksidativnog stresa** (Halliwell i Gutteridge, 1989). Oksidativni stres prouzrokuje oštećenja makromolekula (DNK, proteina i lipida), ćelijsku smrt u procesima apoptoze i nekroze kao i strukturna oštećenja tkiva koja su u osnovi različitih patoloških stanja i starenja (Lykkesfeldt i Svendsten, 2007).

Brojne vrste makromiceta poseduju antioksidativni potencijal koji se u najvećoj meri pripisuje fenolnim jedinjenjima prisutnim kako u plodonosnim telima tako i u miceliji (Ferreira i dr., 2009a). Antioksidativni kapacitet zavisi od vrste, soja, uslova kultivacije, načina pripreme ekstrakata ili dobijanja drugih proizvoda kao i faze životnog ciklusa. Tako, ekstrakti dobijeni na umerenim temperaturama imaju veći antioksidativni kapacitet zbog bolje ekstraktabilnosti i generisanja novih jedinjenja sa antioksidativnim svojstvima, dok se na višim temperaturama količina antioksidanasa može značajno smanjiti zbog narušavanja strukture jedinjenja (Choi i dr., 2006; Barros i dr., 2007; Ferreira i dr., 2009a). Mnogobrojne studije su pokazale da različiti ekstrakti vrsta roda *Trametes* poseduju značajan antioksidativni potencijal u poređenju sa komercijalnim antioksidansima kao što su butil hidroksianizol (BHA), butil hidroksitoluen (BHT) i askorbinska kiselina (Mau i dr., 2002; Van Griensven i Wei, 2008; Karaman i dr., 2010; Johnsy i Kaviyarasana, 2011; Orhan i Üstün, 2011; Kozarski i dr., 2012; Kamiyama i dr., 2013; Sheikh i dr., 2014). Glavni nosioci antioksidativne aktivnosti u ekstraktima vrsta roda *Trametes* su fenolna jedinjenja (katehol, cinaminska kiselina) i β -glukani a u manjoj meri i askorbinska kiselina (Stajić i dr., 2013a; Sheikh i dr., 2014).

1.4.4. Genoprotektivna aktivnost

U poređenju sa drugim makromolekulima u organizmu DNK je najosetljiviji na oksidativni stres. Oštećenja molekula DNK u vidu nastanka širokog spektra lezija uključujući jednolančane i dvolančane prekide, mogu biti indukovana različitim genotoksičnim agensima kao što su reaktivne vrste kiseonika, pre svega H_2O_2 . Poznato je da ova oštećenja mogu da utiču na imunološki odgovor ne samo u slučaju inflamatornih procesa već i kod različitih oblika kancera (Gasser i Raulet, 2006; Menendez i dr., 2011). Iako je u pojedinim slučajevima zabeleženo da ekstrakti gljiva mogu imati slab mutageni potencijal u najvećem broju slučajeva pokazuju značajnu genoprotektivnu aktivnost (Bohi i dr., 2005). Ova aktivnost se bazira na smanjenju oksidativnih oštećenja DNK molekula i može imati važnu ulogu u prevenciji i tretmanu inflamacija i tumora. Međutim, do sada je urađeno svega nekoliko istraživanja koja su ovaj potencijal razmatrala kao mogući mehanizam delovanja različitih terapija (Menoli i dr., 2001; Oliveira i dr., 2002; Shi i dr., 2002, 2004; Bohi i dr., 2005). Pored polisaharida i fenolnih jedinjenja linolna kiselina predstavlja jednu od najvažnijih supstanci sa antimutagenim dejstvom (Osaki i dr., 1994). U osnovi genoprotektivne aktivnosti ekstrakata gljiva je hemijska i enzimska inaktivacija mutagenih supstanci, kao i stimulacija mehanizama reparacije DNK (Menoli i dr., 2001; Oliveira i dr., 2002). Kako bi se odredio genotoksični ili genoprotektivni potencijal različitih prirodnih proizvoda, uključujući i ekstrakte i jedinjenja gljiva, koristi se dobro razrađen Komet test visoke osetljivosti kojim se može utvrditi stepen DNK oštećenja (Anderson i dr., 1994; Fairbairn i dr., 1995; Henderson i dr., 1998).

1.4.5. Antitumorska aktivnost

In vitro i *in vivo* studijama je pokazano da brojne vrste makromiceta imaju antitumorsku aktivnost koja se pre svega bazira na sintezi polisaharida (Roupas i dr., 2012). Antitumorski potencijal vrsta roda *Trametes* je prvi put zabeležen 1965. godine. U osnovi ove aktivnosti nalazi se imunomodulirajući efekat polisaharida i njihovih kompleksa sa peptidima i proteinima kao i citotoksično dejstvo pojedinih jedinjenja (Kidd, 2000; Lau i

dr., 2004). PSK i PSP su dva antitumorska jedinjenja koja sintetiše *T. versicolor* (Standish i dr., 2008). Prekliničkim i kliničkim studijama je pokazano da PSP ima značajnu imunostimulativnu i citotoksičnu aktivnost kod pacijenata sa kancerom pluća, gastrointestinalnog trakta i dojke pošto aktivira T-ćelije i indukuje produkciju interferona- γ i interleukina-2 (Toi i dr., 1992; Iino i dr., 1995; Yokoe, 1997; Moradali i dr., 2007). Rezultati Fisher i Yang (2002) i Moradali i dr. (2007) su pokazali da PSK stimuliše produkciju faktora koji indukuju diferencijaciju makrofaga, aktivaciju polimorfonuklearnih leukocita (ćelija ubica i limfokin-aktiviranih ćelija ubica) i sintezu odgovarajućih citokina (transkripcionog faktora- α , interleukina-1, -6 i -8) a inhibiraju metaloproteinaze i druge enzime i faktore uključene u procese karcinogeneze i metastaze. Kasnije su Standish i dr. (2008) i Zong i dr. (2012) dokazali da je kombinacija radio- ili hemoterapije sa korišćenjem PSK efikasniji tretman pacijenata sa kancerom koji za rezultat ima produženje života. Međutim, Cui i Chisti (2003) su pokazali da antitumorski kapacitet PSK i PSP zavisi od vrste rastvarača koji se koristi za njihovu ekstrakciju. Tako za razliku od vruće vode i etanola, metanol nije pogodan za ekstrakciju ovih kompleksa.

Određen, nešto manji, antitumorski potencijal imaju i terpenoidi, pre svega triterpenoidi, čije je prisustvo potvrđeno u ekstraktima bazidiokarpa *T. gibbosa*, *T. orientalis* i *T. versicolor* i koji imaju sličan mehanizam dejstva kao i β -D-glukani (Gao i dr., 2003; Ren i dr., 2006; Moradali i dr., 2007; Harhaji i dr., 2008). Ova jedinjenja kao i polisaharid-peptid kompleksi, masne kiseline, steroidi, glikozidi i fenolna jedinjenja mogu i da inhibiraju proliferaciju različitih ćelijskih linija kancera zaustavljajući ćelijski ciklus i indukujući apoptozu i nekrozu (Lau i dr., 2004; Ren i dr., 2006; Harhaji i dr., 2008; Jiménez-Medina i dr., 2008; Hirahara i dr., 2012; Zong i dr., 2012).

1.4.6. Antineurodegenerativna aktivnost

Uprkos tome što etiologija nastanka neurodegenerativnih poremećaja, pre svega Alchajmerove i Parkinsonove bolesti, nije u potpunosti objašnjena poznato je da se u osnovi nalazi smanjeni nivo acetilholina odnosno dopamina (Terry i Masliah, 1991; Quik i Wonnacott, 2011; Orhan i dr., 2012). Enzim acetilholinesteraza (AChE) hidrolizuje

neurotransmitter acetilholin čime se zaustavlja sinaptička transmisija. Zbog toga se inhibitori AChE smatraju najefikasnijim agensima u tretmanu ovih poremećaja pošto smanjenjem aktivnosti ovog enzima pomažu da se obnovi nivo acetilholina u holineričnim sinapsama (Zhang i dr., 2015). Rezultati nekoliko istraživanja su pokazali da tirozinaze imaju ulogu u oksidaciji dopamina i produkciji neuromelanina koji se povezuje sa apoptozama neurona različitih regiona mozga odgovornih za razvoj Parkinsonove bolesti (Greggio i dr., 2005). S obzirom da su sintetički inhibitori AChE i tirozinaze skupi i imaju različita neželjena dejstva sve veća pažnja se posvećuje nalaženju prirodnih alternativnih izvora (John i dr., 2013). Istraživanja su pokazala da ekstrakti gljiva sadrže terpenoide i alkaloida koji imaju sposobnost vezivanja za aktivni centar ili periferna mesta vezivanja ovih enzima i tako ih inhibiraju (Houghton i dr., 2006; Orhan i Üstün, 2011; Patocka, 2012; Teles i Takahashi, 2013; Jamila i dr., 2015; Wu i dr., 2015; Zhang i dr., 2015). Zbog sinteze ovih nisko citotoksičnih jedinjenja, makromicete se mogu smatrati važnim izvorom potencijalnih antiholinesteraznih i antitirozinaznih agenasa i novih lekova za neurodegenerativne poremećaje (Patocka, 2012).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Na osnovu dosadašnjih znanja o produkciji ligninolitičkih enzima i degradaciji lignoceluloze u prisustvu vrsta roda *Trametes*, kao i o njihovim medicinskim svojstvima, postavljeni su sledeći ciljevi proučavanja:

- (i) Optimizacija uslova kultivacije *T. gibbosa* za produkciju i aktivnost Mn-oksidiujućih peroksidaza i lakaza i degradaciju odabranog biljnog otpada;
- (ii) Praćenje uticaja različitih kultivacionih faktora na profile izoformi Mn-oksidiujućih peroksidaza i lakaza *T. gibbosa*;
- (iii) Inter- i intraspecijska varijabilnost u svojstvima Mn-oksidiujućih peroksidaza i lakaza, kao i u nivou depolimerizacije lignoceluloznog otpada unutar roda *Trametes*;
- (iv) Određivanje antifungalnog, antioksidativnog, genoprotektivnog i citotoksičnog potencijala ekstrakata plodonosnih tela i micelije odabranih vrsta roda *Trametes*;
- (v) Utvrđivanje potencijala ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes* da inhibiraju aktivnosti acetilholinesteraze i tirozinaze.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Proučavane vrste i sojevi

Kulture proučavanih vrsta i sojeva roda *Trametes* izolovane su iz plodonosnih tela sakupljenih u Srbiji i Rusiji ili su dobijene iz kolekcije kultura Instituta za evoluciju Univerziteta u Haifi, Izrael (HAI) i čuvaju se na malt agar medijumu (MA) u kolekciji kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOFB) (Tabela 1).

Tabela 1. Proučavane vrste i sojevi roda *Trametes*

Naučno ime vrste	Oznaka soja	Poreklo soja
<i>Trametes gibbosa</i> (Pers.) Fr.	BEOFB 310	Srbija, Suva planina
	BEOFB 311	Srbija, Avala
<i>Trametes hirsuta</i> (Wulf.:Fr.) Pil.	BEOFB 30	Srbija, Novi Beograd
	BEOFB 301	Srbija, Suva planina
<i>Trametes multicolor</i> (Schaeff.) Jülich	HAI 426	Izrael, Nacionalni park Karmel planina
	HAI 540	KW, S. Reshetnikov (1570), 1999. Kol. Ukrajna, Kijev, Morkovzi
<i>Trametes pubescens</i> (Schum.:Fr.) Pil.	BEOFB 330	Rusija, Verhnjaja Kvažva
<i>Trametes suaveolens</i> (L.) Fr.	HAI 300	KW, A.S. Buchalo (197), 12/2000. Kol. Belorusija
<i>Trametes versicolor</i> (L.:Fr.) Lloyd	BEOFB 320	Srbija, Loznica, Iverak brdo
	BEOFB 321	Srbija, Suva planina
	BEOFB 322	Srbija, Avala

3.2. Priprema inokuluma

Priprema inokuluma se sastojala iz nekoliko faza: (i) inokulacija 100,0 mL sintetičkog medijuma (glukoza – 10,0 g/L; NH_4NO_3 – 2,0 g/L; K_2HPO_4 – 1,0 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,4 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/L; ekstrakt kvasca – 2,0 g/L; pH 6,5) sa 25 micelijskih diskova ($\varnothing$ 0,5 cm, sa 7 dana stare kulture na MA); (ii) inkubacija na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) na rotacionoj mućkalici (100 obrtaja u minuti) 7 dana; (iii) ispiranje dobijene biomase 3 puta sterilnom destilovanom vodom (dH_2O); (iv) homogenizacija biomase sa 100,0 mL sterilne dH_2O u laboratorijskom blenderu.

3.3. Karakterizacija Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza

3.3.1. Kultivacija i priprema ekstrakata

U cilju određivanja optimalnog tipa kultivacije i izvora ugljenika *T. gibbosa* BEOFB 310 je kultivisan pod čvrstim i tečnim uslovima na/u medijumu sa piljevinom bukve odnosno pšeničnom slamom kao izvorima ugljenika. Čvrsta kultivacija je vršena u 100-mL erlenmajerima na supstratu od 2,0 g odabranog biljnog otpada i 10,0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma (bez glukoze i sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ u predhodno definisanoj optimalnoj koncentraciji azota od 10 mM) na 25 °C. Tečna kultivacija je vršena u 250-mL erlenmajerima sa 5,0 g testiranog biljnog otpada i 50,0 mL modifikovanog sintetičkog medijuma, na rotacionoj mućkalici i sobnoj temperaturi. Suspenzija dobijena posle homogenizacije inokuluma je korišćena za inokulaciju medijuma (3,0 mL po erlenmajeru pri čvrstoj i 5,0 mL pri tečnoj fermentaciji odabranog lignoceluloznog otpada).

Dinamika aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze je praćena u toku 23 dana kultivacije *T. gibbosa* BEOFB 310 pod optimalnim uslovima.

Optimalni izvor i koncentracija azota određeni su obogaćivanjem modifikovanog sintetičkog medijuma (sa optimalnim biljnim otpadom kao izvorom ugljenika i bez azota) sa NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ili peptonom u koncentracijama od 10, 15, 20, 25, 30 i 40 mM za neorganske izvore azota odnosno 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 i 4,0% za pepton. Da li dodatni

izvor azota stimuliše aktivnosti testiranih enzima praćeno je mešanjem pšeničnih mekinja sa optimalnim izvorom ugljenika u odnosu 1:9, 2:8 i 3:7 i kultivacijom *T. gibbosa* BEOFB 310 pod ranije definisanim optimalnim uslovima.

Uticaj mikroelemenata na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze praćen je dodavanjem Mn, Cu, Zn ili Fe optimalnom medijumu u koncentracijama od 0,5; 1,0; 5,0 ili 10,0 mM i u formama $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Potencijal fenilmetansulfonil fluorida ($\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$), vanilinske kiseline ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$), gvajakola, galne kiseline ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$) i *p*-anizidina ($\text{C}_7\text{H}_9\text{NO}$) da indukuju enzimске aktivnosti testiran je njihovim dodavanjem optimalnom medijumu u koncentraciji od 1,0 mM, a efekat veratril alkohola dodavanjem u zapreminskom udelu od 0,5%, 72 sata nakon početka kultivacije *T. gibbosa*.

Medijum bez dodatnog izvora azota, mikroelemenata odnosno induktora korišćen je kao kontrola.

Inter- i intraspecijska varijabilnost u svojstvima studiranih ligninolitičkih enzima kao i u nivou razgradnje lignoceluloze utvrđena je kultivacijom proučavanih vrsta i sojeva roda *Trametes* pod uslovima definisanim kao optimalni za aktivnost ovih enzima kod *T. gibbosa*.

Ekstrakcija ligninolitičkih enzima vršena je dH₂O (50,0 mL) na magnetnoj mešalici i temperaturi od 4 °C u trajanju od 10 minuta. Tako dobijeni ekstrakti kao i sadržaj erlenmajera nakon tečne fermentacije su centrifugirani (4 °C, 3000 rpm, 15 min) a dobijeni supernatanti su korišćeni za određivanje aktivnosti enzima i ukupnog sadržaja proteina.

3.3.2. Određivanje aktivnosti proučavanih enzima

Aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze određivana je spektrofotometrijski (CECIL CE2501 (BioQuest)) i izražena u jedinici enzimске aktivnosti (U).

Aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza je određivana korišćenjem 3 mM fenol crvenog ($\epsilon_{610} = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kao supstrata u sukcinatnom puferu pH 4,5 (natrijumova so sukcinatne kiseline, albumin telećeg seruma (BSA) i DL-natrijumova so laktatne kiseline). Reakciona smeša ($V_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mL}$) je sadržala pufer, uzorak, 2 mM H₂O₂ i fenol crveno, sa ili bez 2 mM MnSO₄ (za MnP odnosno MnIP). Reakcija je zaustavljana dodavanjem 2 M

NaOH. Kao slepa proba je korišćena reakciona smeša s tom razlikom što se 2 M NaOH dadavao u smešu pre fenol crvenog.

Aktivnost lakaze je određivana praćenjem promene apsorbance na 436 nm uslovljene stopom oksidacije 50 mM rastvora ABTS ($\epsilon_{436} = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 6,0) na 35 °C. Reakciona smeša ($V_{\text{tot}} = 1,0 \text{ mL}$) je sadržala pufer, ABTS i uzorak. Kao slepa proba je korišćena reakciona smeša bez uzorka.

Enzimska aktivnost od 1 U je definisana kao količina enzima koja transformiše 1 μmol supstrata u minuti.

3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Sadržaj ukupnih proteina je određivan Bradfordovom metodom korišćenjem standardne krive dobijene iz rastvora koji su sadržali 100,0 μL BSA koncentracija 0,00; 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0 mg/mL i Bradfordov reagens (5,0 mL). Apsorbanca je merena nakon 5 min na talasnoj dužini od 595 nm. Reakciona smeša za određivanje sadržaja ukupnih proteina je sadržala Coomassie brilliant blue G-250 (CBB), uzorak i dH_2O (Bradford, 1976). Sadržaj ukupnih proteina predstavljen kao mg/mL korišćen je za određivanje specifične aktivnosti enzima (U/mg).

3.3.4. Elektroforeza

Profili izoformi Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *T. gibbosa* BEOFB 310 određivani su pri optimizaciji svih testiranih uslova kultivacije, kao i za sve ostale studirane vrste i sojeve kultivisane pod definisanim optimalnim uslovima. Enzimske izoforme i njihove izoelektrične tačke (pI) su određene izoelektričnim fokusiranjem (IEF) korišćenjem Mini IEF Cell-Model 111 (BIO-RAD). Fokusiranje je izvedeno na 7,5% poliakrilamidnom gelu sa 5% amfolitom pri pH gradijentu od 3,0 do 10,0, u tri faze: (i) na 100 V, 15 min; (ii) na 200 V, 15 min; (iii) na 450 V, 60 min. Korišćen je IEF marker čija je pI u opsegu pH od 3,6 do 9,3 (Sigma-Aldrich). Proteinske trake koje odgovaraju lakazama su locirane inkubiranjem gela u rastvoru za vizuelizaciju (10 mM ABTS i 200 mM fosfatni pufer pH

5,0) na sobnoj temperaturi. Lociranje proteinskih traka koje odgovaraju Mn-oksidujućim peroksidazama vršeno je u rastvoru za vizuelizaciju (4-hloro-1-naftol (0,1 mg/mL), 0,05 mM H₂O₂ i 0,1M natrijum acetatni pufer pH 4,5, sa ili bez MnSO₄ za MnP odnosno MnIP), na sobnoj temperaturi do pojave tamno braon obojenih traka. Nakon završenog fokusiranja gel je fiksiran u 12% trihlorsirćetnoj kiselini (TCA) a proteinske trake su detektovane bojenjem rastvorom 0,1% CBB R u fiksiru (metanol, sirćetna kiselina, H₂O u odnosu 45:10:45).

3.4. Određivanje sadržaja hemiceluloze, celuloze i lignina

3.4.1. Određivanje sadržaja hemiceluloze

Sadržaj hemiceluloze određivan je korišćenjem modifikovane Van Sestove metode (Goering i Van Soes, 1970; Van Soest i dr., 1991). Smeša usitnjenog suvog uzorka (1,0 g), rastvora neutralnog deterdženta (NDS) (EDTA – 18,6 g/L; SDS – 30,0 g/L; 2-etoksietanol – 10,0 mL; NaH₂PO₄ × H₂O – 4,56 g/L; Na₂B₄O₇ × 10H₂O – 6,81 g/L; pH 6,9 – 7,1), 0,5 g Na₂SO₃ i nekoliko kapi 1-oktanola je zagrevana do ključanja a zatim kuvana jedan sat u uslovima refleksije sa ciljem uklanjanja rastvorljivih šećera, proteina, pektina, lipida i vitamina iz uzorka. Nakon toga uzorak je filtriran, ispiran tri puta ključalom vodom i dva puta hladnim acetonom, sušen na 105 °C u trajanju od 8 sati i izmeren kao vlakna dobijena nakon tretmana neutralnim deterdžentom (NDF). Takvi uzorci su dalje tretirani rastvorom kiselog deterdženta (ADS) (CTAB – 20,0 g rastvoren u 1000,0 mL 0,5 M H₂SO₄; pH 6,9 - 7,1) radi uklanjanja hemiceluloze, zagrevani do ključanja, kuvani jedan sat u uslovima refleksije, filtrirani i ispirani ključalom vodom i više puta acetonom. Nakon nekoliko minuta na sobnoj temperaturi, kako bi aceton ispario, uzorak je sušen na 105 °C preko noći i izmeren. Masa vlakana dobijena nakon tretmana kiselim deterdžentom (ADF) je određivana gravimetrijski kao masa preostalog uzorka nakon ekstrakcije. Sadržaj hemiceluloze predstavljen je kao ADF - NDF.

3.4.2. Određivanje sadržaja celuloze i lignina

Vlakna dobijena nakon tretmana kiselim deterdžentom (ADF) su korišćena za određivanje sadržaja celuloze i lignina. Sadržaj lignina je određivan Klasonovom metodom ili 72%-tnom H_2SO_4 (Kirk i Obst, 1988). 1,0 mL 72% H_2SO_4 je dodavan na svakih 100,0 mg uzorka. Ova smeša je inkubirana na $30 \pm 0,5$ °C u vodenom kupatilu jedan sat uz povremeno mešanje i razblažena dodavanjem 28,0 mL vode za svaki 1,0 mL kiseline. Sekundarna hidroliza je vršena u autoklavu na 120 °C jedan sat nakon čega je rastvor filtriran kroz levak sa sinterovim staklom na Guč B4 boci a ostaci Klasonovog lignina su isprani ključalom vodom. Uzorak je sušen na 105 °C do konstantne mase a sadržaj lignina (LC) je izražen u procentima u odnosu na početni uzorak. Sadržaj celuloze predstavljen je kao ADF - LC.

3.5. Određivanje bioloških aktivnosti ekstrakata

Antifungalna, antioksidativna, genoprotektivna i citostatička aktivnost, kao i potencijal inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze i tirozinaze, tj. sprečavanja neurodegenerativnih promena, određivani su za ekstrakte plodonosnih tela i micelije tri vrste roda *Trametes*: *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321.

3.5.1. Kultivacija micelije

Tečna kultivacija je vršena u 1000-mL erlenmajerima sa 500,0 mL sintetičkog medijuma (glukoza – 65,0 g/L; NH_4NO_3 – 2,0 g/L; K_2HPO_4 – 1,0 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 0,4 g/L; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5 g/L; ekstrakt kvasca – 2,0 g/L; pH 6,5) inokulisanog sa 30 mL homogenizovanog inokuluma, na sobnoj temperaturi na rotacionoj mućkalici u trajanju od 21 dana.

3.5.2. Ekstrakcija

Suva micelija i plodonosna tela (3,0 g) su usitnjeni do praha u laboratorijskom blenderu. Ekstrakcija je vršena u 96% etanolu (90,0 mL) na magnetnoj mešalici u toku 72 sata. Dobijeni ekstrakti su ceđeni, centrifugirani (20 °C, 3000 obrtaja u minuti, 10 minuta), a supernatanti filtrirani kroz Whatmann No. 4 filter papir. Dobijeni filtrati su uparavani pomoću rotacionog vakuum uparivača (BÜCHI, Rotavapor, R-114, Switzerland) na 40 °C a dobijena suva masa je izmerena i rastvarana u 96% etanolu za testiranje antioksidativnog potencijala (Ćilerdžić i dr., 2014), u vodi za određivanje stepena oštećenja DNK (Barbisan i dr., 2003) odnosno u 5% dimetilsulfoksidu (DMSO) za testiranje antifungalne i citotoksične aktivnosti (Kosanić i dr., 2012) do koncentracije od 32,0 mg/mL.

3.5.3. Određivanje antifungalne aktivnosti

Antifungalni potencijal ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabrane tri vrste roda *Trametes* određen je za sledeće vrste mikromiceta: *Candida albicans* (BEOFB 811m), *C. krusei* (BEOFB 821m), *C. parapsilosis* (BEOFB 831m), *Aspergillus glaucus* (BEOFB 301m), *A. flavus* (BEOFB 221m) i *A. fumigatus* (BEOFB 232m). Kulture ovih vrsta se čuvaju na MA, na 4 °C u kolekciji kultura Instituta za botaniku Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.5.3.1. Priprema suspenzija spora

Testirane mikromicete su kultivisane na Saburo-dekstroznom agaru (SDA), na temperaturi od 37 °C u toku 21 dana. Suspenzije spora su pripremane ispiranjem površine agara sterilnim 0,9% rastvorom NaCl uz dodatak 0,1% Tween-a 80 (v/v). Dobijena suspenzija spora je proceđena kroz dvostruku sterilnu gazu, izmešana na vorteksu, a zatim je uz pomoć hemocitometra određivana brojnost spora koja je služila kao standard za određivanje broja spora spektrofotometrijski na 530 nm. Koncentracija suspenzije spora je sterilnim rastvorom NaCl podešena na 10⁶ CFU/mL (NCCLS, 1998).

3.5.3.2. Mikrodiluciona metoda

DMSO ekstrakti plodonosnih tela i micelije su filtrirani kroz Whatman No. 4 filter papir i sterilisani filtracijom kroz 0,2 µm membranski filter. Antifungalni potencijal ekstrakata određen je mikrodilucionom metodom korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 bunarčića (Sarker i dr., 2007). Analizirane su serije dvostrukih razblaženja ekstrakata (od 32,0 do 0,5 mg/mL). Svaki bunarčić je sadržao Saburo-dekstrozni bujon (SDB), suspenziju spora i ekstrakt određene koncentracije. Nakon 24 sata inkubacije na 37 °C dodato je po 10,0 µL resazurina (C₁₂H₇NO₄), oksido-redukcionog indikatora rasta mikromiceta, i kultivacija je nastavljena još 48 sati. Smeša bez ekstrakata je korišćena kao negativna kontrola, dok je pozitivna kontrola umesto ekstrakta sadržala komercijalni antimikotik, ketokonazol. Testirane koncentracije ketokonazola su bile u opsegu od 0,031 do 0,002 mg/mL (serija dvostrukih razblaženja). Efekat 5% DMSO na germinaciju spora je takođe analiziran njegovim dodavanjem u smešu umesto SDB. Najniža koncentracija ekstrakta bez vidljivog rasta micelije je definisana kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), a ona na kojoj nije bilo rasta ni posle reinokulacije 2,0 µL smeše na SDA kao minimalna fungicidna koncentracija (MFC) (Andrews, 2001).

3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativni potencijal testiranih ekstrakata odabranih vrsta roda *Trametes* određen je primenom nekoliko metoda sa ciljem utvrđivanja efikasnosti u hvatanju i neutralizaciji različitih slobodnih radikala.

3.5.4.1. DPPH test

Antioksidativna aktivnost je određivana merenjem stepena obezbojavanja ljubičasto obojenog metanolnog rastvora 2,2-difenil-2-pikril-hidrazil radikala (DPPH•) (Blois, 1958). Reakciona smeša (1800,0 µL 4% metanolnog rastvora DPPH• i 200,0 µL ekstrakta određene koncentracije) je inkubirana u mraku na rotacionoj mućkalici tokom 30 minuta

nakon čega je spektrofotometrijski (CECIL CE2501, U.K.) merena apsorbanca rastvora na 517 nm. Metanol je korišćen kao slepa proba, a 4% metanolni rastvor DPPH• kao negativna kontrola. Efekat neutralizacije radikala je određivan po formuli:

$$\text{DPPH}\bullet \text{ neutrališući efekat (\%)} = [(A_0 - A_{\text{uzorka}})/A_0] \times 100,$$

A_0 – apsorbanca negativne kontrole; A_{uzorka} – apsorbanca reakcione smeše.

EC₅₀ vrednost (mg ekstrakta/mL) je definisana kao efektivna koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% DPPH• radikala i dobija se linearnom regresionom analizom. Dobijene vrednosti su poređene sa komercijalnim antioksidansom, L-askorbinskom kiselinom.

3.5.4.2. ABTS test

Antioksidativna aktivnost je određivana merenjem stepena promene boje radnog rastvora ABTS (Miller i dr., 1993). Početni rastvor ABTS katjonskog radikala je pripreman 12 - 16 sati pre početka eksperimenta rastvaranjem 9,0 µg ABTS-a u 2,5 mL dH₂O i dodavanjem 44,0 µL 140 mM rastvora kalijum persulfata (K₂S₂O₈), a radni rastvor neposredno pre merenja razblaživanjem početnog rastvora destilovanom vodom do apsorbanca od 0,700 ± 0,020 na 734 nm. Reakciona smeša (1500,0 µL radnog rastvora ABTS-a i 15,0 µL ekstrakta koncentracije 1,0 mg/mL) je inkubirana na sobnoj temperaturi 4 minuta a promena apsorbanca u odnosu na radni rastvor je merena spektrofotometrijski na 734 nm. Kao slepa proba je korišćena dH₂O. Koncentracija ekstrakta potrebna da se dobije redukcija ABTS⁺ ekvivalentna redukciji askorbinskom kiselinom koncentracije 1,0 mg/mL (AAEC) određivana je korišćenjem jednačine kalibracione krive za askorbinsku kiselinu. EC₅₀ vrednost (mg ekstrakta/mL) je efektivna koncentracija ekstrakta koja uklanja 50% ABTS katjonskog radikala i dobija se linearnom regresionom analizom.

3.5.4.3. FRAP test

Antioksidativna aktivnost je određivana i merenjem stepena promene boje feri-tripiridiltriazin kompleksa (Fe (III)-TPTZ) pri redukciji do fero-tripiridiltriazin forme (Fe (II)-TPTZ) (Benzie i Strain, 1996). Rastvor FRAP reagensa (300 mM acetatni pufer (pH

3,6), 10 mM 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) rastvoren u 40 mM HCl, 20 mM $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$) je pripreman neposredno pre merenja i zagrevan na 37 °C. Apsorbanca reakcione smeše (3000,0 μL FRAP reagensa i 100,0 μL ekstrakta) je nakon 4 minuta inkubacije na 37 °C merena spektrofotometrijski na 593 nm. Uticaj ekstrakta je eliminisan korišćenjem vode a kao slepa proba je korišćen FRAP reagens. L-askorbinska kiselina je korišćena kao standard. Antioksidativna aktivnost je određivana korišćenjem jednačine kalibracione krive za $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Rezultati su predstavljani kao ekvivalent redukovanog Fe^{2+} i izraženi u mM.

3.5.4.4. Određivanje sadržaja fenola i flavonoida

Sadržaj rastvorenih fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodonosnih tela i micelije proučavanih vrsta je određivan korišćenjem Folin-Ciocalteu reagensa i galne kiseline kao standarda (Singleton i Rossi, 1965). Reakciona smeša (smeša 1000,0 μL 10% Folin-Ciocalteu reagensa i 200,0 μL uzorka koncentracije 1,0 mg/mL, inkubirana 6 minuta u mraku, nakon čega je dodato 800,0 μL Na_2CO_3) je inkubirana u mraku na rotacionoj mućkalici (100 obrtaja u minuti) i sobnoj temperaturi u toku 2 sata. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 740 nm. Smeša bez ekstrakta je korišćena kao slepa proba. Ukupna koncentracija fenolnih jedinjenja je predstavljana kao μg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po mg suvog ekstrakta korišćenjem jednačine kalibracione krive za GAE.

Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima je određivan metodom po Parku i dr. (1997). Reakciona smeša (1000,0 μL ekstrakta koncentracije 1,0 mg/mL, 4100,0 μL 80% etanola, 100,0 μL 10% $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$ i 100,0 μL 1 M vodenog rastvora kalijum acetata) je inkubirana u mraku na rotacionoj mućkalici i sobnoj temperaturi u toku 40 min nakon čega je merena apsorbanca na 415 nm. Smeša koja je sadržala etanol umesto ekstrakta korišćena je kao slepa proba. Ukupna koncentracija flavonoida je predstavljana kao μg ekvivalenta kvercetina – $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ (QE) po mg suvog ekstrakta korišćenjem jednačine kalibracione krive za QE.

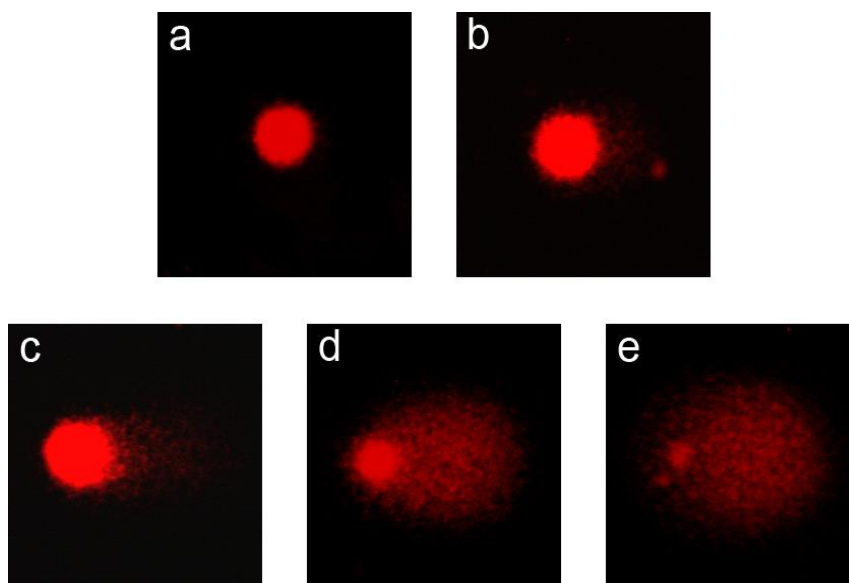
3.5.5. Određivanje stepena DNK oštećenja

Stepen oštećenja DNK molekula određivan je Komet testom (Singh i dr., 1988). Ovom metodom se mogu detektovati prekidi na DNK lancu pri čemu je stopa migracije DNK ostataka srazmerna stepenu DNK oštećenja. Za ispitivanje su korišćena jedra humanih leukocita periferne krvi zdravih ispitanika mlađih od 25 godina koji nisu bili pušači, alkoholičari, niti su bili pod bilo kakvom terapijom. Leukociti su tretirani ekstraktima koncentracije od 20,0 do 0,312 mg/mL (serija dvostrukih razblaženja). Dva nezavisna protokola, pre-tretman i post-tretman ekstraktima, su korišćena u cilju određivanja antigenotoksičnog potencijala ispitivanih ekstrakata. Čelije su u pre-tretmanu inkubirane sa ekstraktima određenih koncentracija na 37 °C u toku 30 min, nakon čega su ispirane u fosfatnom puferu a zatim tretirane sa H₂O₂ u toku 15 min. U post-tretmanu, ćelije su prvo tretirane sa H₂O₂ na ledu u toku 15 min, zatim isprane u fosfatnom puferu i tretirane ekstraktima određene koncentracije na 37 °C u toku 30 min. Nakon svakog tretmana ćelije su ispirane u fosfatnom puferu. Kao pozitivna kontrola korišćen je fosfatni pufer zagrevan na 37 °C 30 min a kao negativna kontrola 25 µM H₂O₂ nakon 15 min na ledu. Za testiranje je urađeno pet nezavisnih ponavljanja.

Nakon tretmana, pravljene su suspenzije uzoraka krvi (6,0 µL) u 0,67% agarози niske tačke topljenja (LMP) koje su nanošene na brušena stakla premazana 1% agarozom normalne tačke topljenja (NMP). Tako pripremljena stakla su prekrivana pokrovnim ljušpama i ostavljena na led u toku 5 min kako bi gel polimerizovao. Čelije su nakon toga tretirane ekstraktima ili H₂O₂, stakla su premazivana trećim slojem od 0,5% LMP i inkubirana na ledu u toku 5 min. Tako pripremljeni preparati su uronjeni u ohlađen pufer za liziranje (1% natrijum sarkozinat, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100 i 10% dimetil sulfoksid, pH 10,0; 4 °C) i inkubirani na 4 °C preko noći. Nakon lize ćelja preparati su uronjeni u pufer za denaturaciju (0,3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13,0) i inkubirani na 4 °C u toku 30 min. Elektroforeza je vršena u kadici sa puferom za denaturaciju, u jednosmernom strujnom polju jačine 300 mA i napona 19 V u toku 30 min. Neutralizacija je vršena ispiranjem u 0,4 M Tris-HCl puferu pH 7,5 u toku 5 min. Nakon tri ciklusa ispiranja preparati su bojeni rastvorom etidijum bromida,

koncentracije 20,0 µg/mL u toku 10 min. Analiza preparata izvršena je Olympus BX 50 mikroskopom (Olympus Optical Co., GmbH Hamburg, Germany) uz korišćenje fluorescentne svetlosti talasne dužine 510 - 560 nm.

DNK oštećenja su određivana po Andersonu i dr. (1994) koji su oštećene ćelije svrstali u pet kategorija u zavisnosti od količine DNK u repu komete: (a) neoštećene ćelije, <5%; (b) nizak stepen oštećenja, 5 - 20%; (c) srednji stepen oštećenja, 20 - 40%; (d) visok stepen oštećenja, 40 - 95%; (e) totalno oštećene ćelije (Slika 8). Za svakog donora i svaku pojedinačnu koncentraciju ekstrakta analizirano je 100 kometa (50 ćelija sa svake od 2 ponovljene pločice).



Slika 8. Klasifikacija stepena oštećenja DNK molekula na osnovu količine DNK u repu komete

3.5.6. Određivanje citotoksične aktivnosti

Za testiranje citotoksične aktivnosti ekstrakata korišćene su ćelijske linije humanog adenokarcinoma grlića materice (HeLa), humanog karcinoma debelog creva (LS174) i humanog adenokarcinoma pluća (A549), dobijene iz Kolekcije američkog centra kultura

(eng. *American Type Culture Collection*; ATCC). Ćelijske linije se čuvaju na preporučenom RPMI 1640 medijumu obogaćenom sa 100,0 g/L fetalnog goveđeg seruma inaktivisanog na 56 °C, 3 mM L-glutaminom, 100,0 mg/mL streptomicina, 100 IU/mL penicilina i 25 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonskom kiselinom (HEPES), pH 7,2 (podešena rastvorom bikarbonata). Ćelije su rasle u vlažnoj atmosferi sa 95% vazduha/5% CO₂ (v/v), na 37 °C.

3.5.6.1. Tretman ćelijskih linija

Rastvori ekstrakata (100,0 mg/mL), napravljeni u 50,0 g/L DMSO, su rastvarani u obogaćenom RPMI 1640 hranljivom medijumu do potrebnih radnih koncentracija. Inokulacija 100,0 µL medijuma po bunarčiću mikrotitracione ploče vršena je sa 2000 neoplastičnih HeLa ćelija, 7000 LS174 odnosno 5000 A549 ćelija. Za procenu potencijalnog selektivnog delovanja testiranih ekstrakata na ćelijske linije kancera korišćena je MRC5 ćelijska linija humanih fetalnih fibroblasta (5000 ćelija po bunarčiću). RPMI 1640 hranljivi medijum korišćen je kao slepa proba. Nakon 24 sata inkubacije i adhezije ćelija, u bunarčiće je dodato po 50,0 µL ekstrakta u koncentracijama od 200,0, 100,0, 50,0, 25,0 i 12,5 µg/mL, a u slepe probe i bunarčiće sa kontrolnim ćelijama po 50,0 µL svežeg hranljivog medijuma. Kulture ćelija su inkubirane 72 sata na 37 °C.

3.5.6.2. Određivanje stepena preživljavanja ćelija (MTT test)

Efekat ekstrakata na preživljavanje ćelijskih linija određivan je *Microculture Tetrazolium* testom (MTT test), tj. merenjem redukcije tetrazolijumske soli do nerastvorljivog ljubičasto obojenog formazana u živim ćelijama (Mosmann, 1983; Ohno i Abe, 1991). Nakon inkubacije od 72 sata u svaki bunarčić je dodato 20,0 µL rastvora MTT boje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid) rastvorene u fosfatnom puferu do koncentracije od 5,0 mg/mL. Uzorci su zatim inkubirani na 37 °C u sredini obogaćenoj sa 5% CO₂ u toku 4 sata nakon čega je dodato po 100,0 µL 10% natrijum dodecilsulfata (SDS) rastvorenog u 0,01 M HCl radi rastvaranja formazana. Stopa

inhibicije ćelijskog rasta određivana je nakon 24 sata pomoću ELISA čitača mikrotitracionih ploča na 575 nm, i izračunata prema formuli:

$$\text{Stopa inhibicije ćelijskog rasta (\%)} = (A_u - A_s) \times 100 / A_k - A_s,$$

A_u – apsorbanca uzoraka, A_s – apsorbanca slepe probe, A_k – apsorbanca kontrole.

IC₅₀ vrednost je definisana kao koncentracija ekstrakta koja inhibira preživljavanje ćelija za 50% u poređenju sa netretiranom kontrolom. Komercijalni citostatik, *cis*-diamindihlorplatina (*cis*-DDP), korišćen je kao pozitivna kontrola. Za svaku tačku merenja urađeno je po pet nezavisnih ponavljanja.

3.5.7. Određivanje potencijala prevencije i suzbijanja neurodegenerativnih promena

3.5.7.1. Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze

Stepen inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze (AChE) je određivan spektrofotometrijski korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 bunarčića metodom Elman i dr. (1961). Reakciona smeša (140,0 µL 0,1 mM natrijum fosfatnog pufera (pH 8,0), 20,0 µL 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoewe) kiseline (DTNB), 20,0 µL ekstrakta, 20,0 µL AChE) je inkubirana na 25 °C 15 min. Reakcija je inicirana dodavanjem 10,0 µL acetiltioholin jodida čija je hidroliza praćena promenom apsorpcije na 412 nm usled prevođenja DTNB u žuti 5-tio-2-nitrobenzoatni anjon (TNB²⁻) u reakciji katalizovanoj AChE-om 6 - 15 min nakon inicijacije. Kao slepa proba korišćena je smeša 5% DMSO i natrijum fosfatnog pufera (pH 8,0). Step en inhibicije AChE je određivan po formuli:

$$\text{Step en inhibicije aktivnosti AChE (\%)} = [(E - S)/E] \times 100$$

E – aktivnost enzima bez ekstrakta, S – aktivnost enzima sa ekstraktom.

Dobijene vrednosti su poređene sa komercijalnim inhibitorom AChE, galantaminom.

3.5.7.2. Inhibicija aktivnosti tirozinaze

Step en inhibicije aktivnosti tirozinaze je određivan spektrofotometrijski korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 bunarčića metodom Likhitwitayawuid i Sritularak (2001).

Reakciona smeša (80,0 μ L 66,7 mM fosfatnog pufera (pH 6,8), 40,0 μ L ekstrakta rastvorenog u 5% DMSO, 40,0 μ L tirozinaze (46 U/L) rastvorene u fosfatnom puferu) je inkubirana na 23 °C u toku 10 min nakon čega je dodato 40,0 μ L 2,5 mM L-DOPA. Apsorbanca je merena na 475 nm. Step en inhibicije aktivnosti tirozinaze je određivan po formuli:

$$\text{Step en inhibicije aktivnosti tirozinaze (\%)} = [((A - B) - (C - D)) / (A - B)] \times 100$$

A – apsorbanca tirozinaze u fosfatnom puferu, B – apsorbanca fosfatnog pufera, C – apsorbanca reakcione smeše, D – apsorbanca ekstrakta u fosfatnom puferu.

Dobijene vrednosti su poređene sa komercijalnim inhibitorom tirozinaze, kojičnom kiselinom (C₆H₆O₄).

3.6. Statistička analiza

Svi eksperimenti postavljeni su u pet replika. Deskriptivna statistika rezultata izražena je kao srednja aritmetička vrednost $\pm$ standardna greška merenja. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) i Tukijev HSD post-hoc test su urađeni radi testiranja značajnih razlika između srednjih vrednosti. Statistički značajnim razlikama su smatrane one pri $P < 0,01$.

Inter- i intraspecijska varijabilnost u nivou razgradnje lignina i efikasnosti ligninolize objašnjeni su generalizovanim linearnim modelima (GLM). Za meru efikasnosti ligninolize eksperimentalnih grupa svih sojeva uzeta je razlika između vrednosti procenta razgrađenog lignina i procenta razgrađene celuloze. Pun GLM model sadržao je kao eksploratorne varijable soj, tretman i aktivnost ligninolitičkih enzima, kao i interakcije svih ovih faktora. Backward selekcijom (selekcijom unazad) pomoću vrednosti Akaike informacionog kriterijuma (AIC) određen je minimalni model koji najbolje objašnjava varijabilnost procenta razgradnje i efikasnosti ligninolize.

Podaci dobijeni Komet testom analizirani su χ^2 testom.

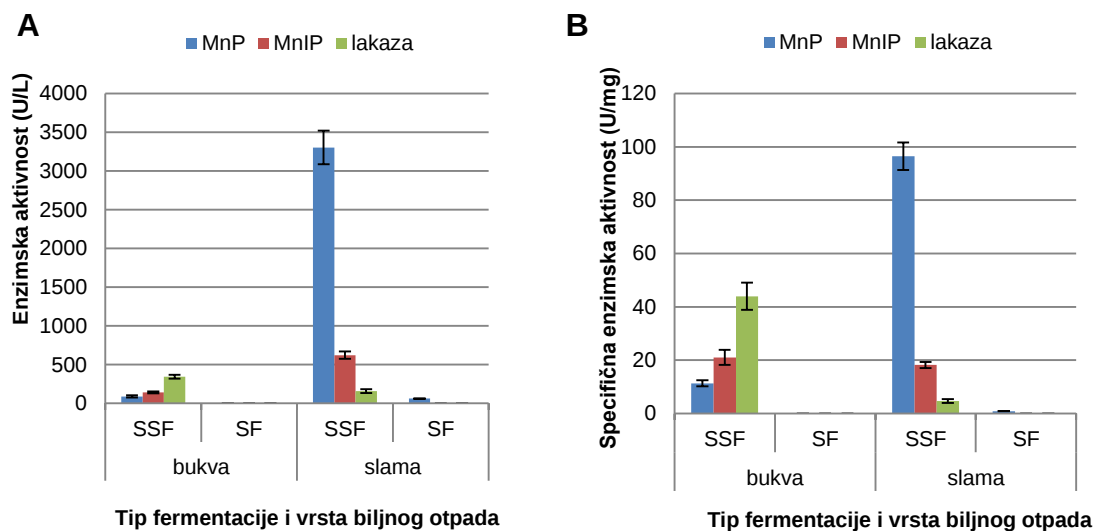
Sve statističke analize urađene su korišćenjem softvera STATISTICA, verzija 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA) i programskog okruženja R, verzija 3.2.0 (R Core Team, 2014).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimizacija uslova kultivacije za produkciju i aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa*

4.1.1. Efekat tipa fermentacije i vrste biljnog otpada

Aktivnost MnP, MnIP i lakaza je detektovana nakon sedmodnevne tečne i čvrste fermentacije piljevine bukve i pšenične slame sa *Trametes gibbosa* BEOFB 310. Međutim, čvrsta fermentacija korišćenog biljnog otpada je bila optimalna za produkciju i aktivnost analiziranih enzima, dok je pri tečnoj kultivaciji *T. gibbosa* bila detektovana samo neznatna MnP aktivnost ($61,9 \pm 3,3$ U/L) u medijumu sa slamom kao izvorom ugljenika (Grafik 1A)

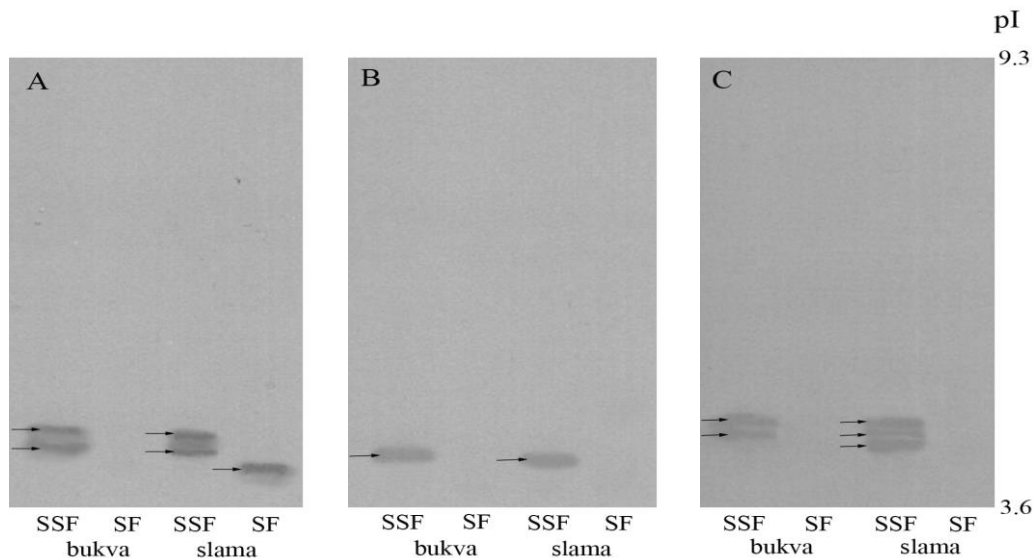


Grafik 1. Uticaj tipa kultivacije i vrste biljnog otpada na apsolutnu (A) i specifičnu (B) aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa* BEOFB 310

U uslovima čvrste kultivacije *T. gibbosa*, pšenična slama se pokazala kao bolji izvor ugljenika za aktivnost MnP ($3303,1 \pm 216,1$ U/L) i MnIP ($623,1 \pm 46,4$ U/L), a bukva za aktivnost lakaza ($354,1 \pm 23,7$ U/L). Specifične aktivnosti MnP i lakaza su potvrdile trend njihovih apsolutnih aktivnosti pri oba tipa kultivacije na testiranim biljnim otpadima, dok u

slučaju MnIP značajna razlika između specifičnih aktivnosti dobijenih u toku čvrste fermentacije bukve i slame nije zabeležena (Grafik 1B).

Rezultati dobijeni izoelektričnim fokusiranjem su u potpunosti podržali rezultate dobijene određivanjem aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza. Naime, pokazano je da je *T. gibbosa* pri čvrstoj fermentaciji oba testirana biljna otpada sintetisao po dve izoforme MnP istih pI (4,4 i 4,6) i po jednu MnIP sa pI 4,2. Pri tačnoj kultivaciji u medijumu sa piljevinom bukve kao izvorom ugljenika ova vrsta nije produkovala Mn-oksidujuće peroksidaze dok je pri istom tipu fermentacije pšenične slame zabeležena jedna izoforma MnP sa pI 4,1 (Slika 9A, B). Kada su u pitanju lakaze, 3 izoforme (pI 4,4, 4,5 i 4,6) su detektovane u ekstraktima dobijenim nakon sedmodnevne čvrste fermentacije slame, 2 (pI 4,5 i 4,6) nakon čvrste kultivacije na piljevini bukve, dok pri uslovima tečne fermentacije oba otpada lakaze nisu detektovane (Slika 9C). S obzirom da se veći broj izoformi lakaze sintetisao u toku čvrste kultivacije na slami a da je nivo aktivnosti enzima bio viši prilikom čvrste fermentacije piljevine bukve može se zaključiti da nivo enzimske aktivnosti nije zavisio od broja izoformi ovog enzima.



Slika 9. IEF profili Mn-zavisnih peroksidaza (**A**), Mn-nezavisnih peroksidaza (**B**) i lakaza (**C**) kod *Trametes gibbosa* BEOFB 310 u zavisnosti od tipa kultivacije i vrste biljnog otpada

Nakon 7 dana čvrste i tečne fermentacije piljevine bukve i pšenične slame sa *T. gibbosa* BEOFB 310 zabeležena je promena sadržaja hemiceluloze, celuloze i lignina (Tabela 2). Stepenn degradacije lignina bio je u saglasnosti sa nivoom aktivnosti testiranih ligninolitičkih enzima, tj. bio je znatno viši pri čvrstoj kultivaciji vrste. Najviši nivoi delignifikacije ($10,9 \pm 0,2\%$) kao i depolimerizacije hemiceluloze i celuloze ($10,5 \pm 0,3\%$ odnosno $7,9 \pm 0,2\%$) zabeleženi su pri čvrstoj fermentaciji slame kada su dobijene i maksimalne aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza. Pod uslovima čvrste fermentacije bukve stepenn razgradnje lignina je bio znatno manji ($3,9 \pm 0,1\%$) iako je aktivnost lakaza bila veća, dok je u toku tečne fermentacije ovog otpada *T. gibbosa* degradovao svega $1,0 \pm 0,0\%$ lignina (Tabela 2).

Tabela 2. Uticaj tipa kultivacije na kapacitet *Trametes gibbosa* BEOFB 310 da razlaže piljevinu bukve i pšeničnu slamu

Uzorak	Tip fermentacije	Masa uzorka [mg]	Sadržaj polimera u uzorku [mg]			Nivo razgradnje [%]		
			Hemiceluloza	Celuloza	Lignin	Hemiceluloza	Celuloza	Lignin
Bukva (kontrola)	-	2000,0	$552,0 \pm 9,2$	$886,0 \pm 3,5$	$460,0 \pm 3,1$	-	-	-
Slama (kontrola)	-	2000,0	$590,6 \pm 4,7$	$710,0 \pm 5,5$	$193,4 \pm 3,0$	-	-	-
Bukva	čvrsta	$1965,0 \pm 10,2$	$540,4 \pm 3,3$	$866,6 \pm 5,0$	$442,1 \pm 3,3$	$2,1 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
	tečna	$1988,0 \pm 17,9$	$550,7 \pm 4,1$	$876,7 \pm 4,9$	$455,3 \pm 2,2$	$0,2 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,0$
Slama	čvrsta	$1874,0 \pm 15,3$	$528,5 \pm 4,0$	$654,0 \pm 4,2$	$172,4 \pm 3,0$	$10,5 \pm 0,3$	$7,9 \pm 0,2$	$10,9 \pm 0,2$
	tečna	$1943,0 \pm 15,8$	$575,1 \pm 3,7$	$678,1 \pm 4,5$	$186,5 \pm 2,6$	$2,6 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$

Kako su istakli Wan i Li (2010) produkcija ligninolitičkih enzima i efikasnost procesa delignifikacije zavise od organizma, uslova kultivacije i oksidativnog mehanizma. Rezultati dobijeni za *T. gibbosa* BEOFB 310 su potvrdili da su uslovi čvrste kultivacije optimalni za produkciju i aktivnost ligninolitičkih enzima što su ranije saopštili Viniegra-González i dr. (2003) i Barrios-González (2012). Ovi autori su to objasnili boljom dostupnošću kiseonika neophodnog za metaboličke procese filamentoznih gljiva, većom produktivnošću biomase i manjim nivoom proteolize, generalno velikom sličnošću sa uslovima koji postoje na

prirodnim staništima. U toku tečne kultivacije pojedini enzimi se ne produkuju a oni koji se sintetišu se značajno razlikuju od formi dobijenih pri čvrstoj kultivaciji, pre svega imaju različite pI vrednosti što su Acuña-Argüelles i dr. (1995) i Hölker i Lenz (2005) objasnili diferencijalnom ekspresijom gena koji ih kodiraju. Sinteza Mn-oksidujućih peroksidaza čije su se pI vrednosti nalazile u opsegu od 4,4 do 4,6 je potvrdila rezultate Knežević i dr. (2013a) da se vrste roda *Trametes* karakterišu produkcijom nešto kiselijskih peroksidaza.

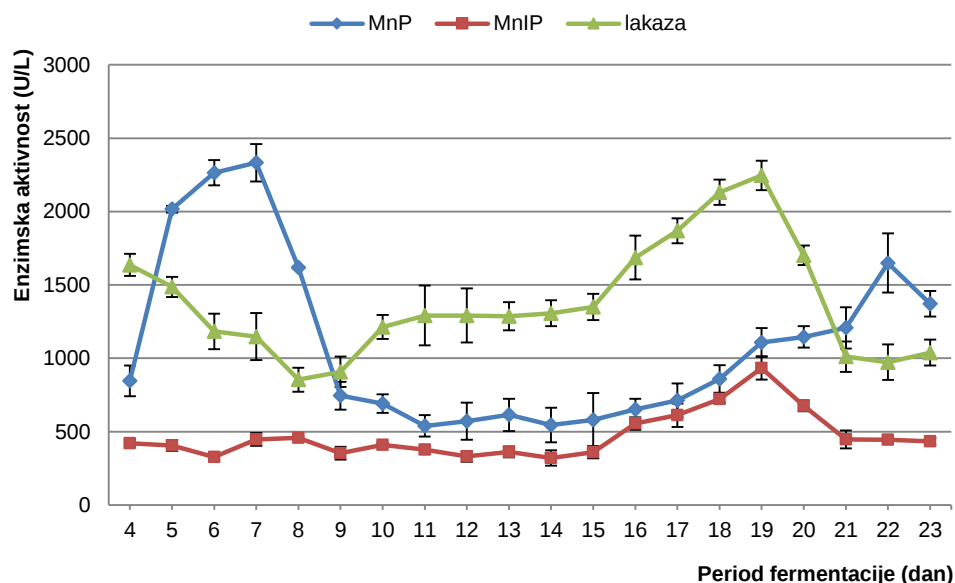
U ranijim istraživanjima je pokazano da su pšenična slama i piljevina bukve dobri supstrati za rast vrsta roda *Trametes* i produkciju ligninolitičkih enzima, kao i da doprinos Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza u delignifikaciji varira u zavisnosti od nivoa njihove aktivnosti (Schlosser i dr., 1997; Lekounougou i dr., 2008; Knežević i dr., 2013a). Kako su istakli Gómez i dr. (2012) profili enzimskih aktivnosti u toku fermentacije različitog biljnog materijala su u najvećoj meri zavisni od fizičko-hemijskih karakteristika supstrata, ali i od biologije vrste. Veći nivo lakazne aktivnosti u odnosu na Mn-oksidujuće peroksidaze nakon čvrste kultivacije *T. gibbosa* na piljevini bukve je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Schlosser i dr. (1997) i Knežević i dr. (2013a) za različite sojeve *T. versicolor*. Značajne razlike u sadržaju lignina, azota i Cu^{2+} u pšeničnoj slami (9,7%, 0,53% i 5,9 ppm) i bukvi (23,0%, 0,71% i 11,74 ppm) su uslovile drugačije profile enzimskih aktivnosti u toku njihove čvrste fermentacije sa *T. gibbosa*. Dvostruko veća koncentracija bakra u bukvi u odnosu na slamu je svakako jedan od razloga veće aktivnosti lakaza na ovom supstratu. Takođe, Schlosser i dr. (1997) ističu da različita jedinjenja male molekulske mase kao i fenolna jedinjenja rastvorljiva u vodi kojima je piljevina bukve bogata u značajnoj meri mogu da indukuju aktivnost lakaza. Međutim, niži nivo degradacije lignina bukve ukazuje da je učešće lakaza u delignifikaciji drvnog materijala mnogo manje za razliku od Mn-oksidujućih peroksidaza koje imaju esencijalnu ulogu u ovom procesu. Kako su istakli Knežević i dr. (2013a) doprinos lakaza depolimerizaciji lignina je značajniji samo onda kada je njihova produkcija praćena intenzivnom sintezom peroksidaza.

Procenat degradovanog lignina je očekivano bio mali s obzirom da je merenje vršeno nakon 7 dana fermentacije biljnog otpada. Robertson i dr. (2008) su pokazali da do značajnije degradacije lignina dolazi u kasnijim fazama fermentacije lignoceluloznog materijala bez obzira na značajne nivoe aktivnosti ligninolitičkih enzima u ranijim fazama

kultivacije. Naime sinteza enzima počinje u toku faze kolonizacije supstrata kada dolazi do inicijalnog napada reaktivnih vrsta kiseonika na ćelijski zid, tj. kada započinje degradacija lignina, dok se intenzivna i enzimski katalizovana delignifikacija dešava mnogo kasnije (Hammel i dr., 2002; Robertson i dr., 2008).

4.1.2. Efekat dužine kultivacije

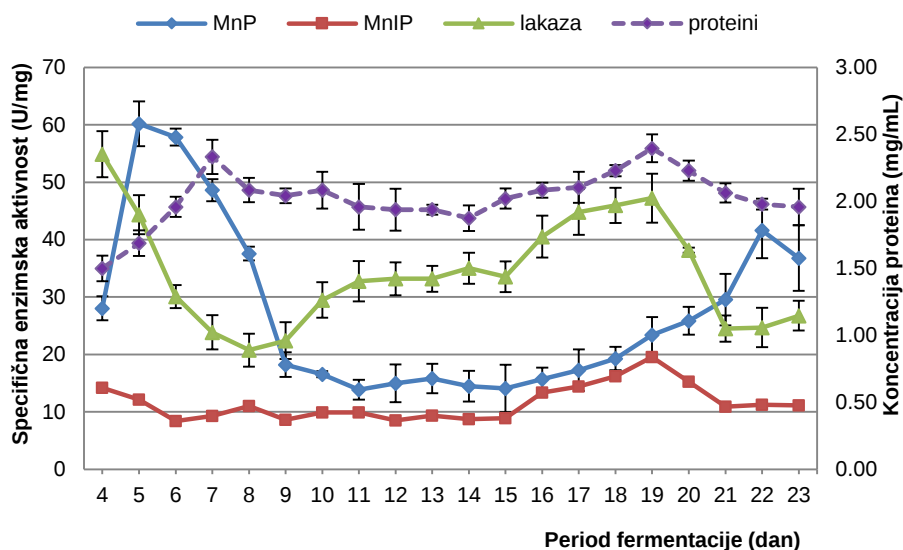
Dinamika aktivnosti MnP, MnIP i lakaza je praćena u toku 23 dana čvrste fermentacije pšenične slame sa *T. gibbosa* BEOFB 310. Rezultati su jasno pokazali da se dinamika aktivnosti ligninolitičkih enzima menja kroz nekoliko faza u toku ispitivanog perioda kultivacije (Grafik 2). U prvoj fazi, od 4. do 7. dana fermentacije, aktivnost MnP je intenzivno rasla i dostigla maksimalnu vrednost od $2332,1 \pm 128,0$ U/L, nakon čega je usledilo njeno naglo opadanje do 9. dana kada je zabeležena vrednost od $745,0 \pm 95,4$ U/L. U istom periodu došlo je do naglog pada aktivnosti lakaza i minimum ($854,5 \pm 82,0$ U/L) je zabeležen 8. dana fermentacije. U ovoj fazi nije bilo značajnijih promena u aktivnosti MnIP koja je bila umerena i stabilna i kretala se u opsegu od 405,3 do 458,3 U/L.



Grafik 2. Dinamika aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza u toku čvrste fermentacije pšenične slame sa *Trametes gibbosa* BEOFB 310

Druga ili stacionarna faza, od 10. do 15. dana fermentacije pšenične slame, odlikovala se manje više ujednačenim aktivnostima MnP i lakaza kao i MnIP koje su ostale u istom opsegu kao i tokom prve faze. U toku treće faze koja je počela 16. dana fermentacije aktivnosti sva tri enzima su rasle a maksimalne vrednosti za MnIP i lakazu su zabeležene 19. dana ($934,4 \pm 79,2$ odnosno $2245,0 \pm 100,3$ U/L). Četvrtu fazu je karakterisao značajan pad aktivnosti MnIP i lakaza i nastavak rasta aktivnosti MnP koja je 22. dana fermentacije dostigla svoj drugi maksimum ($1649,0 \pm 201,5$ U/L) (Grafik 2).

Koncentracija proteina je bila najmanja u ekstraktu dobijenom nakon 4 dana fermentacije pšenične slame ($1,5 \pm 0,1$ mg/mL) a najveća nakon 19 dana ($2,4 \pm 0,1$ mg/mL) što se odrazilo na specifične aktivnosti proučavanih enzima. Maksimalna specifična aktivnost MnP ($60,2 \pm 3,9$ U/mg) zabeležena je 5. dana, a MnIP i lakaza 19. dana fermentacije ($19,6 \pm 1,7$ odnosno $47,2 \pm 4,3$ U/mg) (Grafik 3).



Grafik 3. Dinamika specifičnih aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza u toku čvrste fermentacije pšenične slame sa *Trametes gibbosa* BEOFB 310

Specifične aktivnosti enzima kao i trend dinamike ove aktivnosti su potvrdili da je apsolutna enzimska aktivnost bila direktno uslovljena stopom produkcije enzima u toku fermentacije slame sa *T. gibbosa*. Tako, ukoliko se posmatraju apsolutne aktivnosti Mn-

oksidujućih peroksidaza i lakaza njihovi maksimumi se podudaraju sa maksimalnom koncentracijom proteina, što je izmereno 19. dana fermentacije. Odstupanje od ovakve uslovljenosti dinamike se može primetiti jedino u slučaju aktivnosti MnP od 5. do 7. dana fermentacije kada je zabeležen porast apsolutne i smanjenje specifične aktivnosti. Ovo ukazuje na to da nakon 5. dana fermentacije dolazi do inaktivacije određenog broja molekula MnP ali da stopa produkcije ovog enzima prevazilazi stopu inaktivacije čime se do 7. dana fermentacije beleži porast apsolutne aktivnosti ovog enzima.

Praćenjem dinamike enzimskih aktivnosti kod ispitivanog soja *T. gibbosa* može se zaključiti da u toku čvrste fermentacije slame dolazi do variranja intenziteta enzimske aktivnosti kao i udela pojedinačnih enzima u ukupnoj enzimskoj produkciji. Ovo upućuje na pretpostavku da u toku fermentacije lignoceluloznog materijala dolazi do smenjivanja faza koje moduliraju sintezu enzima. Intenzivnu sintezu lakaza u toku inicijalne faze kolonizacije bukve sa *T. versicolor* (prvih 10 dana) kada je produkcija peroksidaza ili odsustvovala ili bila zanemarljivo mala zabeležili su i Schlosser i dr. (1997) i Lekounougou i dr. (2008). Rezultati dobijeni za *T. gibbosa* BEOFB 310 su u saglasnosti i sa onima koje su dobili Collins i Dobson (1997). Ovi autori su pokazali da u toku tečne kultivacije *T. versicolor* postoji dvofazno oscilovanje aktivnosti lakaza i dva maksimuma, jedan u ranijoj a drugi u kasnijoj fazi kultivacije. Prvi maksimum se može povezati sa intenzivnom degradacijom jedinjenja male molekulske mase (različita fenolna jedinjenja, aldehidi, lignani, terpenoidi) i nekih drugih, prostijih, prisutnih u lignoceluloznom materijalu, koja mogu biti značajni izvori ugljenika, induktori transkripcije lakaznih gena, ali i veoma štetni za gljive bele truleži (Bollag i Leonowicz, 1984; Sarkanen i dr., 1991; Mansur i dr., 1998; Dorado i dr., 2001; Sun i Sun, 2001; Couto i dr., 2002; Lekounougou i dr., 2008; Piscitelli i dr., 2011). Zbog toga lakaze imaju veoma važnu ulogu i u snabdevanju gljiva ugljenikom i energijom ali i u detoksifikaciji. Drugi maksimum se javlja u već poodmakloj fazi delignifikacije kada lignin postaje izloženiji i kada produkti degradacije po principu povratne sprege indukuju sintezu lakaza (Smith i dr., 1998).

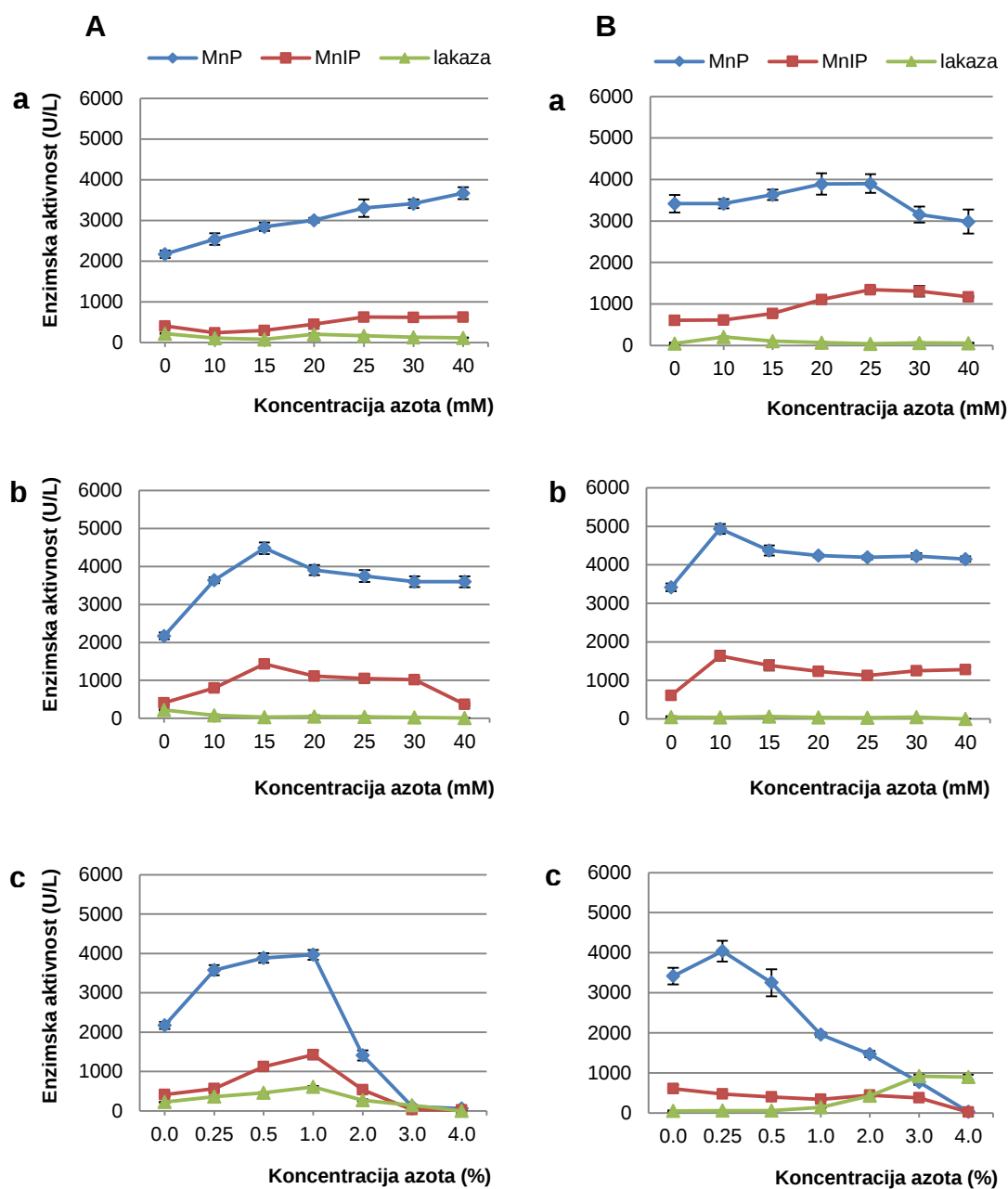
Do pojačane sinteze peroksidaza doći će tek nakon potrošnje jedinjenja male molekulske mase, tj. kada se gljivama na raspolaganju nalaze teško dostupne forme ugljenika kakav je na primer lignin (Bonnarme i dr., 1991; Gold i Alic, 1993). Visok nivo

MnP aktivnosti u inicijalnoj fazi fermentacije biljnog otpada nije bio svojstven samo za *T. gibbosa* BEOFB 310 već i za različite sojeve *T. versicolor* (Bonnarme i dr., 1991; Rogalski i dr., 1991; Gold i Alic, 1993). Međutim, Schlosser i dr. (1997) nisu zabeležili značajnu aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza kod testiranog soja *T. versicolor* u periodu kolonizacije supstrata što se može objasniti različitim odgovorima vrsta i sojeva ovog roda na uslove nedostatka azota u supstratu. Ovi autori su saopštili značajnu aktivnost peroksidaza tek nakon 15 dana kultivacije što se na osnovu produkcije proteina može pripisati porastu biomase. Pad aktivnosti MnP i MnIP 19. odnosno 22. dana kultivacije *T. gibbosa* BEOFB 310 najverovatnije je rezultat ulaska gljive u stacionarnu fazu rasta i poodmakle delignifikacije. Naime Knežević i dr. (2013b) su pokazali da vrste roda *Trametes* imaju značajne kapacitete degradacije lignina pšenične slame i da nivo njegove depolimerizacije može biti u opsegu od 27,7% do 57,7% što vodi brzoj potrošnji izvora ugljenika i značajnom padu aktivnosti peroksidaza.

4.1.3. Efekat izvora azota

Efekat dva neorganska (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) i jednog organskog (pepton) izvora azota i njihovih koncentracija na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza praćen je pri kultivaciji *T. gibbosa* BEOFB 310 pod ranije definisanim optimalnim uslovima, tj. nakon 7 i 19 dana čvrste fermentacije pšenične slame. Generalno, lakaze su imale znatno niži nivo aktivnosti u poređenju sa Mn-oksidujućim peroksidazama što je bio slučaj i sa MnIP u odnosu na MnP u prisustvu svih testiranih izvora i koncentracija azota na obe tačke merenja (Grafik 4).

Nakon 7 dana kultivacije u medijumu obogaćenom NH_4NO_3 zabeleženo je blago povećanje aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza sa porastom koncentracije azota. Sličan efekat je ovaj izvor azota imao i 19. dana fermentacije pšenične slame. Naime aktivnosti MnP i MnIP su blago rasle sve do koncentracije azota od 25 mM nakon čega su počele da opadaju. Efekat NH_4NO_3 na aktivnost lakaza je bio neznatan izuzev 19. dana kultivacije u medijumu obogaćenom sa 10 mM azota kada je zabeležena vrednost od $204,8 \pm 10,5$ U/L (Grafik 4Ba).



Grafik 4. Uticaj izvora i koncentracije azota na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa* BEOFB 310 nakon 7 (A) i 19 (B) dana čvrste fermentacije pšenične slame. **a)** NH_4NO_3 ; **b)** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **c)** pepton.

Međutim, nakon sedmodnevne kultivacije *T. gibbosa* $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je izazivao naglo povećanje aktivnosti MnP i MnIP sa porastom koncentracije azota do 15 mM kada su zabeležene i njihove maksimalne aktivnosti ($4479,3 \pm 149,2$ U/L odnosno $1430,9 \pm 95,6$ U/L) koje su sa daljim povećanjem koncentracije počele da opadaju (Grafik 4Ab). 19. dana kultivacije efekat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je bio isti kao i 7. dana. Naime aktivnosti ovih enzima su naglo rasle do koncentracije azota od 10 mM kada su dostigle svoje maksimume ($4933,5 \pm 159,1$ U/L odnosno $1638,7 \pm 129,7$ U/L) nakon čega su se blago smanjile pri koncentraciji od 15 mM i na tom nivou i ostale. Generalno, ovaj izvor azota se pokazao kao optimalan pošto je pri svim testiranim koncentracijama održavao nivo aktivnosti MnP iznad 4000,0 U/L a MnIP iznad 1000,0 U/L (Grafik 4Ab, Bb). Efekat i ovog izvora azota na aktivnost lakaza je bio neznatan, u odnosu na kontrolu pri koncentraciji azota od 40 mM 7. dana je zabeležen niži nivo aktivnosti ($10,1 \pm 2,5$ U/L) a 19. dana aktivnost nije detektovana (Grafik 4Bb).

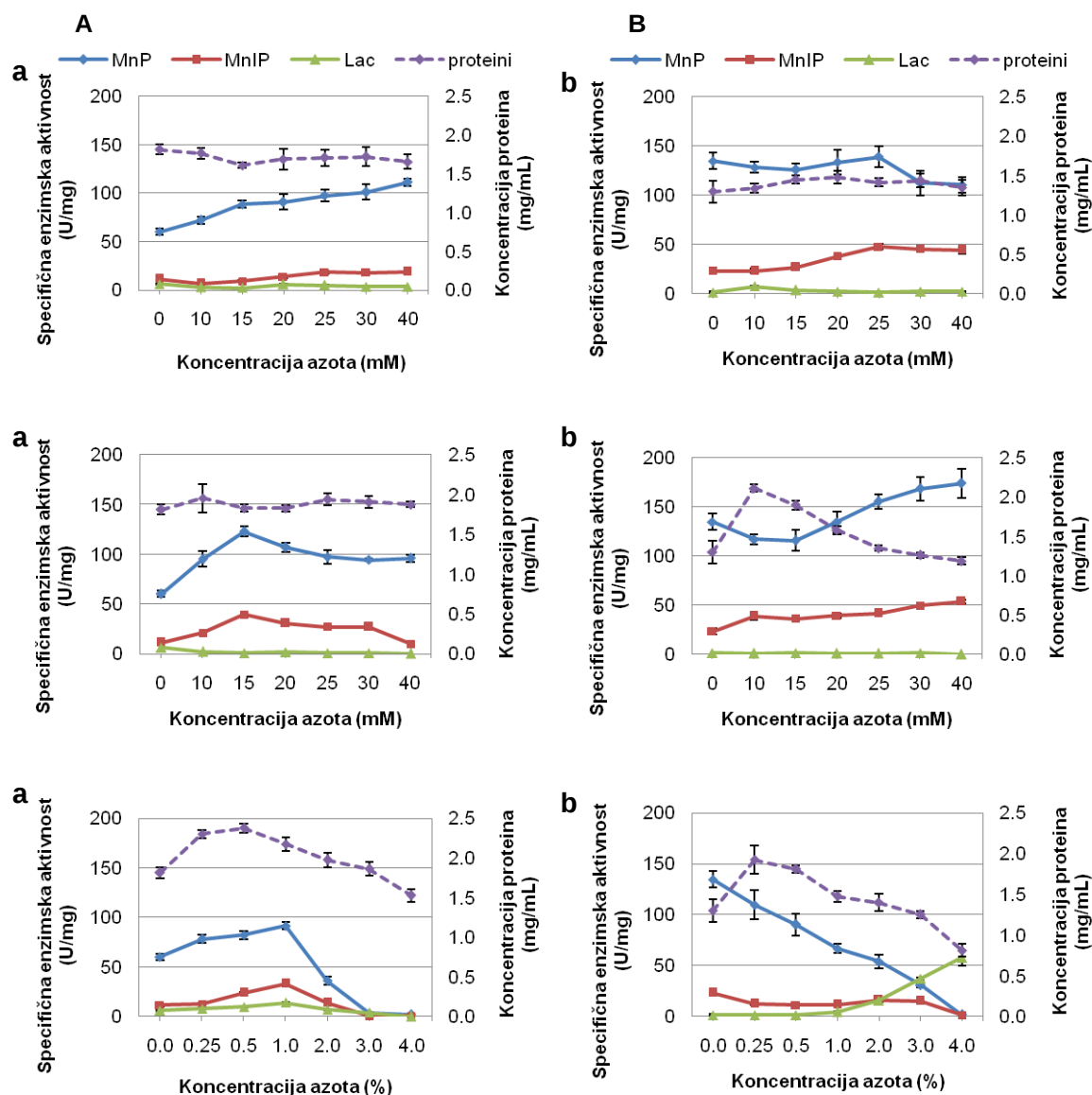
Nakon 7 dana kultivacije u medijumu obogaćenom peptonom aktivnosti MnP, MnIP i lakaze su rasle sa porastom koncentracije sve do vrednosti od 1,0% kada su zabeleženi maksimumi ($3964,5 \pm 123,9$ U/L, $1421,3 \pm 112,2$ U/L odnosno $605,2 \pm 28,4$ U/L) nakon čega je usledio nagli pad i pri koncentraciji od 4,0% nivoi aktivnosti MnP i MnIP su bili minimalni ($59,9 \pm 4,7$ U/L, $19,7 \pm 5,7$ U/L) dok lakaza nije detektovana (Grafik 4Ac). Slična slika je dobijena i 19. dana kultivacije. Naime, pepton je pri koncentraciji od 0,25% uzrokovao povećanje nivoa MnP aktivnosti koja je sa daljim porastom njegove količine naglo opadala i pri vrednosti od 4,0% bila minimalna ($28,8 \pm 3,5$ U/L) (Grafik 4Bc). Pepton 19. dana fermentacije pšenične slame nije znatno uticao na aktivnost MnIP izuzev kada je u medijumu bio prisutan u koncentraciji od 4,0% i izazvao nagli pad aktivnosti ($24,2 \pm 2,8$ U/L). Sa porastom koncentracije aktivnost lakaze je rasla do vrednosti od $922,3 \pm 34,3$ U/L koja je zabeležena u prisustvu 3,0% peptona (Grafik 4Bc).

Prisustvo NH_4NO_3 u medijumu vodilo je konstantnom nivou proteina i nakon 7 i nakon 19 dana fermentacije pšenične slame sa *T. gibbosa* BEOFB 310 pa je trend specifičnih enzimskih aktivnosti pratio trend njihovih apsolutnih aktivnosti (Grafik 5 Aa, Ba). Ovakva produkcija proteina je zabeležena i nakon 7 dana kultivacije ove makromicete na medijumu obogaćenom $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dok je 19. dana produkcija bila znatno veća od kontrole pri

koncentraciji azota od 10 mM ($2,1 \pm 0,1$ mg/mL) nakon čega je počela naglo da opada. U prisustvu peptona, kao izvora azota, u koncentraciji do 0,5% sinteza proteina je rasla dok je na višim naglo opadala i pri koncentraciji od 4,0% 19. dana fermentacije pšenične slame dostigla svoj minimum ($0,8 \pm 0,1$ mg/mL) (Grafik 5Bc). Ovakvi rezultati ukazuju da su nivoi aktivnosti MnP, MnIP i lakaze u prisustvu neorganskih izvora azota zavisili od udela aktivnih molekula u ukupno produkovanim molekulima enzima, dok su u prisustvu organskog izvora zavisili od stope enzimske produkcije.

Nakon 7 dana kultivacije, maksimalna specifična aktivnost MnP ($122,8 \pm 5,0$ U/mg) i MnIP ($39,3 \pm 3,2$ U/mg) zabeležena je u medijumu obogaćenom sa 15 mM azota u formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dok su nakon 19 dana najviši nivoi dobijeni pri koncentraciji od 40 mM ($173,9 \pm 15,1$ U/mg odnosno $53,7 \pm 2,0$ U/mg) što ukazuje da je udeo aktivnih molekula Mn-oksidišućih peroksidaza u ukupno produkovanim molekulima ovih enzima rastao sa porastom koncentracije azota (Grafik 5Ab, Bb). Nasuprot maksimumima specifičnih aktivnosti peroksidaza, u prisustvu ovog izvora azota specifična aktivnost lakaze je ili bila minimalna ($0,27 \pm 0,1$ U/mg, pri koncentraciji od 40 mM, 7. dana) ili nije ni zabeležena (19. dana).

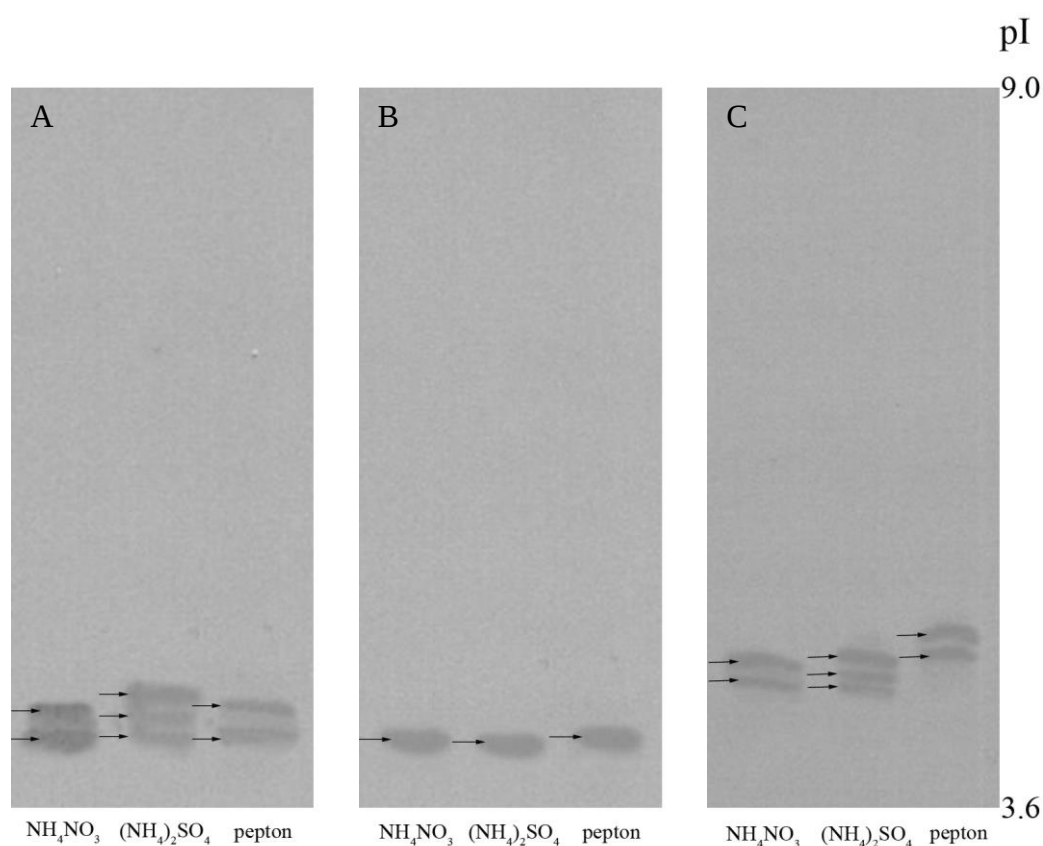
Nasuprot $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, minimalne specifične aktivnosti MnP ($2,0 \pm 0,2$ U/mg) i MnIP ($0,6 \pm 0,1$ U/mg) i maksimalna specifična aktivnost lakaze ($14,0 \pm 0,7$ U/mg) zabeležene su nakon 7-dnevne fermentacije pšenične slame u prisustvu 4,0%, 3,0% odnosno 1,0% peptona (Grafik 5Ac). Naime, u prisustvu ovog organskog izvora azota trend promene specifičnih aktivnosti ovih enzima je pratio trend njihovih apsolutnih aktivnosti, tj. rasle su do koncentracije od 1,0% nakon čega su počele naglo da opadaju. Sa produžetkom kultivacije porast koncentracije peptona vodio je opadanju specifične aktivnosti MnP, konstantnom nivou MnIP aktivnosti i porastu specifične aktivnosti lakaza koja je 19. dana kultivacije *T. gibbosa* na medijumu sa 4,0% peptona dostigla svoj maksimum od $57,8 \pm 7,5$ U/mg (Grafik 5Bc).



Grafik 5. Uticaj izvora i koncentracije azota na ukupnu produkciju proteina i specifičnu aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa* BEOFB 310 nakon 7 (A) i 19 (B) dana čvrste fermentacije pšenične slame. a) NH_4NO_3 ; b) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; c) pepton.

Uticaj testiranih izvora azota na profile izoformi Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *T. gibbosa* BEOFB 310 određen je izoelektričnim fokusiranjem ekstrakata dobijenih nakon 19-dnevne čvrste fermentacije slame u prisustvu 25 mM NH_4NO_3 , 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i

0,25% peptona (Slika 10). U prisustvu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, izoelektričnim fokusiranjem dobijene su tri izoforme MnP čije su pI bile 4,2, 4,3 i 4,4, dok su u prisustvu druga dva izvora azota zabeležene po dve izoforme pI vrednosti od 4,2 i 4,3 (Slika 10A). Ova makromiceta je pri ovim uslovima kultivacije sintetisala po jednu izoformu MnIP pI 4,2 u prisustvu svih testiranih izvora azota (Slika 10B). Međutim, profili izoformi lakaza su znatno varirali u zavisnosti od izvora azota (Slika 10C). Naime, u prisustvu NH_4NO_3 i peptona detektovane su po dve izoforme pI 4,6 i 4,7 odnosno 4,7 i 4,8, dok su u prisustvu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sintetisane tri izoforme pI 4,5, 4,6 i 4,7.



Slika 10. IEF profil Mn-zavisnih peroksidaza (A), Mn-nezavisnih peroksidaza (B) i lakaza (C) kod *Trametes gibbosa* BEOFB 310 u zavisnosti od izvora azota

Na osnovu dobijenih profila izoformi mogu se izvesti dva zaključka: (i) najviši nivo MnP aktivnosti zabeležen u prisustvu 10 mM azota u formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je bio uslovljen ne samo maksimalnim stepenom produkcije enzima već i brojem sintetisanih izoformi i (ii)

veći broj izoformi lakaze ne mora biti u korelaciji sa nivoom njene aktivnosti što je pokazano u prisustvu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kada je zabeleženo više izoformi i niža aktivnost ovog enzima nego u prisustvu peptona.

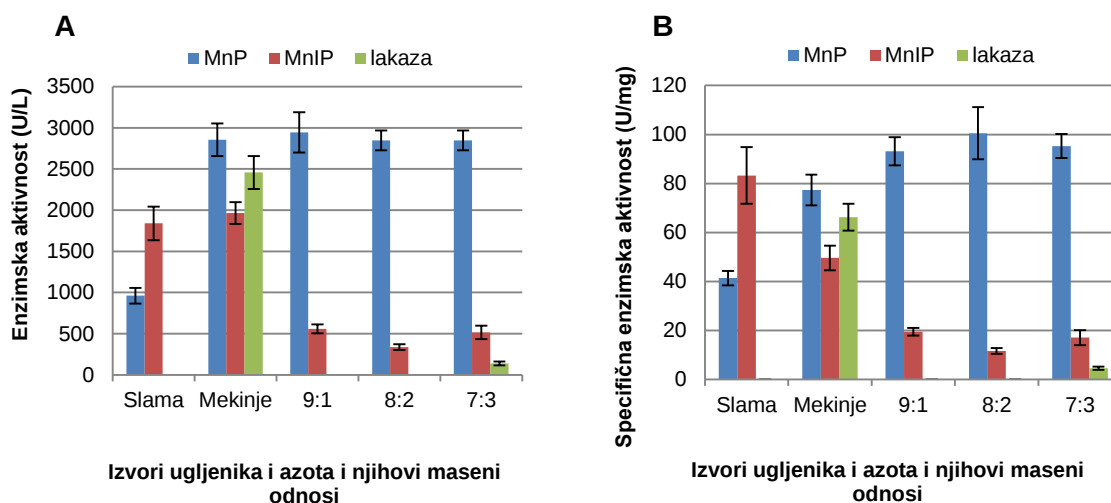
U prisustvu svih testiranih izvora azota u prethodno definisanim optimalnim koncentracijama, nakon 19 dana čvrste fermentacije pšenične slame sa *T. gibbosa* BEOFB 310 zabeležen je značajan nivo depolimerizacije lignoceluloznih polimera koji je bio u saglasnosti sa nivoom aktivnosti ovih enzima (Tabela 3). Najveći stepen degradacije lignina ($44,1 \pm 1,9\%$) dobijen je u prisustvu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a najniži ($32,6 \pm 0,9\%$) u prisustvu NH_4NO_3 . Takođe, u medijumu sa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zabeležena je i najveća selektivnost u mineralizaciji lignina i celuloze ($44,1\%:36,1\%$) nasuprot NH_4NO_3 gde je ona bila najmanja ($32,6\%:32,2\%$). Organski izvor azota je pre svega stimulisao razgradnju hemiceluloze, tj. pri ovakvim uslovima kultivacije *T. gibbosa* je depolimerizovao za oko 18% više hemiceluloze nego lignina.

Tabela 3. Uticaj izvora azota na kapacitet *Trametes gibbosa* BEOFB 310 da razlaže pšeničnu slamu u uslovima čvrste fermentacije

Uzorak	Masa uzorka [mg]	Sadržaj polimera u uzorku [mg]			Nivo razgradnje [%]		
		Hemiceluloza	Celuloza	Lignin	Hemiceluloza	Celuloza	Lignin
Slama (kontrola)	2000,0	$590,6 \pm 4,7$	$710,0 \pm 5,5$	$193,4 \pm 3,0$	-	-	-
NH_4NO_3 , 25mM	$1372,0 \pm 11,3$	$321,0 \pm 2,0$	$481,6 \pm 3,8$	$130,3 \pm 1,5$	$45,6 \pm 1,1$	$32,2 \pm 1,0$	$32,6 \pm 0,9$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM	$1303,0 \pm 9,5$	$340,1 \pm 3,2$	$453,4 \pm 2,9$	$108,1 \pm 2,1$	$42,4 \pm 1,6$	$36,1 \pm 1,4$	$44,1 \pm 1,9$
Pepton, 0.25%	$1322,0 \pm 5,7$	$302,7 \pm 3,3$	$429,7 \pm 4,0$	$113,7 \pm 1,9$	$48,7 \pm 1,3$	$39,5 \pm 1,2$	$41,2 \pm 1,3$
Mekinje, 10%	$1250,0 \pm 6,2$	$266,3 \pm 2,9$	$517,5 \pm 3,9$	$100,0 \pm 1,9$	$54,9 \pm 1,1$	$27,1 \pm 1,3$	$48,3 \pm 0,8$

Efekat dodatnog izvora azota na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *T. gibbosa* BEOFB 310 praćen je dodavanjem 10%, 20% i 30% pšeničnih mekinja medijumu sa 10 mM azota u formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Mekinje nisu sadržale samo značajnu koncentraciju azota (435,4 ppm po Kjeldalu) već i proteina (12%), hemiceluloze (30%), celuloze (9%), lignina (8%), bakra (11,44 ppm), gvožđa (81,5 ppm), mangana (111,52 ppm), cinka (72,92

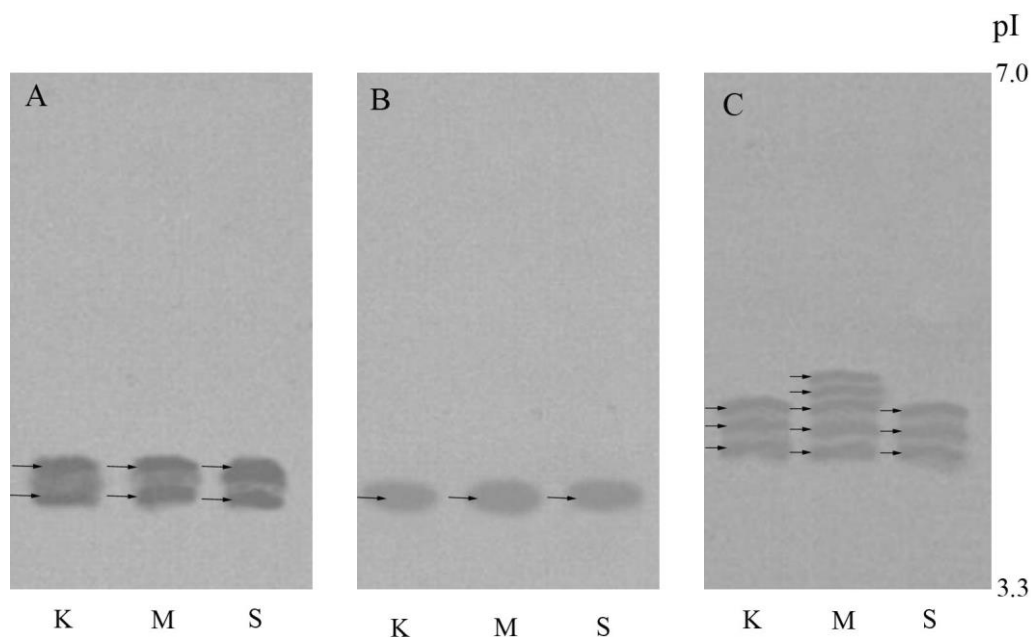
ppm) i kalcijuma (537,6 ppm). Obogaćivanje medijuma pšeničnim mekinjama značajno je stimulisalo aktivnost MnP u odnosu na kontrolu ($961,2 \pm 95,7$ U/L), posebno kada su bile zastupljene sa 10% ($2945,2 \pm 245,1$ U/L) (Grafik 6A). Za produkciju MnIP i slama i mekinje su bile dobar supstrat ali je njihova smeša značajno inhibirala aktivnost ovog enzima. Kada je u pitanju lakaza, visoka aktivnost ($2457,3 \pm 199,7$ U/L) je zabeležena nakon 19-dnevne fermentacije pšeničnih mekinja sa *T. gibbosa*, neznatna pri kultivaciji na smeši slame i mekinja u odnosu 7:3, dok je u potpunosti odsustvovala pri fermentaciji slame kao i njene smeše sa 10% i 20% mekinja (Grafik 6A). Profil specifičnih aktivnosti proučavanih enzima je bio sličan profilu apsolutnih aktivnosti (Grafik 6B).



Grafik 6. Uticaj pšeničnih mekinja kao dodatnog izvora azota na apsolutne (A) i specifične (B) aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa* BEOFB 310 nakon 19 dana čvrste fermentacije pšenične slame

Izoelektričnim fokusiranjem ekstrakata dobijenih nakon 19 dana čvrste fermentacije slame, mekinja i smeše slame i mekinja u odnosu 9:1 (definisan kao optimalan za aktivnost enzima) dobijene su po dve izoforme MnP čije su pI bile 4,2 i 4,3 i po jedna izoforma MnIP pI 4,2 (Slika 11A, B). Kada su u pitanju lakaze razlike u profilima izoformi dobijenih izoelektričnim fokusiranjem proučavanih ekstrakata su bile značajnije. Naime, u toku fermentacije slame i smeše slame i mekinja sintetisane su po tri izoforme lakaza čije su pI

bile 4,4, 4,5 i 4,6, dok se tokom fermentacije mekinja produkovalo 5 izoformi čije su pI bile u opsegu od 4.4 do 4.8 (Slika 11C).



Slika 11. Uticaj sastava supstrata na IEF profil Mn-zavisnih peroksidaza (A), Mn-nezavisnih peroksidaza (B) i lakaza (C) *Trametes gibbosa* BEOFB 310 (K – slama + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; M – mekinje; S – smeša slame i mekinja u odnosu 9:1).

Na osnovu ovih rezultata ponovo se mogu izvesti dva zaključka. Prvi da su nivoi aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza direktno zavisili od stope produkcije enzima a ne od broja sintetisanih izoformi i drugi da iako je *T. gibbosa* BEOFB 310 imao sposobnost da sintetiše čak 5 izoformi lakaza pri fermentaciji mekinja njihova aktivnost nije detektovana spektrofotometrijski što se može objasniti produkcijom ovih izoformi u tragovima.

Dodavanje pšeničnih mekinja slami u količini od 10% je vodilo povećanju selektivnosti depolimerizacije lignoceluloze (Tabela 3). Naime, stepen degradacije lignina i hemiceluloze se značajno povećao ($48,3 \pm 0,8\%$ odnosno $54,9 \pm 1,1\%$) a nivo razgradnje celuloze se smanjio ($27,1 \pm 1,3\%$).

Dobijeni rezultati su potvrdili rezultate bojnih istraživanja koji su pokazali da vrsta izvora azota kao i njegova koncentracija i dostupnost u velikoj meri mogu uticati na

aktivnost ligninolitičkih enzima kod vrsta roda *Trametes* kao i drugih gljiva bele truleži (Buswell i dr., 1995; Hammel, 1997; Mester i Field, 1997; Elisashvili i dr., 2002; Galhaup i dr., 2002b; Mikiashvili i dr., 2005; Stajić i dr., 2010). Janusz i dr. (2013) su saopštili da azot pre svega deluje na nivo ekspresije gena i to najviše onih koji kodiraju Mn-oksidujuće peroksidaze. Međutim, da li će azot stimulirati ili inhibirati sintezu i aktivnost MnP zavisi od vrste gljiva. Tako su Gold i Alic (1993) i Trudel i dr. (1988) pokazali da do indukcije transkripcije *mnp* gena kod *Phanerochaete chrysosporium* i *T. versicolor* dolazi u uslovima ograničene dostupnosti azota za razliku od *Pleurotus ostreatus* i *T. trogii* kod kojih povećane koncentracije azotnih jedinjenja indukuju sintezu MnP (Leatham i Kirk, 1983; Levin i dr., 2002, 2010). Sa druge strane, Perie i Gold (1991) i Li i dr. (2011) su zabeležili indiferentnost nekih vrsta, na primer *Dichomitus squalens* i *Ganoderma lucidum*, na prisustvo i promenu koncentracije azota u medijumu. Kako su ranija istraživanja pokazala, od vrste gljive i njenog kapaciteta produkcije aktivnog enzima kao i od tipa kultivacije zavisi intenzitet dejstva izvora i koncentracija azota na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza. Naime, u toku tečne kultivacije se ne očekuje značajna aktivnost ovog enzima za razliku od čvrste kultivacije (Viniegra-González i dr., 2003). Sa druge strane, dobri producenti Mn-oksidujućih peroksidaza brzo dostižu maksimum produkcije što vodi zasićenju enzima, tj. stanju kada su aktivna mesta svih molekula enzima zauzeta pa povećanje količine supstrata ne dovodi do povećavanja stope enzimske reakcije (Segal, 1992). To je pokazano na primeru *T. gibbosa* BEOFB 310 kod koga je povećanje MnP aktivnosti u prisustvu 10 mM azota u formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bilo svega 44% u odnosu na kontrolu za razliku od dva soja *T. versicolor* gde su Mikiashvili i dr. (2005) zabeležili višestruko povećavanje aktivnosti ovog enzima u toku tečne fermentacije sintetičkog medijuma obogaćenog NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ili peptonom. Međutim, kapacitet produkcije ovog enzima je bio mnogo veći kod *T. gibbosa* zbog čega je kod njega nivo aktivnosti bio daleko veći u poređenju sa onim dobijenim za *T. versicolor*.

Kada su u pitanju lakaze, rezultati dobijeni za *T. gibbosa* su bili u saglasnosti sa rezultatima Mikiashvili i dr. (2005) koji su pokazali da njihovu sintezu i aktivnost ne indukuju neorganski izvori azota za razliku od organskih izvora, na primer peptona, koji su višestruko povećavali aktivnost ovog enzima. Međutim, Kenkebashvili i dr. (2012) su

saopštili da su NH_4NO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inhibirali a pepton stimulisao aktivnost lakaza *Corioloropsis gallica* u toku tečne fermentacije pšeničnih mekinja što je bilo suprotno njihovom dejstvu na aktivnost MnP.

Činjenicom da su kod vrsta roda *Trametes* Mn-oksidujuće peroksidaze i lakaze kodirani strukturno različitim genskim familijama (Johansson i Nyman, 1993, 1996) može se objasniti svojstvo *T. gibbosa* da u prisustvu različitih izvora azota sintetise nekoliko različitih izoformi ovih enzima koje su bile manje kisele (pI u opsegu od 4,2 do 4,4) u odnosu na one koje je sintetisao *T. versicolor* i čije su pI bile u opsegu od 2,93 do 3,17 (Johansson i Nyman, 1993).

Stimulativno dejstvo pšeničnih mekinja na rast gljiva i aktivnost ligninolitičkih enzima demonstrirano je i brojnim ranijim istraživanjima i objašnjava se njihovim hemijskim sastavom (Wang i dr., 2001; Locci i dr., 2008; Okamoto i dr., 2011; Zapata-Castillo i dr., 2012; Bakkiyaraj i dr., 2013). Naime, pored značajne zastupljenosti ugljenika u formi hemiceluloze (30 - 52%), celuloze (10 - 15%), lignina (4 - 8%), skroba (10 - 20%) i drugih jedinjenja, one su bogate i azotom pre svega u formi proteina (15 - 22%) (Maes i Delcour, 2002; Locci i dr., 2008; Stevenson i dr., 2012; Merali i dr., 2015). Papinutti i dr. (2003) su zabeležili stimulativno dejstvo mekinja na istovremenu sintezu Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza kod *Fomes sclerodermus* a Songulashvili i dr. (2006), Souza i dr. (2010), Zapata-Castillo i dr. (2012) i Bakkiyaraj i dr. (2013) samo na aktivnost lakaze kod *G. adspersum*, *T. hirsuta* i *T. versicolor*. Zbog toga što su dobar izvor amino-kiselina ali i lako dostupnog ugljenika (skrob), Songulashvili i dr. (2006) i Okamoto i dr. (2011) su pretpostavili da pšenične mekinje svoje dejstvo zasnivaju na povećanju produkcije biomase a ne na indukciji ekspresije gena što je svojstveno neorganskim izvorima azota. Međutim, s obzirom da je *T. gibbosa* BEOFB 310 sintetisao više izoformi lakaza pri fermentaciji pšeničnih mekinja nego pri kultivaciji na slama/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medijumu može se zaključiti da one deluju i na nivou ekspresije gena.

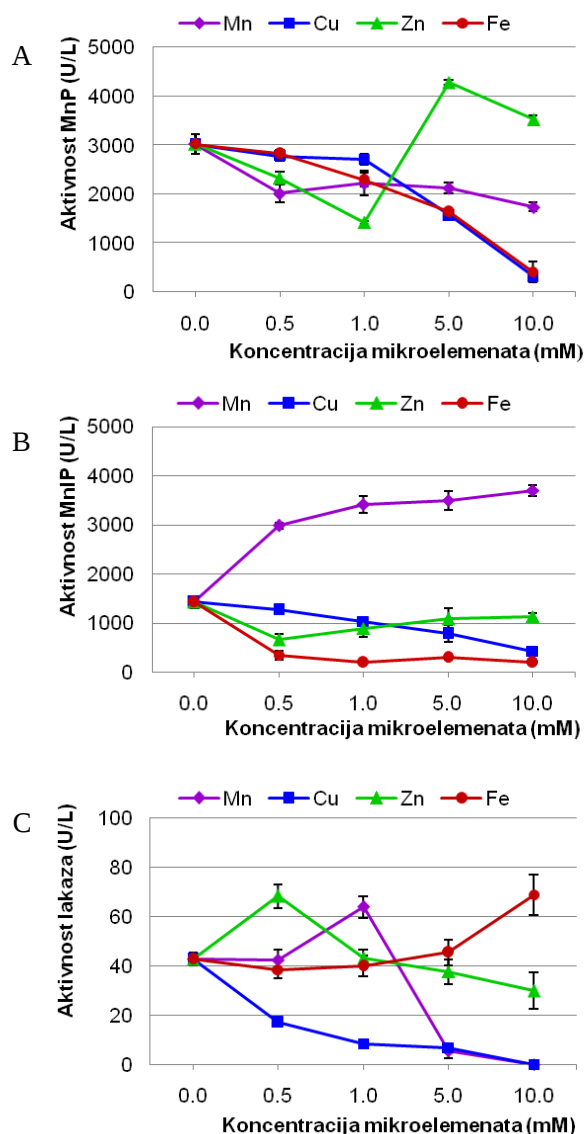
Analiza rezultata dobijenih za stopu degradacije lignina upućuje da je stepen delignifikacije proporcionalan nivou enzimske aktivnosti čime se može objasniti značajan efekat pšeničnih mekinja na ovaj proces. Visoki kapacitet *T. gibbosa* da depolimerizuje hemicelulozu i nizak za hidrolizu celuloze u prisustvu pšeničnih mekinja u saglasnosti je sa

rezultatima koje su za *Pleurotus ostreatus* dobili Locci i dr. (2008). Ovakva selektivna mineralizacija polimera lignoceluloznog materijala se može primeniti u mnogim biotehnološkim procesima.

4.1.4. Efekat mikroelemenata

Efekat Cu, Mn, Zn i Fe na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze praćen je pri 19-dnevnoj čvrstoj kultivaciji *T. gibbosa* BEOFB 310 na slama/(NH₄)₂SO₄ medijumu obogaćenom sa MnSO₄×H₂O, CuSO₄×5H₂O, ZnSO₄×7H₂O ili FeSO₄×7H₂O u koncentracijama od 0,5; 1,0; 5,0 ili 10,0 mM. Dobijeni rezultati su pokazali da je aktivnost MnP blago opadala sa porastom koncentracije Cu²⁺ i Fe²⁺, i pri koncentraciji od 10,0 mM dostigla minimalne vrednosti od 320,7 ± 36,0 U/L odnosno 410,0 ± 221,6 U/L koje su za oko 90% bile manje nego u kontrolnim uslovima (3021,6 ± 203,2 U/L) (Grafik 7A). Prisustvo Mn²⁺ u svim ispitivanim koncentracijama je izazivalo blago sniženje nivoa MnP aktivnosti. Međutim, iako je Zn²⁺ na nižim koncentracijama imao inhibitorni efekat na aktivnost ovog enzima bio je jedini mikroelement koji je pri koncentracijama od 5,0 i 10,0 mM stimulisao aktivnost ovog enzima za 41,6% odnosno 16,7% (Grafik 7A).

Aktivnost MnIP je bila stimulirana jedino u prisustvu Mn²⁺ (Grafik 7B). Nivo aktivnosti se postepeno povećavao i pri koncentraciji od 10,0 mM dostigao maksimum od 3697,1 ± 105,2 U/L koji je 2,6 puta bio veći od onog zabeleženog u kontroli (1424,3 ± 123,4 U/L). Sa druge strane, prisustvo ostalih mikroelemenata u medijumu je vodilo različitom stepenu smanjenja aktivnosti ovog enzima. Tako je aktivnost kontinuirano opadala sa porastom koncentracije Cu²⁺ (do 70% niža od kontrole pri koncentraciji od 10,0 mM) i Fe²⁺ (4 puta pri koncentraciji od 0,5 mM i 7 puta pri koncentraciji od 10,0 mM). Nakon naglog pada aktivnosti MnIP u prisustvu 0,5 mM Zn²⁺ (661,6 ± 110,8 U/L) došlo je do njenog blagog porasta sa povećanjem koncentracije ali je čak i na koncentraciji od 10,0 mM ta aktivnost bila manja nego u kontroli (Grafik 7B).



Grafik 7. Uticaj mikroelemenata na aktivnost Mn-zavisne peroksidaze (A); Mn-nezavisne peroksidaze (B) i lakaze (C) *Trametes gibbosa* BEOFB 310 nakon 19 dana čvrste fermentacije slama/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medijuma

Aktivnost lakaze je detektovana u ekstraktima *T. gibbosa* BEOFB 310 dobijenim nakon 19 dana fermentacije slame u kontrolnim uslovima i u prisustvu određene koncentracije mikroelemenata (Grafik 7C). Prisustvo mikroelemenata je u poređenju sa kontrolom na različite načine uticalo na aktivnost lakaze, od značajnog povećanja nivoa aktivnosti do potpunog izostanka aktivnosti u zavisnosti od koncentracije. Mn^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} su

povećavali nivo aktivnosti lakaze pri koncentracijama od 1,0 mM, 0,5 mM odnosno 10,0 mM za 50% do 61% (Grafik 7C).

Mnogobrojna istraživanja su potvrdila da Cu^{2+} utiče na aktivnost Mn-oksidišućih peroksidaza putem regulacije transkripcionih faktora, a da Mn^{2+} pored toga što deluje na nivou transkripcije učestvuje i u kontroli post-transkripcionih procesa (Gettemy i dr., 1998; Manubens i dr., 2007; Alvarez i dr., 2009). Janusz i dr. (2013) su takođe pokazali da kod većine vrsta izazivača belog truljenja Cu^{2+} i Mn^{2+} indukuju aktivnost ovih enzima što su Wariishi i dr. (1988) objasnili specifičnom prirodom peroksidaza gljiva koja im omogućava da koriste slobodno difundujuće $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$ redoks parove stabilnog oksidacionog stanja u vodenim rastvorima. Sa druge strane Zn^{2+} i Fe^{2+} su kod istih vrsta gljiva izazivali slabu inhibiciju aktivnosti zbog njihove manje osetljivosti na ove jone (Hatvani i Mécs, 2003). Međutim, odgovor na prisustvo ovih jona se razlikovao od vrste do vrste. Tako nasuprot *T. versicolor* čiji je rast bio snažno inhibiran prisustvom Zn^{2+} i Fe^{2+} u koncentraciji od 0,2 mM (Pointing i dr., 2000) *T. gibbosa* BEOFB 310 je pokazao značajnu toleranciju čak i na koncentraciju od 0,5 mM.

Nasuprot očekivanjima da bi prisustvo Cu^{2+} imalo pozitivan efekat na aktivnost i stabilnost lakaze kao i na indukciju transkripcije gena koji kodiraju ovaj enzim kod vrsta roda *Trametes* (Collins i Dobson, 1997; Baldrian i Gabriel, 2002; Baldrian, 2003) kod *T. gibbosa* BEOFB 310 je zabeležen progresivan pad aktivnosti što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Levin i dr. (2008) za *T. trogii*. Ovo se može objasniti koncentracijama Cu^{2+} većim od 0,5 mM pošto je Baldrian (2003) istakao da koncentracija ovog mikroelementa od svega 0,2 mM izaziva snažnu supresiju rasta micelije kod *Trametes* spp. i inhibira enzimske reakcije. Međutim, Shah i dr. (2010) nisu zabeležili statistički značajan uticaj Cu^{2+} na produkciju lakaza kod proučavanog soja *T. versicolor*.

Suprotno inhibitornom efektu Cu^{2+} , određene koncentracije Mn^{2+} , Zn^{2+} i Fe^{2+} su stimulatивно delovale na aktivnost lakaza kod *T. gibbosa* BEOFB 310 kao i kod *T. versicolor* i *T. hirsuta* (Collins i Dobson 1997; Keum i Li 2004; Lorenzo i dr. 2006; Cho i dr., 2009) što međutim nije zabeleženo kod drugih vrsta bele truleži (Das i dr., 2001; Hatvani i Mécs, 2003; Rodríguez Couto i dr., 2005). Indukcija lakaza jonima ovih metala

može se objasniti ograničenom selektivnošću metal-vezujućeg promotornog regiona gena koji kodiraju ovaj enzim i indukcijom transkripcije (Faraco i dr., 2003; Piscitelli i dr., 2011).

Stepen razgradnje pšenične slame određivan je nakon kultivacije *T. gibbosa* BEOFB 310 na slama/(NH₄)₂SO₄ medijumu obogaćenom analiziranim mikroelementima u koncentracijama optimalnim za aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza (Mn²⁺ – 1,0 mM; Cu²⁺ – 0,5 mM; Zn²⁺ – 5,0 mM; Fe²⁺ – 0,5 mM) i lakaze (Mn²⁺ – 1,0 mM; Cu²⁺ – 0,5 mM; Zn²⁺ – 0,5 mM; Fe²⁺ – 10,0 mM). U uzorku slame (2,0 g) hemiceluloza je bila zastupljena sa 590,6 ± 4,7 mg, celuloza sa 710,0 ± 5,5 mg a lignin sa 193,4 ± 3,0 mg, dok je nakon 19 dana fermentacije količina ovih polimera opala na 266,3 ± 3,0 mg, 517,5 ± 4,8 mg odnosno 100,0 ± 3,7 mg što je pokazalo visok nivo degradacije (54,9%, 27,1% odnosno 48,3%) i gubitak suve mase od 37,5% (Tabela 4). U prisustvu 1,0 mM Mn²⁺ gubitak suve mase je bio najveći (861,7 mg, tj. 43,1%) što je bila posledica najvećeg stepena degradacije hemiceluloze, celuloze i lignina (62,6%, 35,6% odnosno 61,2%). Prisustvo 0,5 mM Cu²⁺ i Zn²⁺ je u poređenju sa kontrolom takođe dovelo do gubitka suve mase od 3,7% odnosno 2,5%. Iako je prisustvo 0,5 mM Zn²⁺ uzrokovalo smanjenje aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza značajne razlike u nivou depolimerizacije ovih polimera nisu zabeležene zbog visoke aktivnosti lakaze. Međutim, u prisustvu drugih koncentracija ovih mikroelemenata kao i u prisustvu Fe²⁺ gubitak suve mase je bio znatno niži nego u kontrolnim uslovima, svega 1,2 - 4,6% (Tabela 4).

S obzirom da mikroelementi utiču na aktivnost ligninolitičkih enzima jasno je da će uticati i na razgradnju lignina i drugih polifenola. Cabaleiro i dr. (2001), Palmieri i dr. (2001) i Baldrian (2003) su pokazali da mikroelementi mogu da moduliraju proces delignifikacije ne samo putem dejstva na sintezu ovih enzima već i na proteolitičke enzime i koncentraciju H₂O₂. Najviši nivo degradacije lignina detektovan je u prisustvu 1,0 mM Mn²⁺ kada je maksimalna aktivnost lakaze praćena visokim nivoom aktivnosti peroksidaza, što ukazuje na sinergističko dejstvo ovih enzima. Ovakva interpretacija je podržana neznatnom degradacijom lignina u uzorcima sa 10,0 mM Mn²⁺ gde su aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza bile visoke dok lakaze nisu bile detektovane. Nasuprot Lundell i dr. (2010) koji smatraju da lakaze imaju marginalnu ulogu u delignifikaciji, rezultati dobijeni za *T. gibbosa* kao i oni koje su saopštili Knežević i dr. (2013a) govore u prilog važnosti ovih enzima.

Tabela 4. Uticaj mikroelemenata na kapacitet *Trametes gibbosa* BEOFB 310 da razlaže pšeničnu slamu u uslovima čvrste fermentacije

Uzorak	Masa uzorka [mg]	Sadržaj polimera u uzorku [mg]			Nivo razgradnje [%]		
		Hemiceluloza	Celuloza	Lignin	Hemiceluloza	Celuloza	Lignin
Slama	2000,0	590,6 ± 4,7	710,0 ± 5,5	193,4 ± 3,0	-	-	-
Kolonizovana slama	1250,7 ± 13,7	266,3 ± 3,0	517,5 ± 4,8	100,0 ± 3,7	54,9 ± 0,2	27,1 ± 0,3	48,3 ± 0,9
+Mn ²⁺ (1,0 mM)	1138,3 ± 12,1	220,8 ± 2,9	457,6 ± 3,2	75,1 ± 2,0	62,6 ± 0,5	35,6 ± 0,5	61,2 ± 1,1
+Mn ²⁺ (10,0 mM)	1272,2 ± 19,3	287,5 ± 4,1	505,1 ± 4,1	100,5 ± 2,6	51,3 ± 0,7	28,9 ± 0,5	48,0 ± 1,3
+Cu ²⁺ (0,5 mM)	1204,6 ± 11,6	266,2 ± 4,2	489,1 ± 4,2	91,5 ± 2,9	54,9 ± 0,7	31,1 ± 0,6	52,7 ± 1,5
+Zn ²⁺ (0,5 mM)	1219,4 ± 13,9	285,3 ± 3,3	480,4 ± 3,8	79,3 ± 1,3	51,7 ± 0,6	32,3 ± 0,5	59,0 ± 0,7
+Zn ²⁺ (5,0 mM)	1274,1 ± 15,0	262,5 ± 3,1	504,5 ± 3,9	85,4 ± 2,4	55,6 ± 0,6	28,9 ± 0,5	55,9 ± 1,3
+Fe ²⁺ (0,5 mM)	1308,0 ± 18,4	302,1 ± 4,5	545,4 ± 4,0	87,6 ± 2,1	48,8 ± 0,7	23,2 ± 0,6	54,7 ± 1,1 ^a
+Fe ²⁺ (10,0 mM)	1265,6 ± 10,7	289,8 ± 3,7	499,9 ± 3,3	94,9 ± 2,4	50,9 ± 0,6	29,6 ± 0,5	50,9 ± 1,2

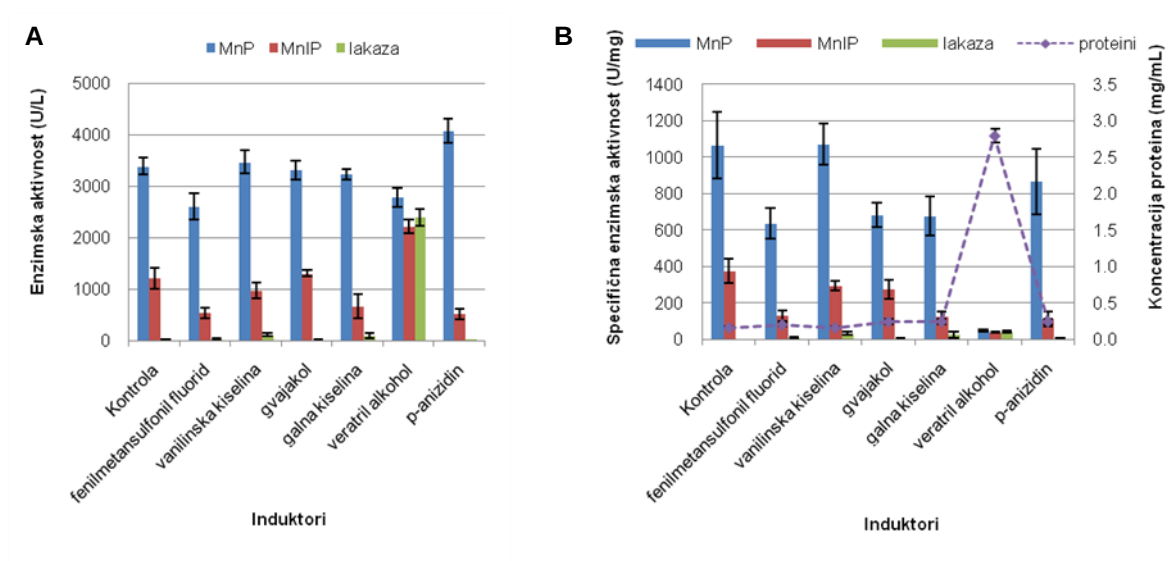
^a selektivna razgradnja lignina

Stimulativni efekat na depolimerizaciju lignina imali su i Fe^{2+} i Zn^{2+} u koncentraciji od 0,5 mM što je bilo u saglasnosti sa rezultatima Singhal i Rathore (2001) i Shah i dr. (1992). Mogući mehanizam indukcije degradacije lignina u prisustvu Fe katjona je formiranje hidroksil radikala koji su odgovorni za veću aktivnost peroksidaza (Shah i dr., 1992). U prisustvu ova dva mikroelementa, posebno Fe^{2+} , dominantno je degradovan lignin dok je hidroliza celuloze bila neznatna što je veoma važno sa aspekta biotehnologije.

4.1.5. Efekat indukujućih supstanci

Dodavanje odabranih indukujućih supstanci (induktora) slama/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /mekinje medijumu je različito delovalo na aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza (Grafik 8). Značajan stimulativni efekat na aktivnost MnP imao je jedino *p*-anizidina u čijem prisustvu je zabeležena maksimalna aktivnost od $4083,5 \pm 234,8$ U/L koja je za 20% bila veća od one dobijene u kontroli ($3395,3 \pm 165,5$ U/L). Drugi ispitivani induktori su ili neznatno povećavali aktivnost ovog enzima ili su je čak i smanjivali. Kada je u pitanju MnIP, stimulativno dejstvo na aktivnost imao je samo veratril alkohol čijim se dodavanjem u medijum aktivnost povećala za 82% u odnosu na kontrolu ($2219,8 \pm 131,7$ U/L u odnosu na $1217,2 \pm 198,4$ U/L). Veratril alkohol se pokazao i kao posebno dobar stimulator lakazne aktivnosti koja je u njegovom prisustvu bila 93 puta veća nego u kontroli ($2400,5 \pm 160,9$ U/L u poređenju sa $25,6 \pm 4,9$ U/L). Statistički značajno povećanje aktivnosti lakaze od 4,8 i 4,2 puta u odnosu na kontrolu zabeleženo je u uzorcima sa vanilinskom odnosno galnom kiselinom (Grafik 8A).

U uzorcima sa svim studiranim induktorima izuzev veratril alkohola produkcija proteina je bila niska i stabilna. Međutim, veratril alkohol je stimulisao produkciju proteina pa je njihova maksimalna koncentracija od $2,79 \pm 0,09$ mg/mL zabeležena u medijumu obagećenom ovim jedinjenjem što se odrazilo na specifične aktivnosti koje jedino ovde nisu pratile trend apsolutnih aktivnosti (Grafik 8B). Ove specifične enzimске aktivnosti su pokazale da veratril alkohol indukuje sintezu enzima ali da je udeo aktivnih enzimskih molekula veoma nizak. Međutim, ako se u obzir uzmu visoki nivoi apsolutnih enzimskih aktivnosti može se zaključiti da ovaj induktor povećava i enzimsku aktivnost.



Grafik 8. Uticaj induktora na apsolutnu (**A**) i specifičnu (**B**) aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza *Trametes gibbosa* BEOFB 310 nakon 19 dana čvrste fermentacije pšenične slame.

Brojna istraživanja su pokazala da produkcija ligninolitičkih enzima kod gljiva bele truleži može biti indukovana različitim supstancama kao što su fenolna jedinjenja, alifatični alkoholi, vodeni ekstrakti biljaka i dr. (Łobarzewski i Trojanowski, 1979; Collins i Dobson, 1997; Galhaup i Haltrich, 2001; Couto i dr., 2002; Galhaup i dr., 2002b; Minussi i dr., 2007; Malarczyk i dr., 2009; Dhakar i Pandey, 2013). Tako su još Łobarzewski i Trojanowski (1979) pokazali da kod vrsta roda *Trametes* ferulinska kiselina značajno povećava aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza. Daljim testiranjem brojnih vrsta gljiva došlo se do rezultata da su odlični induktori lakaze 2,5-ksilidin, gvajakol, katehol, veratril alkohol, *p*-anizidin, siringaldazin, vanilinska, taninska i galna kiselina. Ako u obzir uzmemo rezultate Collinsa i Dobsona (1997) da najveći broj aromatičnih jedinjenja pri koncentracijama ≥ 2 mM u potpunosti zaustavlja rast *T. versicolor*, dolazi se do još jedne važne funkcije lakaze, detoksifikacije. Naime, još je Thurston (1994) istakao da lakaze u prisustvu ovih jedinjenja u subletalnim koncentracijama katalizuju njihovu depolimerizaciju i degradaciju i tako redukuju nivo oksidativnog stresa. Kasnije su Li i dr.

(1995), Collins i Dobson (1997) i Piscitelli i dr. (2011) opisali mehanizam indukcije enzimskih aktivnosti aromatičnim jedinjenjima. Ova jedinjenja se mogu smatrati ksenobioticima ali pri nižim koncentracijama regulišu produkciju i aktivnost ligninolitičkih enzima na nivou transkripcije gena i to dejstvom na vezujuće elemente za ksenobiotike (XRE) i antioksidativne regulatorne elemente (ARE) koji se nalaze u promotorskom regionu ovih gena kod velikog broja gljiva izazivača belog truljenja.

Prema do sada objavljenim rezultatima, veratril alkohol utiče na aktivnost ligninolitičkih enzima gljiva bele truleži na tri načina: (i) indukuje njihovu produkciju (Faison i dr., 1986; Hakala, 2006); (ii) stabilizuje ih sprečavajući inaktivaciju i proteolizu (Cancel i dr., 1993) i (iii) služi kao medijator u procesima biodegradacije (Harvey i dr., 1986; Cui i Dolphin, 1991). Hakala i dr. (2006) su povećanje aktivnosti MnP kod *Physisporinus rivulosus* u prisustvu veratril alkohola objasnili indukcijom transkripcije *mnp* gena. Kasnija istraživanja su pokazala i pozitivan efekat ovog jedinjenja na aktivnost lakaze, pre svega kod vrsta roda *Trametes* (Xavier i dr., 2007; Piscitelli i dr., 2011). Njegovu ulogu medijatora u procesima razgradnje lignina potvrdila su brojna proučavanja gljiva bele truleži, uključujući i *T. versicolor*. Naime pokazano je da ove vrste u toku procesa delignifikacije proizvode veratril alkohol kao sekundarni metabolit koji u formi katjonskog radikala ima ulogu redoks-medijatora (Lundquist i Kirk, 1978; Kawai i dr., 1987; Cui i Dolphin, 1991; Asgher i dr., 2012). Međutim, reakcija na prisustvo aromatičnih jedinjenja varira od vrste do vrste (Gianfreda i dr., 1999; Xu, 1999; Galhaup i dr., 2002b; Piscitelli i dr., 2011).

4.2. Inter- i intraspecijska varijabilnost u svojstvima Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza i nivou degradacije pšenične slame unutar roda *Trametes*

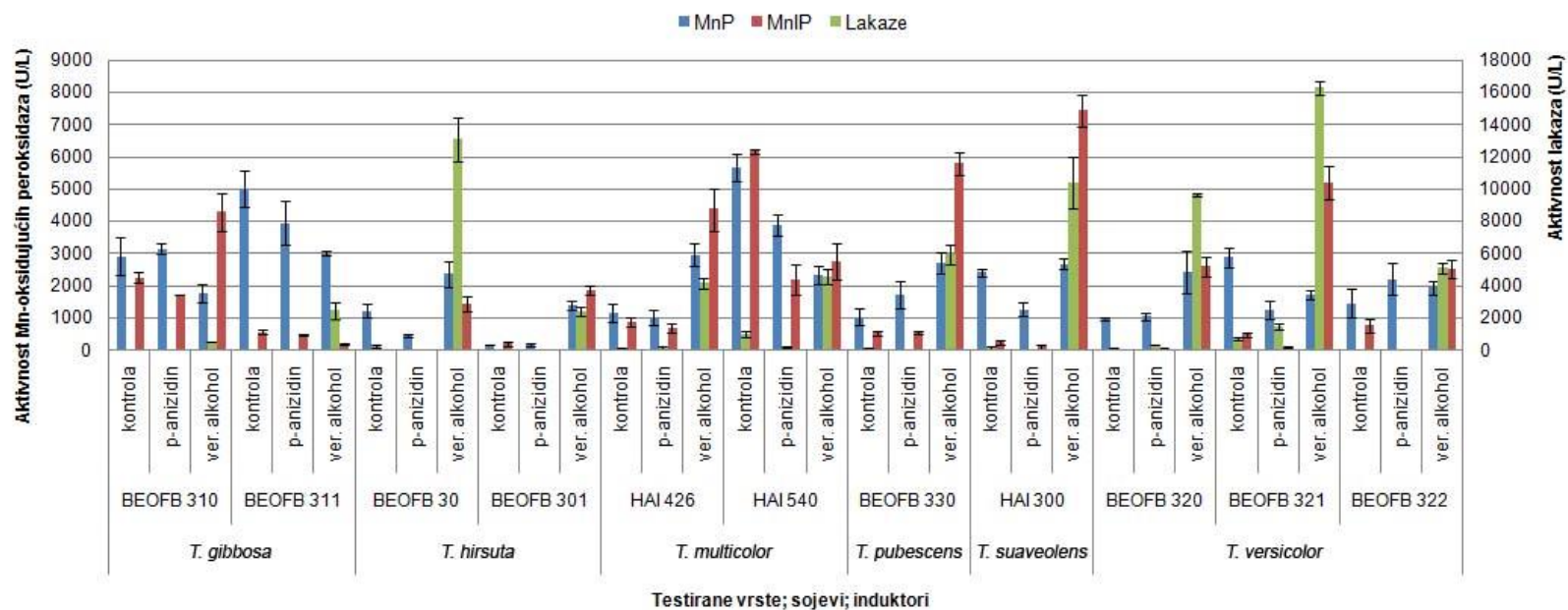
Kultivacijom testiranih vrsta i sojeva roda *Trametes* pod ranije definisanim optimalnim uslovima (19-dnevna čvrsta fermentacija slama/(NH₄)₂SO₄/mekinje medijuma obogaćenog sa *p*-anizidinom u koncentraciji od 1,0 mM ili veratril alkoholom u zapreminskom udelu od 0,5%) praćeni su aktivnost i izoenzimski profili njihovih ligninolitičkih enzima, kao i sposobnosti da razlažu lignin, hemicelulozu i celulozu pšenične slame. (NH₄)₂SO₄ je

korišćen u predhodno definisanoj optimalnoj koncentraciji azota od 10 mM, mekinje su bile zastupljene sa 10%, a induceri su dodavani trećeg dana inkubacije.

4.2.1. Varijabilnosti u aktivnosti enzima

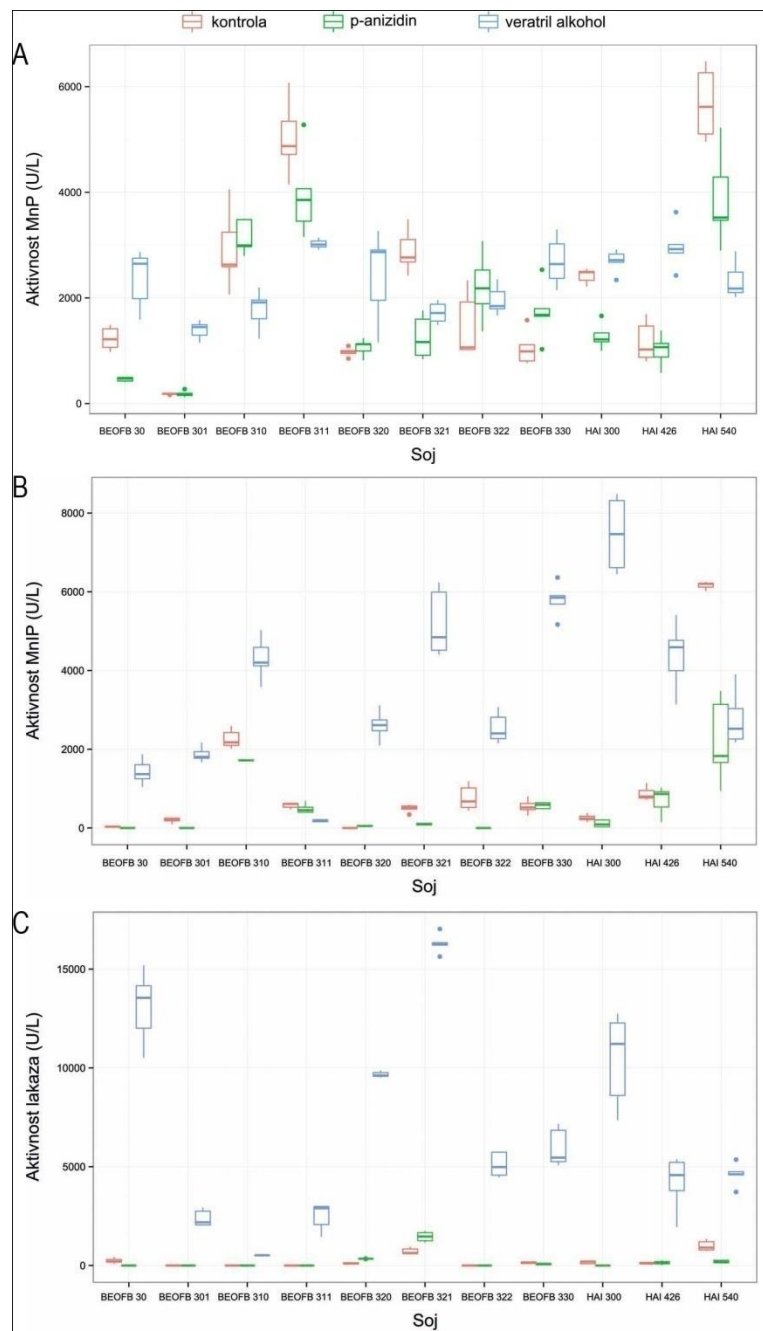
Proučavane vrste i sojevi roda *Trametes* su pokazali različite nivoe aktivnosti Mn-oksidišućih peroksidaza. Najveća aktivnost MnP u odsustvu induktora zabeležena je kod *T. multicolor* HAI 540 ($5683,8 \pm 439,1$ U/L) a najniža kod *T. hirsuta* BEOFB 301 ($181,8 \pm 8,7$ U/L) (Grafik 9). *p*-anizidin je neznatno indukovao aktivnost ovog enzima samo kod *T. pubescens* BEOFB 330 i *T. versicolor* BEOFB 322, inhibitorno je delovao na *T. gibbosa* BEOFB 311, *T. hirsuta* BEOFB 30, *T. suaveolens* HAI 300, *T. versicolor* BEOFB 321 i *T. multicolor* HAI 540, dok su *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301, *T. multicolor* HAI 426 i *T. versicolor* BEOFB 320 bili indiferentni. Veratril alkohol je stimulatивно delovao na aktivnost MnP kod većine proučavanih sojeva izuzev kod *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. versicolor* BEOFB 321 i *T. multicolor* HAI 540 gde je imao inhibitorni efekat i kod *T. suaveolens* HAI 300 gde nije imao efekta. Najveći nivo MnIP aktivnosti zabeležen je takođe kod *T. multicolor* HAI 540 ($6160,9 \pm 70,7$ U/L), dok kod *T. hirsuta* BEOFB 30 i *T. versicolor* BEOFB 320 ovaj enzim nije detektovan. *p*-anizidin je uglavnom imao inhibitorni efekat izuzev kod *T. gibbosa* BEOFB 311 i *T. pubescens* BEOFB 330 kod kojih nije uticao na aktivnost enzima. Suprotno ovome, veratril alkohol je indukovao MnIP aktivnost kod svih sojeva, posebno kod *T. suaveolens* HAI 300 gde je aktivnost bila čak 29,2 puta veća u odnosu na kontrolu. Značajnija inhibicija MnIP zabeležena je samo kod *T. gibbosa* BEOFB 311 i *T. multicolor* HAI 540 (Grafik 9).

U odsustvu veratril alkohola većina proučavanih sojeva nije produkovala lakaze izuzev *T. multicolor* HAI 540 kod koga je u kontrolnim uslovima aktivnost bila $995,5 \pm 183,1$ U/L (Grafik 9). Sa dodatkom veratril alkohola zabeležen je značajan porast aktivnosti enzima pre svega kod *T. hirsuta* BEOFB 30, *T. suaveolens* HAI 300, *T. versicolor* BEOFB 320 i posebno *T. versicolor* BEOFB 321 kod koga je porast bio najveći, čak 22,7 puta ($16291,4 \pm 405,9$ U/L). *p*-anizidin je indukovao lakaznu aktivnost samo kod *T. versicolor* BEOFB 321, dok je kod ostalih sojeva delovao kao inhibitor.



Grafik 9. Inter- i intraspecijska varijabilnost u aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza unutar roda *Trametes* nakon 19 dana čvrste fermentacije slama/(NH₄)₂SO₄/mekinje medijuma obogaćenog induktorom

Rezultati statističkih analiza su pokazali da postoji varijabilnost u aktivnosti studiranih ligninolitičkih enzima između testiranih sojeva vrsta roda *Trametes* kao posledica tretmana *p*-anizidinom i veratril alkoholom (Grafik 10).



Grafik 10. Aktivnost Mn-zavisne peroksidaze (A), Mn-nezavisne peroksidaze (B) i lakaze (C) po sojevima testiranih vrsta roda *Trametes* i tretmanima

Dvofaktorska analiza varijanse aktivnosti MnP, MnIP i lakaza pokazala je da su soj, tretman induktorima i njihova interakcija statistički značajni faktori koji utiču na aktivnost ovih enzima (Tabela 5). Dobijene $F_{32,132}$ vrednosti za testirane enzime su bile: za MnP 38,45 ($P < 0,001$), za MnIP 38,45 ($P < 0,001$), a za lakaze 38,45 ($P < 0,001$).

Tabela 5. Rezultati dvofaktorske analize varijanse nivoa aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze po sojevima testiranih vrsta roda *Trametes* i tretmanima

	Faktor	Df	SS	MS	F-vrednost	P vrednost
Mn-zavisne peroksidaze	Soj	10	163039064,00	16303906,00	77,10	< 0,001
	Tretman	2	7650931,00	3825466,00	18,09	< 0,001
	Soj × tretman	20	89512051,00	4475603,00	21,16	< 0,001
Mn-nezavisne peroksidaze	Soj	10	175071644,00	17507164,00	109,10	< 0,001
	Tretman	2	272314541,00	136157271,00	848,60	< 0,001
	Soj × tretman	20	240337869,00	12016893,00	74,90	< 0,001
Lakaze	Soj	10	$4,825 \times 10^8$	48249927,00	116,33	< 0,001
	Tretman	2	$1,587 \times 10^9$	793406587,00	1912,91	< 0,001
	Soj × tretman	20	$7,516 \times 10^8$	37581637,00	90,61	< 0,001

Rezultati Tukijevih post-hoc testova su pokazali da postoje razlike i između tretmana (Tabela 6) i između sojeva (Tabela 7). Efekat *p*-anizidina na aktivnost MnP se značajno razlikovao u odnosu na kontrolu i veratril alkohol (Tabela 6; Grafiku 10A). Značajne razlike između tretmana induktorima na nivou soja su zabeležene i u slučaju aktivnosti MnIP. Kod lakaza se jedino veratril alkohol statistički značajno razlikovao u pogledu efekta na aktivnost ovog enzima, tj. u odnosu na kontrolu i *p*-anizidin značajno je indukovao aktivnost (Tabela 6; Grafiku 10C).

Tabela 6. Tukijev post-hoc test razlika između tretmana u analizi varijanse aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze po sojevima i tretmanima

Enzimi	Upoređeni tretmani		
		Kontrola	<i>p</i> -anizidin
Mn-zavisne peroksidaze	<i>p</i> -anizidin	< 0,001	
	Veratril alkohol	0,9357	< 0,001
Mn-nezavisne peroksidaze	<i>p</i> -anizidin	< 0,001	
	Veratril alkohol	< 0,001	< 0,001
Lakaze	<i>p</i> -anizidin	0,9754	
	Veratril alkohol	< 0,001	< 0,001

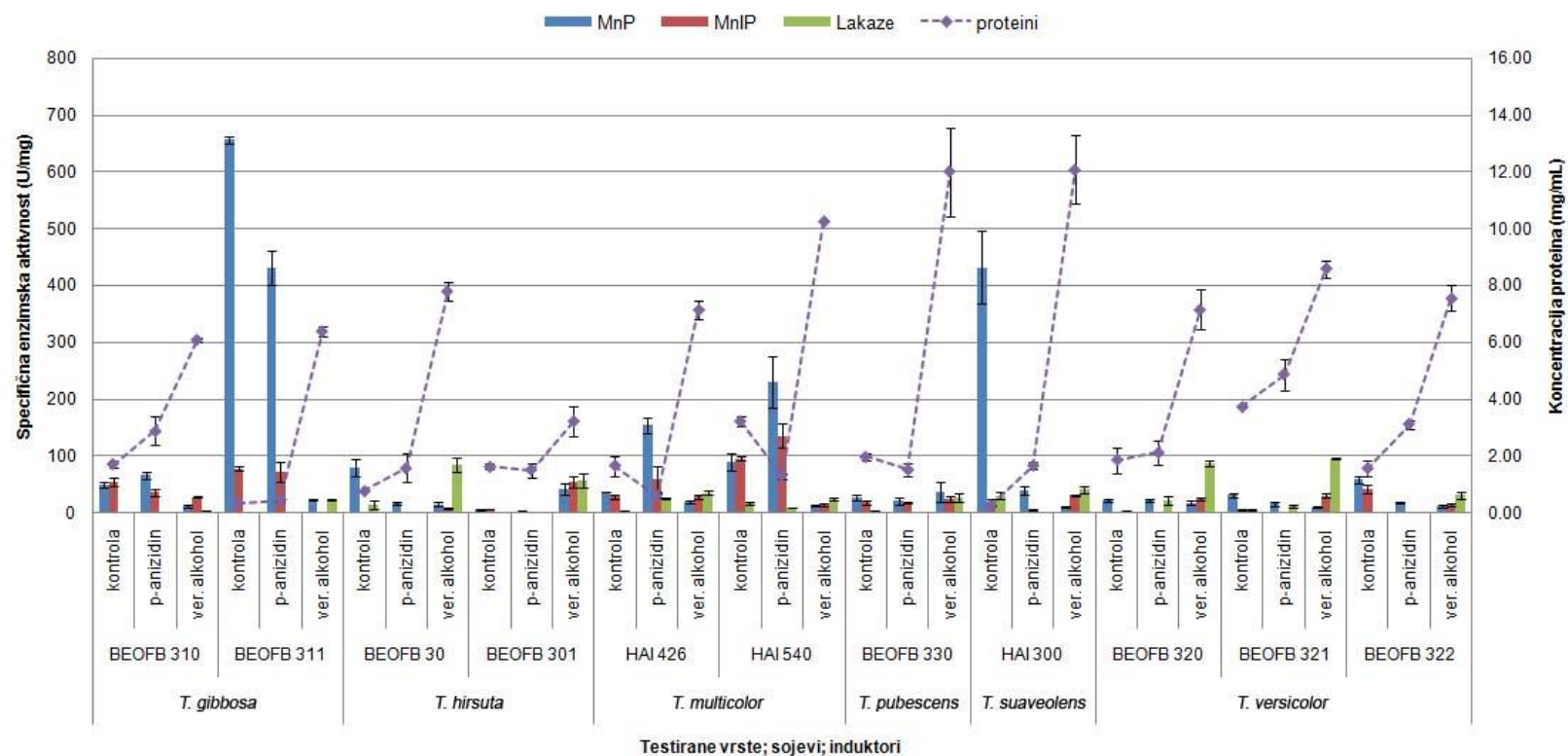
Tabela 7. Tukijev post-hoc test razlika između sojeva testiranih vrsta roda *Trametes* u analizi varijanse aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze po sojevima i tretmanima

Enzimi	Upoređeni parovi sojeva										
		BEOFB 30	BEOFB 301	BEOFB 310	BEOFB 311	BEOFB 320	BEOFB 321	BEOFB 322	BEOFB 330	HAI 300	HAI 426
MnP	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	< 0,001	< 0,001								
	BEOFB 311	< 0,001	< 0,001	< 0,001							
	BEOFB 320	0,999	< 0,001	< 0,001	< 0,001						
	BEOFB 321	< 0,050	< 0,001	< 0,010	< 0,001	0,175					
	BEOFB 322	0,075	< 0,001	< 0,010	< 0,001	0,425	1,000				
	BEOFB 330	0,160	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,634	0,999	1,000			
	HAI 300	< 0,001	< 0,001	0,135	< 0,001	< 0,010	0,994	0,920	0,782		
	HAI 426	0,539	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,957	0,938	0,996	0,999	0,337	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1,000	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
MnIP	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	< 0,001	< 0,001								
	BEOFB 311	1,000	0,736	< 0,001							
	BEOFB 320	0,201	0,960	< 0,001	0,061						
	BEOFB 321	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001					
	BEOFB 322	< 0,050	0,161	< 0,001	< 0,001	0,922	< 0,001				
	BEOFB 330	< 0,001	< 0,001	0,072	< 0,001	< 0,001	0,291	< 0,001			
	HAI 300	< 0,001	< 0,001	0,994	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,569		
	HAI 426	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	1,000	< 0,001	0,528	< 0,050	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Lakaze	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	< 0,001	0,229								
	BEOFB 311	< 0,001	1,000	0,170							
	BEOFB 320	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001						
	BEOFB 321	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001					
	BEOFB 322	< 0,001	< 0,050	< 0,001	< 0,010	< 0,001	< 0,001				
	BEOFB 330	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,909			
	HAI 300	< 0,050	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,999	< 0,001	< 0,001	< 0,001		
	HAI 426	< 0,001	0,126	0,174	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,998	0,353	< 0,001	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,995	1,000	< 0,001	0,709

Ukupna produkcija proteina je bila najveća u prisustvu veratril alkohola ($12,0 \pm 1,6$ mg/mL kod *T. pubescens* BEOFB 330) što je bilo oko 3,2 puta više od maksimalne količine produkovane u kontrolnim uslovima ($3,7 \pm 0,1$ mg/mL kod *T. versicolor* BEOFB 321) odnosno oko 1,3 puta više u odnosu na maksimum dobijen u prisustvu *p*-anizidina ($4,9$ mg/mL kod *T. versicolor* BEOFB 321). Ovakav profil produkcije proteina reflektovao se na specifičnu aktivnost enzima (Grafik 11). U poređenju sa kontrolom ($30,7 \pm 6,1$ U/mg kod *T. sualveolens* HAI 300), specifična aktivnost lakaze je bila znatno veća u prisustvu veratril alkohola ($95,0 \pm 1,4$ U/mg kod *T. versicolor* BEOFB 321) odnosno manja u *p*-anizidin-

obogaćenom medijumu ($25,9 \pm 1,1$ U/mg kod *T. multicolor* HAI 426). Međutim, veratril alkohol je imao suprotno dejstvo na specifične aktivnosti Mn-oksidiujućih peroksidaza. Specifična aktivnost MnP je imala trend opadanja sa dodatkom induktora od $656,6 \pm 5,6$ U/mg u kontrolnim uslovima (*T. gibbosa* BEOFB 311) preko $431,9 \pm 30,4$ U/mg u prisustvu *p*-anizidina (*T. gibbosa* BEOFB 311) do svega $43,0 \pm 9,9$ U/mg u veratril alkohol-obogaćenom medijumu (*T. hirsuta* BEOFB 301). Maksimalna vrednost specifične aktivnosti MnIP zabeležena je kod *T. multicolor* HAI 540 u prisustvu *p*-anizidina ($135,9 \pm 21,8$ U/mg) koja je bila za oko 30% veća od one u kontroli ($95,6 \pm 3,9$ U/mg) odnosno za oko 60% veća od one u prisustvu veratril alkohola ($54,9 \pm 10,3$ U/mg kod *T. hirsuta* BEOFB 301) (Grafik 11).

Dobijeni rezultati su pokazali postojanje inter- i intraspecijske varijabilnosti u produkciji Mn-oksidiujućih peroksidaza i lakaza unutar roda *Trametes*. Značajne interspecijske razlike su zabeležene u produkciji pre svega MnP. Naime, za razliku od *T. multicolor* kod koga je ovaj enzim bio najaktivniji, aktivnost dobijena pri fermentaciji slama/(NH₄)₂SO₄/mekinje medijuma sa *T. hirsuta* je bila oko 30 puta niža. Ovi rezultati su bili u saglasnosti sa onima koje su saopštili Erden i dr. (2009) za *T. versicolor* i *T. hirsuta*. Uticaj sastava biljnog materijala i prisustva brojnih induktora na aktivnost ligninolitičkih enzima bio je predmet brojnih istraživanja (Galhaup i Haltrich, 2001; Galhaup i dr, 2002b; Xavier i dr, 2007; Elisashvili i dr., 2010; Ćilerdžić i dr, 2011; Knežević i dr, 2013a,b; Bakkiyaraj i dr, 2013). Knežević i dr. (2013a,b) su pokazali da je za produkciju Mn-oksidiujućih peroksidaza kod *T. sualveolens*, *T. pubescens* i *T. multicolor* piljevina hrasta bila mnogo bolji supstrat od pšenične slame koja je bila optimalni supstrat za sintezu lakaza što nije bilo u saglasnosti sa rezultatima Ćilerdžić i dr. (2011). Naime, pri fermentaciji slame sa *T. hirsuta* zabeležena je maksimalna aktivnost Mn-oksidiujućih peroksidaza, dok su kore mandarina bile mnogo bolji supstrat za produkciju lakaza.



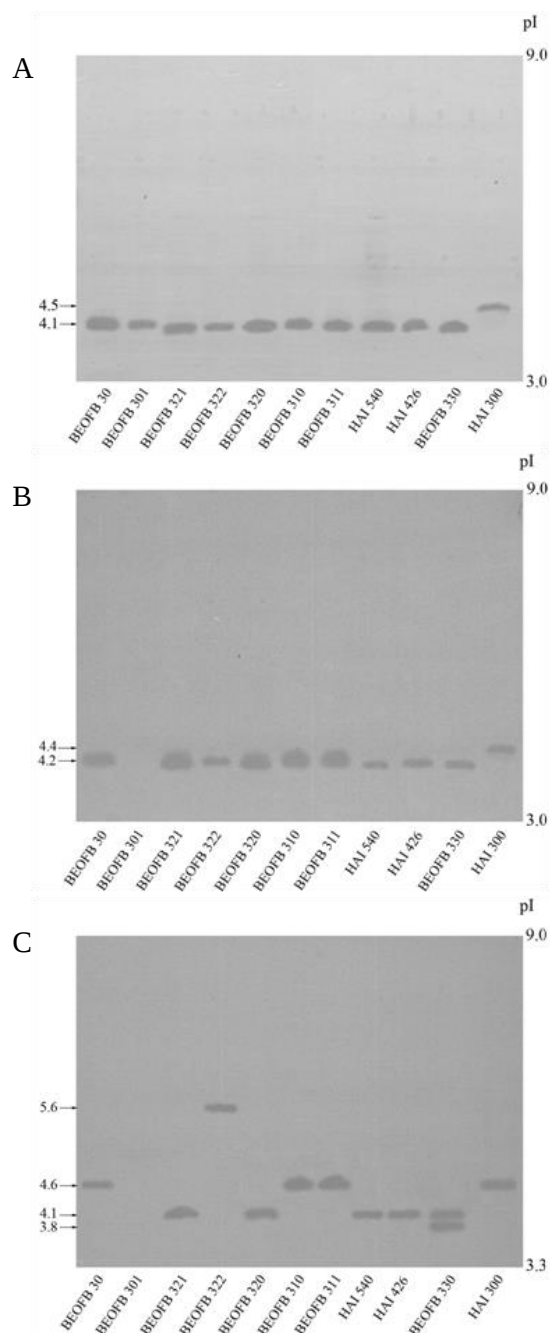
Grafik 11. Inter- i intraspecijska varijabilnost u produkciji proteina i specifičnoj aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza unutar roda *Trametes* nakon 19 dana čvrste fermentacije slama/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /mekinje medijuma obogaćenog induktorom

Pšenična slama i mekinje su zbog svog hemijskog sastava odlični supstrati za konverziju u biomasu gljiva i ligninolitičke enzime. Naime, slama je bogata celulozom (33,7 - 47,5%), hemicelulozom (25 - 32%) i ligninom (11 - 23%), kao i makro- i mikroelementima neophodnim za sintezu enzima: Ca (1130 - 8230 ppm), Cu (3 - 6 ppm), Fe (21 - 175 ppm), Mn (9 - 128 ppm), Zn (7 - 25 ppm) (Panthapulakkal i dr, 2006; Salvachúa i dr., 2011; Khan i Mubeen, 2012; Ghaffar i Fan, 2013), a mekinje pored nerastvorljivih vlakana sadrže i lignin, fenolnu kiselinu i minerale (Stevenson i dr, 2012). Međutim, odsustvo ili veoma nisku aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaze Collins i Dobson (1997) su objasnili specifičnim fiziološkim karakteristikama svakog soja i faktorima koji regulišu ekspresiju njihovih gena na transkripcionom nivou. Jedan od tih faktora je odgovarajući induktor sinteze i aktivnosti ligninolitičkih enzima (Galhaup i Haltrich, 2001; Xavier i dr., 2007; Bakkiyaraj i dr., 2013). Galhaup i Haltrich (2001) su zabeležili stimulatívni efekat *p*-anizidina a Xavier i dr. (2007) veratril alkohola na aktivnost lakaze *T. pubescens* odnosno *T. versicolor* što nije bilo u saglasnosti sa rezultatima Galhaup i dr. (2002b) i Bakkiyaraj i dr. (2013) koji su saopštili njihov inhibitorni uticaj. Pozitivan efekat dodavanja veratril alkohola i drugih induktora medijumu na sintezu Mn-oksidujućih peroksidaza kod mnogih vrsta izazivača belog truljenja pokazali su i Kapich i dr. (2004) i Hakala i dr. (2006). Veratril alkohol je stimulisao produkciju MnP pri fermentaciji pšenične slame sa *Phanerochaete chrysosporium* (Kapich i dr., 2004) odnosno asparagin-sukcinatog medijuma sa *Physisporinus rivulosus* (Hakala i dr., 2006) regulišući transkripciju MnP gena.

4.2.2. Varijabilnosti u izoenzimskim profilima enzima

Sojevi testiranih vrsta roda *Trametes* su nakon 19-dnevne čvrste fermentacije slama/(NH₄)₂SO₄/mekinje medijuma sintetisali po jednu izoformu MnP (pI 4,1, izuzev kod *T. suaveolens* HAI 300 gde je bila baznija, pI 4,5) i jednu MnIP (pI 4,1) izuzev *T. hirsuta* BEOFB 30 gde su detektovane dve izoforme pI 4,1 i 4,3 (Slike 12A, 13A). U slučaju lakaza slika je bila kompleksnija (Slika 14A). Naime, ako se izuzme *T. versicolor* BEOFB 322 koji je sintetisao 4 izoforme (pI 4,2; 4,7; 5,6; 6,3) kod svih ostalih sojeva je detektovana po

jedna izoforma ovog enzima (pI 4,2 izuzev *T. hirsuta* BEOFB 30 gde je pI bila 4,4). Dodavanje induktora je različito uticalo na profile izoformi ovih enzima kod studiranih sojeva.

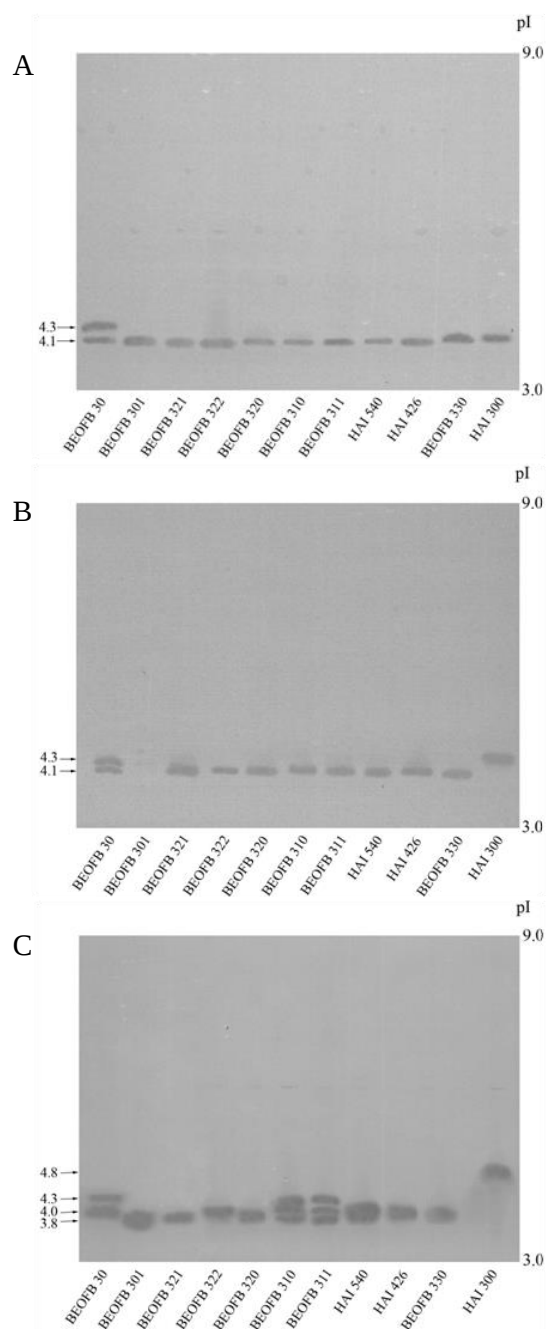


Slika 12. IEF profili Mn-zavisnih peroksidaza sojeva testiranih vrsta roda *Trametes* u zavisnosti od prisustva induktora. **A.** kontrola; **B.** *p*-anizidin; **C.** veratril alkohol

Prisustvo *p*-anizidina nije izazivalo promene u MnP profilima izuzev kod *T. hirsuta* BEOFB 301 gde je inhibirao sintezu ovog enzima (Slika 12B). Nasuprot ovome, efekat veratril alkohola je zavisio od soja (Slika 12C). Tako, kod sojeva *T. gibbosa*, *T. hirsuta* BEOFB 30 i *T. versicolor* BEOFB 320 vodio sintezi izoformi MnP sa većim pI vrednostima, kod *T. pubescens* BEOFB 330 stimulisao sintezu još jedne izoforme pI 3,8, kod *T. hirsuta* BEOFB 301 u potpunosti inhibirao produkciju enzima dok na MnP *T. hirsuta* BEOFB 301, oba soja *T. multicolor*, *T. pubescens* BEOFB 330, *T. sualveolens* HAI 300 i dva soja *T. versicolor* (BEOFB 321 i BEOFB 322) nije delovao.

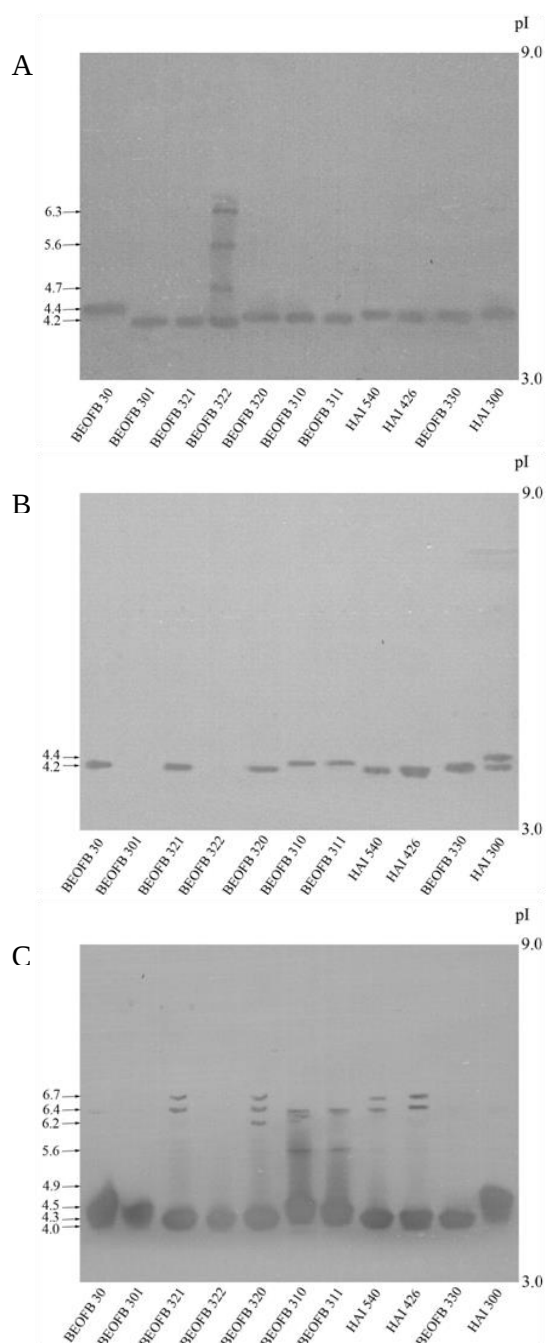
Mn-nezavisne peroksidaze testiranih sojeva *Trametes* spp. su slično reagovala na prisustvo proučavanih induktora. Naime, *p*-anizidin je izazvao neznatnu promenu pI samo kod MnIP izoforme *T. suaveolens* HAI 300 (pI 4,3) i inhibiciju sinteze ovog enzima kod *T. hirsuta* BEOFB 301 (Slika 13B). Kao i kod MnP, efekat veratril alkohola na svojstva MnIP se razlikovao u zavisnosti od soja (Slika 13C). Kod oba soja *T. gibbosa* ovaj induktor je stimulisao sintezu čak tri MnIP izoforme čije su pI bile u opsegu od 3,8 do 4,3, kod *T. suaveolens* HAI 300 delovao je na povećanje pI produkovanе izoforme (pI 4,8), dok su ostali sojevi bili indiferentni na njegovo prisustvo.

Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da iako je *p*-anizidin izazivao promene pI izoformi Mn-oksidujućih peroksidaza u odnosu na kontrolne uslove, nije uticao na tip njihove sinteze pa se razlike u aktivnostima mogu pripisati nivou sinteze u toku fermentacije medijuma. S obzirom da u ekstraktu *T. hirsuta* BEOFB 301 dobijenom nakon kultivacije na medijuma obogaćenom ovim induktorom nisu detektovane ni MnP ni MnIP može se govoriti o njegovom inhibitornom dejstvu na sintezu enzima. Stimulacija sinteze više od jedne izoforme Mn-oksidujućih peroksidaza veratril alkoholom može se zasnivati ili na ekspresiji više od jednog *mnp* gena ili na učešću ovog induktora u post-translacionoj modifikaciji molekula enzima.



Slika 13. IEF profili Mn-nezavisnih peroksidaza sojeva testiranih vrsta roda *Trametes* u zavisnosti od prisustva induktora. **A.** kontrola; **B.** *p*-anizidin; **C.** veratril alkohol

Međutim, efekat induktora na sintezu lakaza kod ispitivanih sojeva vrsta roda *Trametes* se znatno razlikovao (Slika 14B, C).



Slika 14. IEF profili lakaza sojeva testiranih vrsta roda *Trametes* u zavisnosti od prisustva induktora. **A.** kontrola; **B.** *p*-anizidin; **C.** veratril alkohol

Prisustvo *p*-anizidina je ili stimulisalo (dve izoforme pI 4,2 i 4,4 su detektovane kod *T. suaveolens* HAI 300) ili inhibiralo sintezu lakaza što je bio slučaj kod *T. gibbosa* BEOFB

310 i *T. versicolor* BEOFB 322 kod kojih nije zabeležena ni jedna izoforma ovog enzima (Slika 14B). Nasuprot *p*-anizidinu, efekat veratril alkohola je bio stimulativan kod svih sojeva izuzev *T. versicolor* BEOFB 322 gde je inhibirao sintezu tri izoforme pI 4,7; 5,6 i 6,3 koje su bile prisutne u kontroli. U prisustvu ovog inducera sojevi *T. gibbosa* su produkovali dve izoforme pI 5,6 i 6,4, sojevi *T. multicolor* (HAI 426 i HAI540) i *T. versicolor* BEOFB 322 izoforme pI 6,4 i 6,7, a *T. versicolor* BEOFB 320 čak tri izoforme pI 6,2, 6,4 i 6,7 (Slika 14C).

Interesantno je da su izoelektričnim fokusiranjem lakaze detektovane kod svih sojeva testiranih *Trametes* spp. kultivisanih u odsustvu induktora iako njihove aktivnosti nisu zabeležene spektrofotometrijski kod sojeva *T. gibbosa*, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 322, što se može objasniti veoma malom količinom sintetisanog enzima. S druge strane, sa sigurnošću se može reći da je *p*-anizidin inhibirao sintezu lakaze kod *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 322 (nije detektovana ni spektrofotometrijski ni izoelektričnim razdvajanjem) a da je kod sojeva *T. gibbosa* samo smanjivao produkciju. Pojava širokih proteinskih traka nakon tretmana veratril alkoholom najverovatnije je rezultat tačkastih promena u amino-kiselinskom sastavu ili malih post-translacionih promena molekula lakaze. Ovakav efekat se može očekivati pošto se sinteza lakaza nalazi pod kontrolom familija blisko postavljenih gena (Blaich i Esser, 1975; Chen i dr., 2003; Hoegger, 2006; Salony i dr., 2008; Janusz i dr., 2013) koje nastaju duplikacijom gena (Valderrama i dr., 2003). Zbog toga tačkaste mutacije koje se evolutivno dešavaju vode sintezi lakaza koje se neznatno razlikuju po sastavu i poziciji amino-kiselina pa samim tim i pI vrednostima, što se ogleda kroz gusto zbijene proteinske trake na gelu (Slika 14C). Ista reakcija sojeve *T. gibbosa*, *T. multicolor* odnosno *T. versicolor* na prisustvo veratril alkohola, tj. sinteza dodatne izoforme iste pI na nivou vrste, može se objasniti genetičkom sličnošću unutar vrste. Sintaza izoformi istih pI kod različitih vrsta roda *Trametes* je rezultat postojanja zajedničkih gena unutar genskih familija za lakaze, pošto se zna da je amino-kiselinski sastav direktno odgovoran za pI vrednosti enzima. Tako izoforme pI 6,2 i 6,4 ukazuju na veću interspecijsku sličnost između *T. multicolor* i *T. versicolor*.

4.2.3. Varijabilnosti u kapacitetu degradacije polimera pšenične slame

Zastupljenost lignina, hemiceluloze i celuloze u korišćenoj pšeničnoj slami bio je 9,7%, 29,5% odnosno 35,5%. Stopa degradacije ovih polimera se razlikovala između vrsta i sojeva i u nekim slučajevima nije bila u pozitivnoj korelaciji sa nivoom enzimske aktivnosti.

Najveći kapacitet razgradnje lignina u kontrolnim uslovima imao je *T. gibbosa* BEOFB 311 (51,8%) a najmanji *T. multicolor* HAI 540 (31,3%). Dodatak induktora u medijum je stimulisao ali i inhibirao degradaciju lignina u zavisnosti od vrste odnosno soja. U poređenju sa kontrolom, dodatak *p*-anizidina povećao je procenat razloženog lignina za 3,3% do 16,4% prilikom fermentacije supstrata sa *T. versicolor* BEOFB 322, *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. multicolor* HAI 540 i *T. hirsuta* BEOFB 301 i BEOFB 30. Prisustvo veratril alkohola je imalo različite efekte na delignifikacioni kapacitet proučavanih sojeva. Tako je kod *T. multicolor* HAI 540, *T. versicolor* BEOFB 322 i oba soja *T. hirsuta* povećavao stopu degradacije za 5,3% do 9,3%, na *T. multicolor* HAI 426 i *T. versicolor* BEOFB 320 nije uticao, dok je na ostale delovao inhibitorno (Tabela 8).

Najveći potencijal razgradnje hemiceluloze u kontrolnim uslovima imao je *T. gibbosa* BEOFB 310 ($54,9 \pm 0,5\%$) a najmanji *T. sualveolens* HAI 300 ($38,3 \pm 1,0\%$). Prisustvo induktora je kod većine vrsta i sojeva delovalo inhibitorno na sposobnost depolimerizacije ovog polimera. U odnosu na kontrolu, *p*-anizidin je povećao kapacitet razgradnje hemiceluloze samo kod *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321 za 5,9% odnosno 7,4%, na *T. gibbosa* BEOFB 311 skoro da nije delovao, dok je na sve ostale sojeve njegov efekat bio inhibitoran. Slično je bilo i sa veratril alkoholom u čijem prisustvu je količina razgrađene hemiceluloze samo sa *T. versicolor* BEOFB 321 i BEOFB 322, *T. sualveolens* HAI 300 i *T. hirsuta* BEOFB 301 bila za 1,8 - 4,9% veća (Tabela 8).

Kapacitet razgradnje celuloze svih testiranih vrsta i sojeva bio je mnogo manji u poređenju sa sposobnošću depolimerizacije hemiceluloze i lignina. U kontrolnim uslovima najveći stepen degradacije celuloze zabeležen je u prisustvu *T. multicolor* HAI 540 (40,2%) a najmanji u prisustvu *T. pubescens* BEOFB 330 (17,2%). *p*-anizidin je bio slabiji induktor kada je degradacija celuloze u pitanju, a pokazao je i inhibitorno dejstvo na *T. gibbosa*

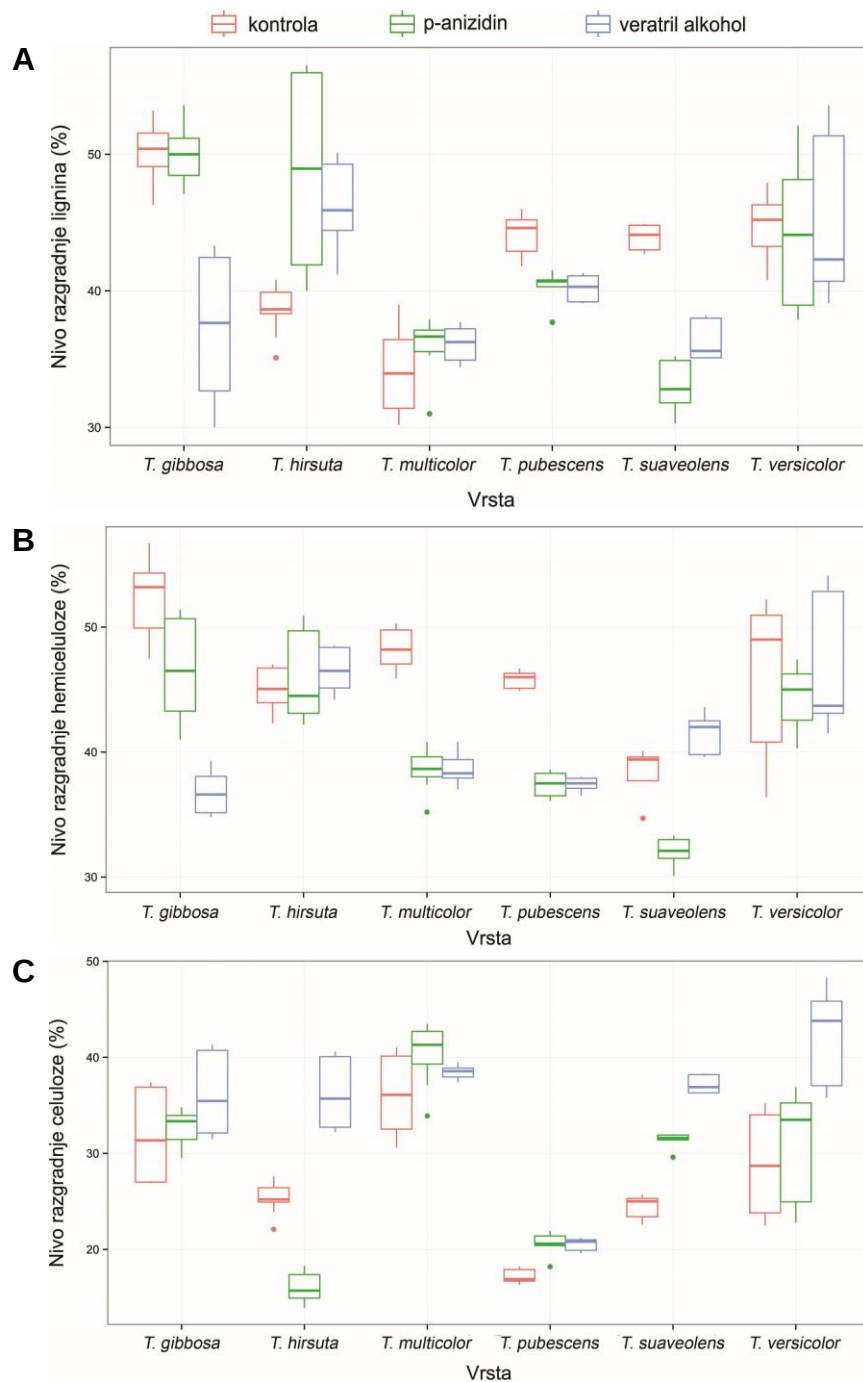
BEOFB 311, sojeve *T. hirsuta*, *T. versicolor* BEOFB 322 i *T. zonata* HAI 540. Međutim, dodatak veratril alkohola medijumu je povećavao stopu razgradnje kod svih vrsta i sojeva pa je količina degradovane celuloze bila veća za 2,5% (*T. zonata* HAI 540) do 18,9% (*T. pubescens* BEOFB 330). (Tabela 8). Generalno, *T. multicolor* HAI 426 je bio najbolji razlagač ovog polimera ($48,7 \pm 0,3\%$, u prisustvu veratril alkohola), a *T. hirsuta* BEOFB 301 najslabiji ($14,7 \pm 0,3\%$, u prisustvu *p*-anizidina).

Ranija proučavanja su pokazala da je količina razloženog lignina u toku fermentacije pšenične slame sa *T. versicolor* varirala između 12% (nakon 16 dana fermentacije) i čak 42% (nakon 35 dana kultivacije pšeničnoj slami obogaćenoj glukozom) (Zafar i dr., 1996; Arora i dr., 2002). U poređenju sa ovim rezultatima, stopa delignifikacije proučavanim vrstama i sojevima roda *Trametes* je bila veća, od 31,3% sa *T. zonata* HAI 540 (u kontrolnim uslovima) do 56,0% sa *T. hirsuta* BEOFB 30 (u prisustvu *p*-anizidina). Razgradnja lignina bi se uglavnom mogla pripisati Mn-oksidujućim peroksidazama pošto je sinteza lakaza ili bila odsutna ili je bila slabo indukovana veratril alkoholom. Međutim, ne samo zbog neznatnog potencijala produkcije lakaza već i zbog veličine molekula ligninolitičkih enzima koja im onemogućava prodiranje u nemodifikovani biljni ćelijski zid, Mn-oksidujuće peroksidaze imaju glavnu ulogu u toku inicijalne faze degradacije lignina. Takođe, kod mnogih testiranih sojeva vrsta roda *Trametes* stopa delignifikacije nije bila u pozitivnoj korelaciji sa nivoom enzimске aktivnosti. Na primer, visoki kapacitet degradacije lignina u prisustvu *p*-anizidina je bio karakteristika *T. hirsuta* BEOFB 30 kod koga je zabeležena veoma niska aktivnost MnP i potpuno odsustvo aktivnosti MnIP i lakaze, dok je najniži nivo delignifikacije bio sa *T. multicolor* BEOFB 540, i u kontrolnim uslovima i u prisustvu induktora, kod koga su aktivnosti svih enzima bile visoke. Znatno nivo razgradnje hemiceluloze (32,0 - 54,9%) i celuloze (14,7 - 48,7%) je očekivani rezultat fermentacije supstrata testiranim vrstama i sojevima koje pripadaju grupi gljiva izazivača belog truljenja i kao takve simultano razlažu kako lignin tako i ova dva polimera (Schmidt, 2006). Međutim najselektivniji u degradaciji lignina su bili *T. hirsuta* BEOFB 30 (56,0:17,4%) i *T. pubescens* BEOFB 330 (44,1:17,2%), u kontrolnim uslovima, i *T. hirsuta* BEOFB 301 u prisustvu *p*-anizidina (41,6:14,7%).

Tabela 8. Uticaj induktora na kapacitet odabranih vrsta i sojeva roda *Trametes* da razlažu polimere pšenične slame

Vrsta	Soj	Uslovi kultivacije	Masa uzorka nakon fermentacije [mg]	Sastav polimera u uzorku [mg]			Nivo razgradnje [%]		
				lignin	hemiceluloza	celuloza	lignin	hemiceluloza	celuloza
Trametes gibbosa	BEOFB 310	kontrola	1250,0 ± 1,9	100,0 ± 1,5	266,4 ± 2,9	517,6 ± 1,1	48,3 ± 0,8	54,9 ± 0,5	27,1 ± 0,2
		p-anizidin	1307,0 ± 7,5	92,8 ± 1,2	337,2 ± 2,9	487,8 ± 5,6	52,0 ± 0,6	42,9 ± 0,5	31,3 ± 0,8
		veratril alkohol	1334,0 ± 2,8	130,7 ± 1,5	382,7 ± 0,9	482,8 ± 1,0	32,4 ± 0,8	35,2 ± 0,1	32,0 ± 0,1
	BEOFB 311	kontrola	1194,0 ± 9,2	93,2 ± 0,8	295,9 ± 4,5	450,1 ± 3,1	51,8 ± 0,4	49,9 ± 0,8	36,6 ± 0,4
		p-anizidin	1283,0 ± 3,6	100,0 ± 0,7	292,3 ± 2,8	469,3 ± 2,0	48,3 ± 0,4	50,5 ± 0,5	33,9 ± 0,3
		veratril alkohol	1188,0 ± 2,8	111,6 ± 1,0	363,8 ± 2,1	423,2 ± 3,4	42,3 ± 0,5	38,4 ± 0,4	40,4 ± 0,5
Trametes hirsuta	BEOFB 30	kontrola	1359,0 ± 4,3	116,8 ± 1,0	315,4 ± 1,4	538,2 ± 4,0	39,6 ± 0,5	46,6 ± 0,2	24,2 ± 0,6
		p-anizidin	1493,0 ± 5,4	85,1 ± 0,4	337,2 ± 1,0	586,5 ± 2,8	56,0 ± 0,2	42,9 ± 0,2	17,4 ± 0,4
		veratril alkohol	1252,0 ± 4,5	98,8 ± 1,2	325,4 ± 1,1	478,5 ± 0,9	48,9 ± 0,6	44,9 ± 0,2	32,6 ± 0,1
	BEOFB 301	kontrola	1388,0 ± 5,9	120,7 ± 1,5	334,3 ± 2,4	521,9 ± 2,9	37,6 ± 0,8	43,4 ± 0,4	26,5 ± 0,4
		p-anizidin	1212,0 ± 5,6	112,9 ± 0,9	299,4 ± 5,4	605,6 ± 2,0	41,6 ± 0,5	49,3 ± 0,9	14,7 ± 0,3
		veratril alkohol	1506,0 ± 3,0	109,1 ± 1,3	305,3 ± 0,8	426,7 ± 2,6	43,6 ± 0,7	48,3 ± 0,1	39,9 ± 0,4
Trametes multicolor	HAI 426	kontrola	1293,0 ± 4,1	121,5 ± 1,3	300,0 ± 3,6	428,1 ± 3,2	37,2 ± 0,7	49,2 ± 0,6	32,1 ± 0,4
		p-anizidin	1311,0 ± 8,9	124,5 ± 2,2	368,5 ± 3,9	439,5 ± 8,5	35,6 ± 1,2	37,6 ± 0,7	38,1 ± 1,2
		veratril alkohol	1046,0 ± 5,9	124,5 ± 1,1	368,5 ± 1,3	439,5 ± 2,3	37,8 ± 0,6	42,8 ± 0,2	48,7 ± 0,3
	HAI 540	kontrola	1135,0 ± 3,9	132,9 ± 0,7	311,2 ± 3,4	424,6 ± 2,5	31,3 ± 0,3	47,3 ± 0,6	40,2 ± 0,4
		p-anizidin	1277,0 ± 4,6	122,6 ± 1,1	356,1 ± 3,0	406,8 ± 2,2	37,9 ± 0,6	35,1 ± 0,5	38,8 ± 0,3
		veratril alkohol	1179,0 ± 4,5	122,6 ± 1,1	356,1 ± 2,7	434,5 ± 1,9	36,6 ± 0,5	39,7 ± 0,5	42,7 ± 0,3
Trametes pubescens	BEOFB 330	kontrola	1403,0 ± 6,5	108,1 ± 1,5	320,1 ± 2,0	587,9 ± 2,6	44,1 ± 0,8	45,8 ± 0,3	17,2 ± 0,4
		p-anizidin	1521,0 ± 4,0	115,7 ± 1,3	369,7 ± 2,9	564,5 ± 4,5	40,2 ± 0,7	37,4 ± 0,5	20,5 ± 0,6
		veratril alkohol	1182,0 ± 3,5	115,7 ± 0,9	369,7 ± 1,6	564,5 ± 2,2	39,5 ± 0,5	38,4 ± 0,3	36,1 ± 0,3
		kontrola	1390,0 ± 4,1	108,5 ± 0,9	364,4 ± 5,8	536,8 ± 4,2	43,9 ± 0,6	38,3 ± 1,0	24,4 ± 0,5
Trametes suaveolens	HAI 300	p-anizidin	1450,0 ± 6,9	129,6 ± 1,8	401,6 ± 3,4	487,8 ± 3,1	33,0 ± 0,9	32,0 ± 0,6	31,3 ± 0,4
		veratril alkohol	1205,0 ± 5,4	123,0 ± 1,4	345,5 ± 4,6	445,9 ± 3,1	36,4 ± 0,7	41,0 ± 0,8	37,2 ± 0,4
		kontrola	1263,0 ± 6,1	112,4 ± 1,1	300,6 ± 4,5	501,3 ± 4,6	41,9 ± 0,6	49,1 ± 0,8	29,4 ± 0,6
		p-anizidin	1399,0 ± 9,2	118,9 ± 0,5	344,3 ± 2,6	453,0 ± 2,8	38,5 ± 0,2	41,7 ± 0,4	36,2 ± 0,4
Trametes versicolor	BEOFB 320	veratril alkohol	1202,0 ± 7,5	114,1 ± 1,2	336,6 ± 2,6	402,6 ± 2,8	41,0 ± 0,6	43,0 ± 0,4	43,3 ± 0,4
		kontrola	1303,0 ± 6,6	105,6 ± 0,6	357,3 ± 4,8	544,6 ± 1,7	45,4 ± 0,3	39,5 ± 0,8	23,3 ± 0,2
		p-anizidin	1357,0 ± 4,3	108,5 ± 0,8	313,6 ± 2,1	472,2 ± 1,3	43,9 ± 0,4	46,9 ± 0,4	33,5 ± 0,2
	BEOFB 321	veratril alkohol	1198,0 ± 2,4	113,7 ± 1,2	335,5 ± 1,5	449,4 ± 1,7	41,2 ± 0,6	43,2 ± 0,3	36,7 ± 0,2
		kontrola	1185,0 ± 6,1	103,1 ± 0,9	285,9 ± 1,6	464,3 ± 2,0	46,7 ± 0,5	51,6 ± 0,3	34,6 ± 0,3
		p-anizidin	1442,0 ± 5,7	96,7 ± 1,6	326,0 ± 1,9	538,2 ± 3,0	50,0 ± 0,8	44,8 ± 0,3	24,2 ± 0,4
	BEOFB 322	veratril alkohol	1165,0 ± 5,1	92,1 ± 1,0	275,2 ± 1,7	376,3 ± 3,9	52,4 ± 0,2	53,4 ± 0,3	47,0 ± 0,5

Rezultati statističke analize su pokazali da postoji varijabilnost između testiranih vrsta roda *Trametes* u pogledu efekta *p*-anizidina i veratril alkohola na nivo razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze (Grafik 12).



Grafik 12. Kapacitet razgradnje lignina (A), hemiceluloze (B) i celuloze (C) po vrstama roda *Trametes* i tretmanima

Dvofaktorska analiza varijanse razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze je pokazala da su vrsta, tretman induktorima i njihova interakcija statistički značajni faktori koji utiču na procenat razgradnje ovih polimera (Tabela 9). Vrednost F statistike analize za lignin je bila $F_{17,147} = 18,85$ ($P < 0,001$), za hemicelulozu $F_{17,147} = 22,71$ ($P < 0,001$), a za celulozu $F_{17,147} = 41,29$ ($P < 0,001$).

Tabela 9. Rezultati dvofaktorske analize varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze po vrstama roda *Trametes* i tretmanima

Polimeri	Faktor	Df	SS	MS	F-vrednost	P vrednost
Lignin	Vrsta	5	2470,27	494,05	35,14	< 0,001
	Tretman	2	149,74	74,87	5,32	< 0,010
	Vrsta × tretman	10	1886,47	188,65	13,42	< 0,001
Hemiceluloza	Vrsta	5	1348,80	269,80	27,85	< 0,001
	Tretman	2	804,30	402,20	41,52	< 0,001
	Vrsta × tretman	10	1585,70	158,60	16,37	< 0,001
Celuloza	Vrsta	5	5006,00	1001,30	76,35	< 0,001
	Tretman	2	2298,00	1149,20	87,63	< 0,001
	Vrsta × tretman	10	1900,00	190,00	14,49	< 0,001

Rezultati Tukijevih post-hoc testova su pokazali da postoje značajne razlike između tretmana (Tabela 10) i većine ispitivanih vrsta u stepenu razgradnje polimera pšenične slame (Tabela 11).

Tabela 10. Tukijev post-hoc test razlika između tretmana u analizi varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze po vrstama i tretmanima

Polimeri	Upoređeni tretmani		
		Kontrola	p-anizidin
Lignin	p-anizidin	0,575	
	Veratril alkohol	0,077	< 0,010
Hemiceluloza	p-anizidin	< 0,001	
	Veratril alkohol	< 0,001	0,883
Celuloza	p-anizidin	0,528	
	Veratril alkohol	< 0,001	< 0,001

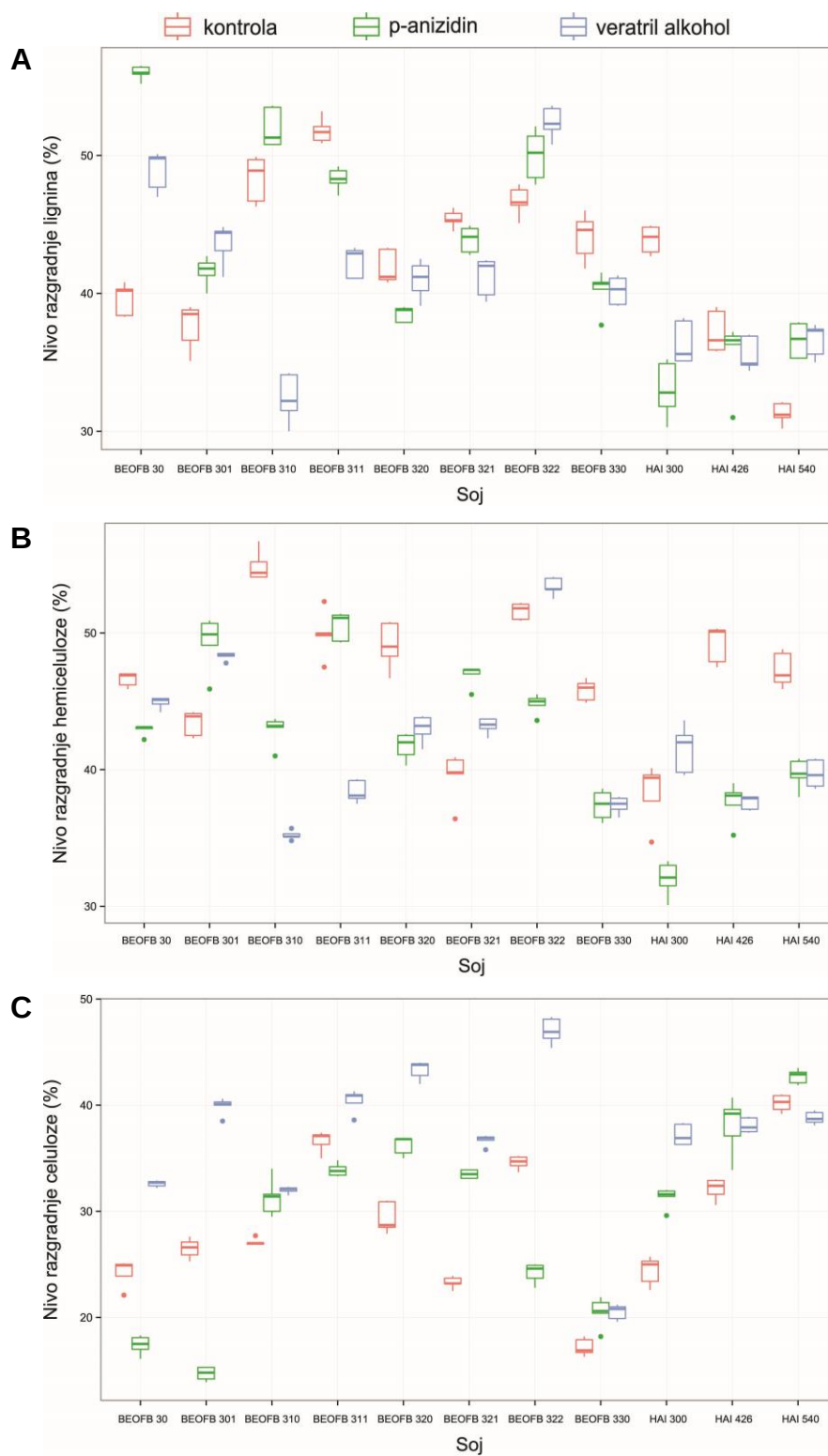
Poredeći vrste, efekti *p*-anizidina i veratril alkohola na stepen delignifikacije se nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolu. Međutim, u prisustvu ovih induktora nivo degradacije hemiceluloze se značajno razlikovao od onog u kontroli ($P < 0,001$), dok je veratril alkohol uzrokovao značajne promene u stepenu hidrolizovane celuloze u odnosu na kontrolu i *p*-anizidin ($P < 0,001$) (Tabela 10).

U pogledu razlaganja lignina mali broj vrsta se međusobno razlikovao što se može smatrati mogućim efektom soja na razgradnju ovog polimera. Po nivou razgradnje hemiceluloze, *T. pubescens* se nije značajno razlikovao od *T. multicolor* kao ni *T. versicolor* od *T. gibbosa* i *T. hirsuta*. U slučaju hidrolize celuloze *T. gibbosa* se nije statistički značajno razlikovao od *T. versicolor* i *T. suaveolens* (Tabela 11).

Tabela 11. Tukijev post-hoc test razlika između vrsta roda *Trametes* u analizi varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze

Polimeri	Upoređeni parovi vrsta					
		<i>T. gibbosa</i>	<i>T. hirsuta</i>	<i>T. multicolor</i>	<i>T. pubescens</i>	<i>T. suaveolens</i>
Lignin	<i>T. hirsuta</i>	0,761				
	<i>T. multicolor</i>	< 0,001	< 0,001			
	<i>T. pubescens</i>	0,004	0,111	< 0,001		
	<i>T. suaveolens</i>	< 0,001	< 0,001	0,391	0,076	
	<i>T. versicolor</i>	0,687	1,000	< 0,001	0,075	< 0,001
Hemiceluloza	<i>T. hirsuta</i>	< 0,001				
	<i>T. multicolor</i>	< 0,001	< 0,001			
	<i>T. pubescens</i>	< 0,001	< 0,001	0,549		
	<i>T. suaveolens</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
	<i>T. versicolor</i>	0,961	1,000	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Celuloza	<i>T. hirsuta</i>	< 0,001				
	<i>T. multicolor</i>	< 0,001	< 0,001			
	<i>T. pubescens</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001		
	<i>T. suaveolens</i>	0,219	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
	<i>T. versicolor</i>	0,965	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Dobijeni rezultati su pokazali da postoji varijabilnost i između testiranih sojeva u pogledu efekta *p*-anizidina i veratril alkohola na nivo razgradnje ovih polimera (Grafik 13).



Grafik 13. Kapacitet razgradnje lignina (A), hemiceluloze (B) i celuloze (C) po sojevima testiranih vrsta roda *Trametes* i tretmanima

Dvofaktorska analiza varijanse razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze je pokazala da su statistički značajni faktori i soj, tretman induktorima i njihova interakcija (Tabela 12). $F_{32,132}$ vrednost za lignin je bila 105,3 ($P < 0,001$), za hemicelulozu 118,9 ($P < 0,001$) a za celulozu 329,7 ($P < 0,001$).

Tabela 12. Rezultati dvofaktorske analize varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze po sojevima testiranih vrsta roda *Trametes* i tretmanima

Polimeri	Faktor	Df	SS	MS	F-vrednost	P vrednost
Lignin	Soj	10	3618,00	361,80	192,74	< 0,001
	Tretman	2	150,00	74,90	39,88	< 0,001
	Soj × tretman	20	2557,00	127,90	68,12	< 0,001
Hemiceluloza	Soj	10	1796,20	179,60	136,94	< 0,001
	Tretman	2	804,30	402,20	306,61	< 0,001
	Soj × tretman	20	2389,00	119,40	91,07	< 0,001
Celuloza	Soj	10	5767,00	576,70	553,30	< 0,001
	Tretman	2	2298,00	1149,20	1102,60	< 0,001
	Soj × tretman	20	2929,00	146,50	140,50	< 0,001

Rezultati Tukijevih post-hoc testova su pokazali da postoje značajne razlike između tretmana (Tabela 13) i sojeva testiranih *Trametes* spp. u stepenu razgradnje polimera pšenične slame (Tabela 14).

Tabela 13. Tukijev post-hoc test razlika između tretmana u analizi varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze po sojevima i tretmanima

Polimeri	Upoređeni tretmani		
		Kontrola	p-anizidin
Lignin	p-anizidin	< 0,050	
	Veratril alkohol	< 0,001	< 0,010
Hemiceluloza	p-anizidin	< 0,001	
	Veratril alkohol	< 0,001	0,403
Celuloza	p-anizidin	< 0,001	
	Veratril alkohol	< 0,001	< 0,001

Posmatrajući sve ispitivane sojeve, jedino je veratril alkohol dovodio do značajnog odgovora u pogledu delignifikacije, pri degradaciji hemiceluloze efekti *p*-anizidina i veratril alkohola se nisu značajno razlikovali što je bilo suprotno hidrolizi celuloze.

Tabela 14. Tukijev post-hoc test razlika između sojeva testiranih vrsta roda *Trametes* u analizi varijanse nivoa razgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze

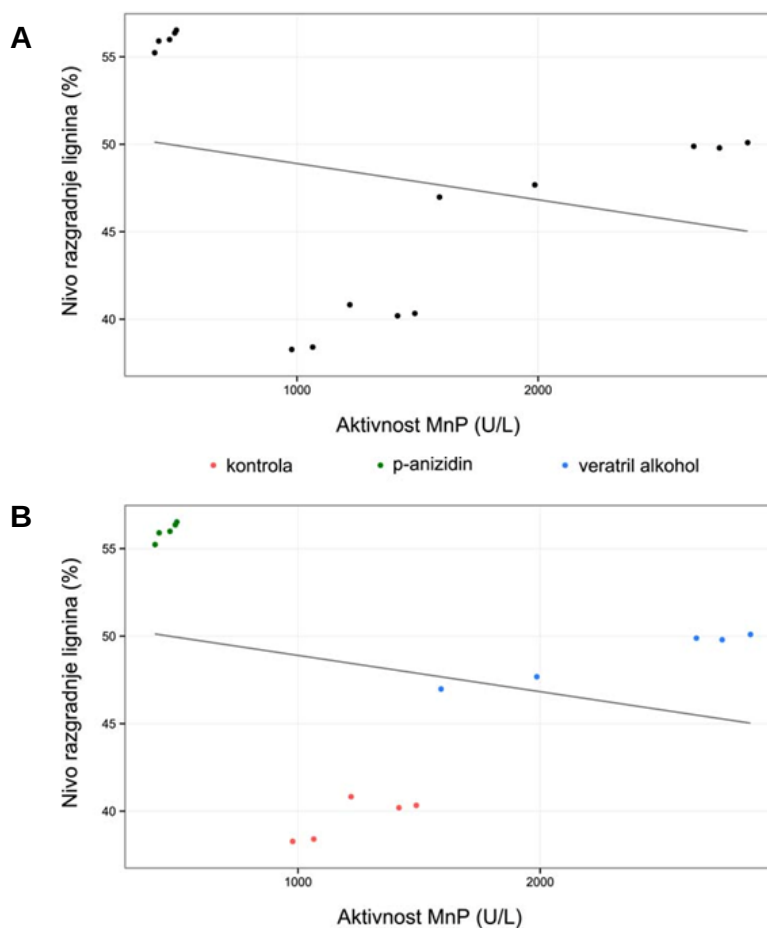
Polimeri	Upoređeni parovi sojeva										
		BEOFB 30	BEOFB 301	BEOFB 310	BEOFB 311	BEOFB 320	BEOFB 321	BEOFB 322	BEOFB 330	HAI 300	HAI 426
Lignin	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	< 0,001	< 0,001								
	BEOFB 311	0,947	< 0,001	< 0,001							
	BEOFB 320	< 0,001	0,997	< 0,001	< 0,001						
	BEOFB 321	< 0,001	< 0,001	0,928	< 0,001	< 0,001					
	BEOFB 322	0,089	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001				
	BEOFB 330	< 0,001	0,988	< 0,001	< 0,001	0,604	< 0,010	< 0,001			
	HAI 300	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		
	HAI 426	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,516	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,260
Hemiceluloza	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	0,989	< 0,001								
	BEOFB 311	< 0,001	0,804	< 0,001							
	BEOFB 320	1,000	< 0,001	0,999	< 0,010						
	BEOFB 321	< 0,010	< 0,001	< 0,001	0,207	< 0,001					
	BEOFB 322	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001				
	BEOFB 330	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001			
	HAI 300	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001		
	HAI 426	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,010	< 0,001	0,098	< 0,001	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,432	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,758
Celuloza	BEOFB 301	< 0,001									
	BEOFB 310	< 0,001	< 0,001								
	BEOFB 311	< 0,001	< 0,001	< 0,001							
	BEOFB 320	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,785						
	BEOFB 321	< 0,001	< 0,001	0,181	< 0,001	< 0,001					
	BEOFB 322	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,181	< 0,001				
	BEOFB 330	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001			
	HAI 300	< 0,001	< 0,001	0,484	< 0,001	< 0,001	1,000	< 0,001	< 0,001		
	HAI 426	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,424	1,000	< 0,001	0,484	< 0,001	< 0,001	
	HAI 540	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Sojevi unutar vrsta *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* međusobno su se značajno razlikovali u nivou degradacije lignina i hemiceluloze ($P < 0,001$) pa praćenje varijabilnosti u odgovoru na tretiranje odgovarajućim induktorom ima smisla samo ukoliko se radi na nivou soja. Sa druge strane, sojevi *T. versicolor* se međusobno nisu značajno razlikovali u pogledu razgradnje celuloze.

Minimalni generalizovani linearni model koji objašnjava varijabilnost nivoa razgradnje lignina dat je u Tabeli 15. Rezultati pokazuju da su u procesu razgradnje lignina značajni bili soj, tretman induktorima i aktivnost MnP. Kod *T. hirsuta* BEOFB 30 sa povećanjem nivoa aktivnosti MnP nije dolazilo do povećanja nivoa razgradnje lignina, što je bilo neočekivano. Ovo se može objasniti razlikom do koje dolazi usled efekta induktora na soj (Grafik 14B).

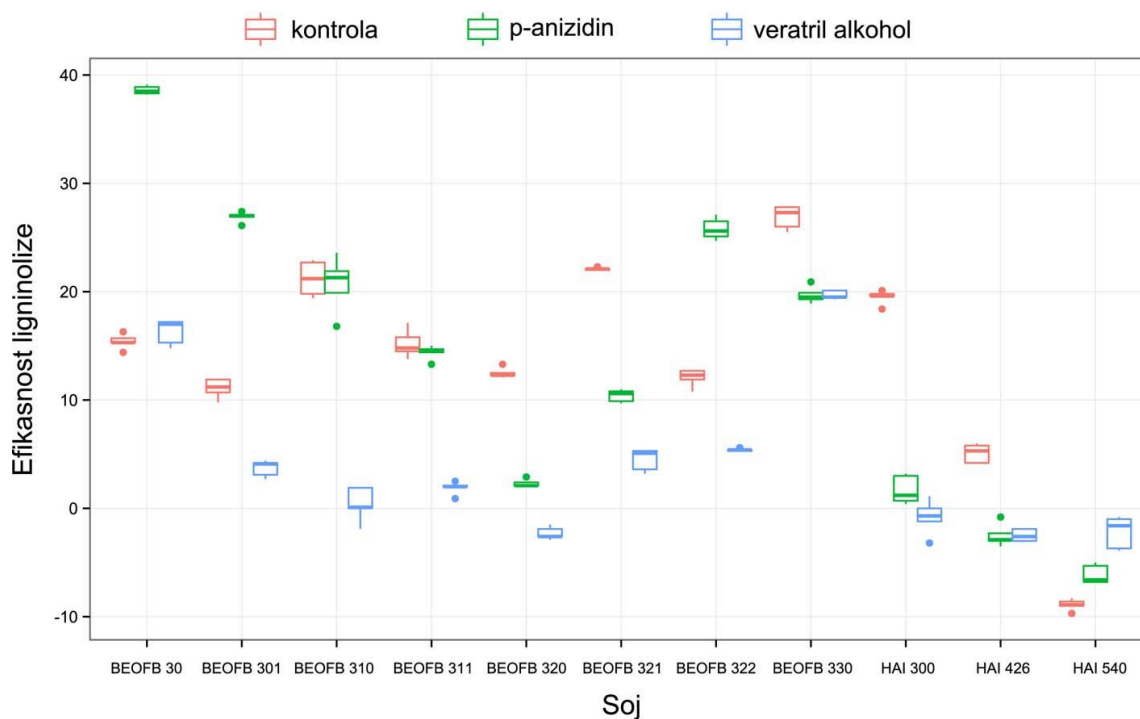
Tabela 15. Minimalni model nivoa razgradnje lignina

Faktor	P vrednost
Soj	< 0,001
Tretman	< 0,001
MnP	< 0,001
MnIP	< 0,001
Lakaze	< 0,001
Soj × tretman	< 0,001
Soj × MnP	< 0,001



Grafik 14. Efekat Mn-zavisne peroksidaze na nivo razgradnje lignina. **A.** distinkcija po nivou aktivnosti, **B.** distinkcija po tretmanima.

Varijabilnost efikasnosti ligninolize tj. najveća razlika između procenata razgradnje lignina i razgradnje celuloze u korist lignina, među sojevima i tretmanima prikazana je na Grafiku 15. Rezultati su ukazali da je proces ligninolize bio najefikasniji kod *T. hirsuta* BEOFB 30 nakon tretmana *p*-anizidinom.



Grafik 15. Efikasnost ligninolize po sojevima

Minimalni generalizovani linearni model koji objašnjavaju varijabilnost efikasnosti ligninolize dat je u Tabeli 16. Faktori koji objašnjavaju efikasnost ligninolize identični su kao i faktori koji objašnjavaju varijabilnost nivoa razgradnje lignina.

Tabela 16. Minimalni model varijabilnosti efikasnosti ligninolize.

Faktor	P vrednost
Soj	< 0,001
Tretman	< 0,001
MnP	< 0,001
MnIP	< 0,001
Lakaze	< 0,001
Soj × tretman	< 0,001
Soj × MnP	< 0,001

Odgovori sojeva na tretman *p*-anizidinom i veratril alkoholom u pogledu aktivnosti ligninolitičkih enzima kao i razgradnje polimera su bili vrlo varijabilni. Buduća istraživanja stimulacije ligninolize bi trebala da se baziraju na pojedinačnim sojevima.

4.3. Biološke aktivnosti ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda

Trametes

4.3.1. Prinos ekstrakcije

Prinosi ekstrakcije plodonosnih tela i micelije *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321 u 96% etanolu su se statistički značajno razlikovali kako između vrsta tako i između somatske i reproduktivne faze ($P < 0,01$). Prinos ekstrakcije micelije je bio veći od prinosa ekstrakcije bazidiokarpa i kretao se u opsegu od $8,00 \pm 0,27\%$ kod *Trametes versicolor* do $34,60 \pm 0,27\%$ kod *T. gibbosa*. Nasuprot rezultatima za miceliju, najveći stepen ekstrakcije plodonosnih tela je zabeležen kod *T. versicolor* ($6,67 \pm 0,07$) a najmanji kod *T. gibbosa* ($2,20 \pm 0,02$) (Tabela 17).

Tabela 17. Prinosi ekstrakcija (%) bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes*

Vrste	Bazidiokarpi	Micelija
<i>Trametes gibbosa</i>	$2,20 \pm 0,02$	$34,60 \pm 0,27$
<i>Trametes hirsuta</i>	$2,85 \pm 0,08$	$12,00 \pm 0,19$
<i>Trametes versicolor</i>	$6,67 \pm 0,07$	$8,00 \pm 0,12$

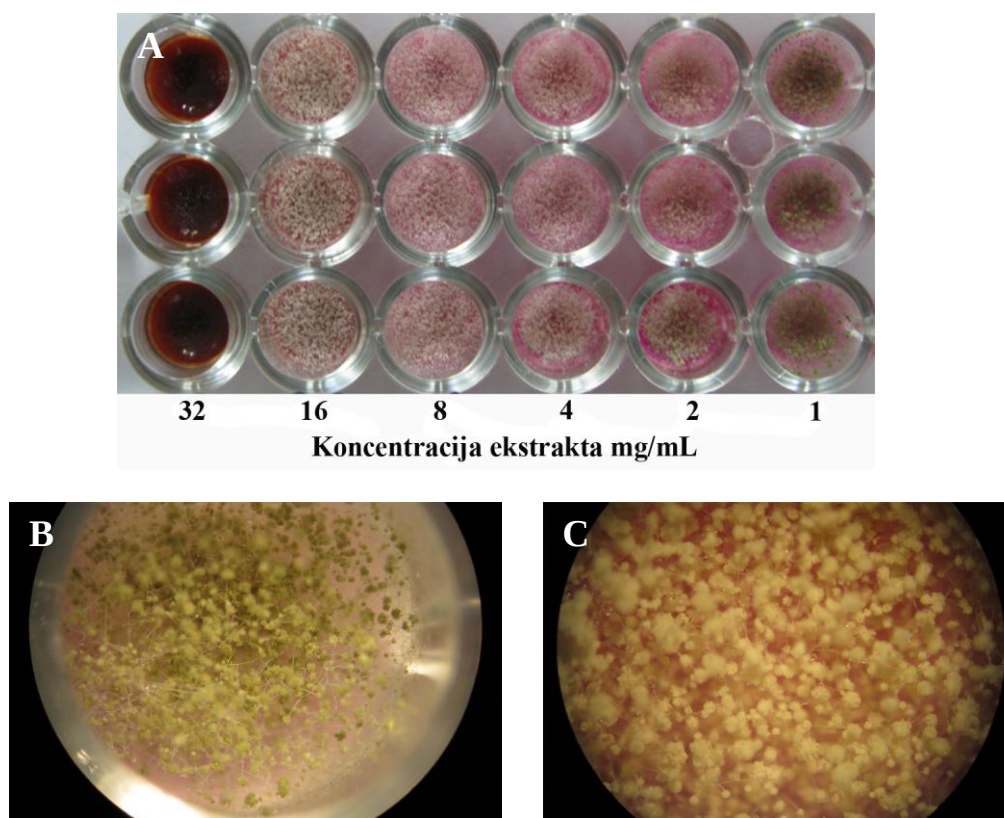
Prethodni rezultati su pokazali da ekstraktabilnost biomase zavisnost od vrste, soja i rastvarača (Mau i dr., 2002; Ren i dr., 2006; Karaman i dr., 2010). Tako su Ren i dr. (2006) pokazali da je prinos ekstrakcije plodonosnih tela *T. gibbosa* u petrol etru bio 1,22%, u etil acetatu 6,44% dok je u metanolu iznosio 9,2%. Metanol je takođe bio dobar rastvarač pri ekstrakciji plodonosnih tela *T. versicolor* gde su se prinosi ekstrakcije kretali od 4,1% do 9,16% (Mau i dr., 2002; Karaman i dr., 2010). Na osnovu brojnih rezultata može se zaključiti da je prinos ekstrakcije u alkoholnim rastvaračima veći nego u drugim kao i da je metanol bolji rastvarač od 96% etanola.

4.3.2. Antifungalna aktivnost

Mikrodilucionom metodom je pokazano da je stepen osetljivosti 6 humanih patogena na etanolne ekstrakte bazidiokarpa i micelije testiranih vrsta roda *Trametes* različit (Tabela 18). Ekstrakti micelije su u poređenju sa ekstraktima plodonosnih tela pokazali veći antifungalni potencijal. Tako je micelijski ekstrakt *T. hirsuta* u koncentraciji od samo 4,0 mg/mL inhibirao rast *Candida krusei* a pri koncentraciji od 32,0 mg/mL i rast ostalih testiranih vrsta. Ovaj ekstrakt u koncentraciji od 32,0 mg/mL imao je i fungicidni efekat na *Aspergillus glaucus*. Ekstrakti plodonosnih tela su inhibirali rast manjeg broja mikromiceta a ekstrakt *T. hirsuta* je među testiranim vrstama imao najviši kapacitet jer je rast *C. parapsilosis* inhibirao pri koncentraciji od 16,0 mg/mL. Bazirano na MIC i MFC vrednostima ispitivani ekstrakti su imali značajno slabiji antifungalni potencijal u poređenju sa komercijalnim antimikotikom ketokonazolom čije su se MIC kretale u opsegu od 0,0078 mg/mL (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*) do 0,0156 mg/mL (*A. glaucus*) a MFC od 0,0078 mg/mL (*A. flavus*) do 0,0313 mg/mL (*A. glaucus*). Antifungalni potencijal ispitivanih vrsta roda *Trametes* je opadao sledećim redosledom: *T. hirsuta* > *T. versicolor* > *T. gibbosa*.

Vrste roda *Candida* su bile osetljivije na testirane ekstrakte od vrsta roda *Aspergillus* a osetljivost je opadala sledećim redosledom: *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *A. glaucus* > *C. krusei* > *A. fumigates* > *A. flavus*.

Kolonije *A. flavus* su se na medijumu obogaćenom sa micelijskim ekstraktom *T. gibbosa* u subinhibitornim koncentracijama kao i sa ekstraktima *T. hirsuta* u koncentracijama većim od 2,0 mg/mL odlikovale belom vazdušnom micelijom i demelanizovanim konidijskim aparatom (Slika 15).



Slika 15. Efekat micelijskog ekstrakta na pigmentaciju micelije i konidijskog aparata *Aspergillus flavus*. **A.** *Trametes gibbosa*; **B.** *T. hirsuta* – kontrola; **C.** *T. hirsuta* – koncentracija 16,0 mg/mL.

Brojne studije su pokazale da različiti ekstrakti plodonosnih tela i micelije vrsta roda *Trametes* poseduju antifungalna svojstva (Yamaç i Bilgili, 2006; Sivaprakasam i dr., 2011; Teoh i Mashitah, 2012; Hleba i dr., 2014). Na osnovu rezultata dobijenih za *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321 može se zaključiti da su

ekstrakti njihovih plodonosnih tela i micelije relativno slabi antifungalni agensi što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Sivaprakasam i dr. (2011) i Hleba i dr. (2014). Ovi autori su pokazali da je MIC ekstrakta plodonosnih tela *T. versicolor* za *C. albicans* veća od 1,0 mg/mL i da su *A. flavus*, *A. fumigatus* i *A. niger* slabo osetljivi na metanolni i vodeni ekstrakt plodonosnih tela *T. hirsuta* koncentracije 50,0 mg/mL. Međutim, metanolni ekstrakt je imao veći antifungalni potencijal u odnosu na vodeni (Sivaprakasam i dr., 2011). Yamaç i Bilgili (2006) su korišćenjem disk-difuzione metode saopštili da je acetonski ekstrakt plodonosnih tela *T. versicolor* pri koncentraciji od 30,0 µg/disku visoko aktivan na *Saccharomyces cerevisiae* ali bez dejstva na *C. albicans*. Za razliku od acetonskog ekstrakta, etil acetatni i dihlormetanski ekstrakti bazidiokarpa ove vrste pri istoj koncentraciji nisu imali antifungalni efekat.

Iako su dosadašnje studije pokazale da su fenolna jedinjenja plodonosnih tela i micelije vrsta roda *Trametes* glavni nosioci antifungalne aktivnosti, ovu ulogu imaju i terpenoidi, polisaharidi PSK i PSP i cinaminska kiselina (Takeuchi i dr., 1969; Ekmekcioglu i dr., 1998; Cui i Chisti, 2003; Cheng i dr., 2008; Karaman i dr., 2012; Alves i dr., 2013). Antifungalna aktivnost polifenola zavisi od njihove hemijske strukture i polarnosti tj. nedostatak polarnih grupa povećava lipofilnost i olakšava difuziju kroz ćelijsku membranu (Picman i dr., 1995; Barron i Ibrahim, 1996). Prema Havsteen (1983) i Daglia (2012) ovo aktivnost fenolnih jedinjenja je bazirana na prisustvu visoko reaktivnih hidroksilnih grupa ali i delova koji imaju visok afinitet za vezivanje za proteine što inhibira pre svega telomerase i lipoksigenaze kao i interakcije sa signalnim transdukcionim putevima membranskih receptora. Međutim, Cowan (1999) je istakao da se njihova antifungalna aktivnost može ostvariti i inhibicijom oksidativne fosforilacije posredstvom sulfhidril grupa kao i različitim nespecifičnim interakcijama.

Morfo-fiziološke promene, uključujući i demelanizaciju reproduktivnih struktura, kod vrsta roda *Aspergillus* izloženih dejstvu pojedinih komponenata biljnih ekstrakata kao i ekstraktima makromiceta uočili su De Billerbeck i dr. (2001), Souza i dr. (2010) i Heleno i dr. (2013a,b). Kako je istakao Mossier i dr. (1993) depigmentacija konidijskog aparata mikromiceta se može pripisati dejstvu fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima brojnih vrsta makromiceta koja inhibiraju sintezu melanina. Melanin je sposoban da apsorbuje 50 -

75% UV-svetlosti i da neutrališe slobodne radikale nastale delovanjem makrofaga i neutrofila domaćina čime doprinosi otpornosti i preživljavanju spora kao i virulenciji patogenih mikromiceta (Brakhage i Liebmann, 2005; Brenner i Hearing, 2008), dok demelanizacija u značajnoj meri može da smanji njihov stepen patogenosti (Wheeler i Bell 1988; Tsai i dr., 1999). Ovo svojstvo može biti od izuzetnog značaja naročito kada su u pitanju vrste roda *Aspergillus*, pošto neke od njih izazivaju ozbiljne mikoze i mikotoksikoze kod ljudi i životinja (Samson i dr., 2010).

4.3.3. Antioksidativna aktivnost

Ekstrakti plodonosnih tela i micelije odabranih vrsta roda *Trametes* su pokazali značajan antioksidativni potencijal koji je varirao u zavisnosti od vrste i materijala korišćenog u ekstrakciji. Ekstrakti plodonosnih tela su u poređenju sa ekstraktima micelije svih testiranih vrsta imali značajno veći kapacitet ($P < 0,01$), ali mnogo manji u odnosu na komercijalni antioksidans, L-askorbinsku kiselinu (Tabela 19).

Tabela 19. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes* i komercijalnog antioksidansa

Vrsta	Ekstrakt	EC ₅₀ [mg/mL]		Ekvivalent redukovano Fe ²⁺ [mM]
		DPPH	ABTS	FRAP
<i>Trametes gibbosa</i>	plodonosna tela	18,13 ± 0,23	14,67 ± 0,93	0,015 ± 0,001
	micelija	26,15 ± 0,97	31,43 ± 0,83	0,011 ± 0,001
<i>Trametes hirsuta</i>	plodonosna tela	17,06 ± 0,41	18,33 ± 1,41	0,013 ± 0,003
	micelija	21,81 ± 1,05	27,50 ± 0,42	0,016 ± 0,004
<i>Trametes versicolor</i>	plodonosna tela	15,22 ± 0,37	8,46 ± 0,49	0,037 ± 0,007
	micelija	16,18 ± 0,45	20,00 ± 1,57	0,025 ± 0,00
L-askorbinska kiselina		0,035 ± 0,001	0,247 ± 0,012	2,282 ± 0,023

Ekstrakti plodonosnih tela i micelije *T. versicolor* su imali najveću sposobnost neutralizacije DPPH i ABTS radikala kao i redukcije Fe^{2+} . EC_{50} vrednosti ekstrakta bazidiokarpa pri neutralizaciji ovih radikala su iznosile $15,22 \pm 0,37$ odnosno $8,46 \pm 0,49$ mg/mL, dok su za ekstrakte micelije bile $16,18 \pm 0,45$ odnosno $20,00 \pm 1,57$ mg/mL. Ovi ekstrakti su takođe efikasno redukovali Fe^{2+} ($0,037 \pm 0,007$ odnosno $0,025 \pm 0,000$ mM). Ekstrakti micelije *T. gibbosa* su imali najniži antioksidativni kapacitet, tj. EC_{50} vrednosti pri neutralizaciji DPPH i ABTS radikala su iznosile $26,15 \pm 0,97$ odnosno $31,43 \pm 0,83$ mg/mL a količina redukovanog Fe^{2+} je bila svega $0,011 \pm 0,001$ mM (Tabela 19).

Prethodne studije su takođe pokazale da se vrste roda *Trametes* odlikuju značajnim antioksidativnim potencijalom (Johnsy i Kaviyarasana, 2011; Kamiyama i dr., 2013; Sheikh i dr., 2014). Kamiyama i dr. (2013) su saopštili da u zavisnosti od rastvarača ekstrakt plodonosnog tela *T. versicolor* pri koncentraciji od 0,5 mg/mL može da neutrališe i do 50% DPPH•, a Johnsy i Kaviyarasana (2011) da metanolni ekstrakt bazidiokarpa *T. gibbosa* u koncentraciji od 1,0 mg/mL redukuje čak 91,5% ovih radikala. Etanolni ekstrakti *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321 su imali nešto slabije kapacitete neutralizacije DPPH radikala ali su bili bolji u poređenju sa etanolnim ekstraktima bazidiokarpa *T. hirsuta* (Sheikh i dr., 2014).

4.3.3.1. Sadržaj fenola i flavonoida

Fenoli i flavonoidi su detektovani u ekstraktima plodonosnih tela i micelije svih odabranih vrsta roda *Trametes* (Tabela 20). Među testiranim vrstama, plodonosna tela i micelija *T. versicolor* su bili najbogatiji fenolima ($24,80 \pm 0,42$ odnosno $18,06 \pm 0,42$ µg GAE/mg) ali i flavonoidima ($10,79 \pm 0,09$ odnosno $4,16 \pm 0,02$ µg QE/mg), nasuprot *T. gibbosa* u čijim ekstraktima je količina fenola bila $20,07 \pm 1,24$ odnosno $12,08 \pm 0,87$ µg GAE/mg a flavonoida $7,63 \pm 0,08$ odnosno $1,76 \pm 0,03$ µg QE/mg. Sadržaj fenola i flavonoida je bio u pozitivnoj korelaciji sa nivoom neutralizacije DPPH i ABTS radikala što je pokazano visokim vrednostima koeficijenta determinacije – R^2 (0,98 za fenole i 0,99 za flavonoide plodonosnih tela i 0,97 odnosno 0,99 za ova jedinjenja micelije).

Tabela 20. Sadržaj fenola i flavonoida u etanolnim ekstraktima bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes*

Vrsta	Ekstrakt	Količina fenola (μg GAE/mg suvog ekstrakta)	Količina flavonoida (μg QE/mg suvog ekstrakta)
<i>Trametes gibbosa</i>	plodonosna tela	$20,07 \pm 1,24$	$7,63 \pm 0,08$
	micelija	$12,08 \pm 0,87$	$1,76 \pm 0,03$
<i>Trametes hirsuta</i>	plodonosna tela	$21,53 \pm 2,36$	$8,28 \pm 0,05$
	micelija	$14,27 \pm 0,92$	$2,21 \pm 0,02$
<i>Trametes versicolor</i>	plodonosna tela	$24,80 \pm 0,42$	$10,79 \pm 0,09$
	micelija	$18,06 \pm 0,33$	$4,16 \pm 0,02$

Raniji rezultati su pokazali da fenoli kod gljiva imaju ključnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala zbog prisustva hidroksilnih grupa koje imaju ulogu neutralizatora, helatora metala i donora vodonika (Rice-Evans i dr., 1996; Mau i dr., 2004; Jayakumar i dr., 2011; Palacios i dr., 2011). Ova jedinjenja ulaze u sastav plodonosnih tela i micelije većine makromiceta a njihova količina varira od vrste do vrste i po pravilu je znatno veća u ekstraktima plodonosnih tela (Huang i dr., 2006). Međutim, poređenjem rezultata dobijenih za *T. gibbosa* BEOFB 310 i soja koga su proučavali Johnsy i Kaviyarasana (2011) može se zaključiti da fenoli nisu jedini nosioci antioksidativne aktivnosti. Naime, sadržaj fenola u ekstraktu plodonosnih tela *T. gibbosa* BEOFB 310 koji je neutralisao 63,5% DPPH radikala je bio $20,07 \mu\text{g}$ GAE/mg ekstrakta a u ekstraktu drugog soja koji je redukovao čak 91,5% ovog radikala samo neznatno viši ($23,8 \mu\text{g}$ GAE/mg ekstrakta). Međutim, flavonoidi su bili zastupljeniji kod *T. gibbosa* BEOFB 310, $7,63 \mu\text{g}$ QE mg/mg ekstrakta prema svega $0,59 \mu\text{g}$ QE/mg ekstrakta soja koji su testirali Johnsy i Kaviyarasana (2011). Postoje dva moguća razloga zbog čega su razlike u koncentracijama flavonoida između ova dva soja bile tako velike, prvi je različita polarnost rastvarača a drugi bi mogao biti različit kapacitet sinteze flavonoida.

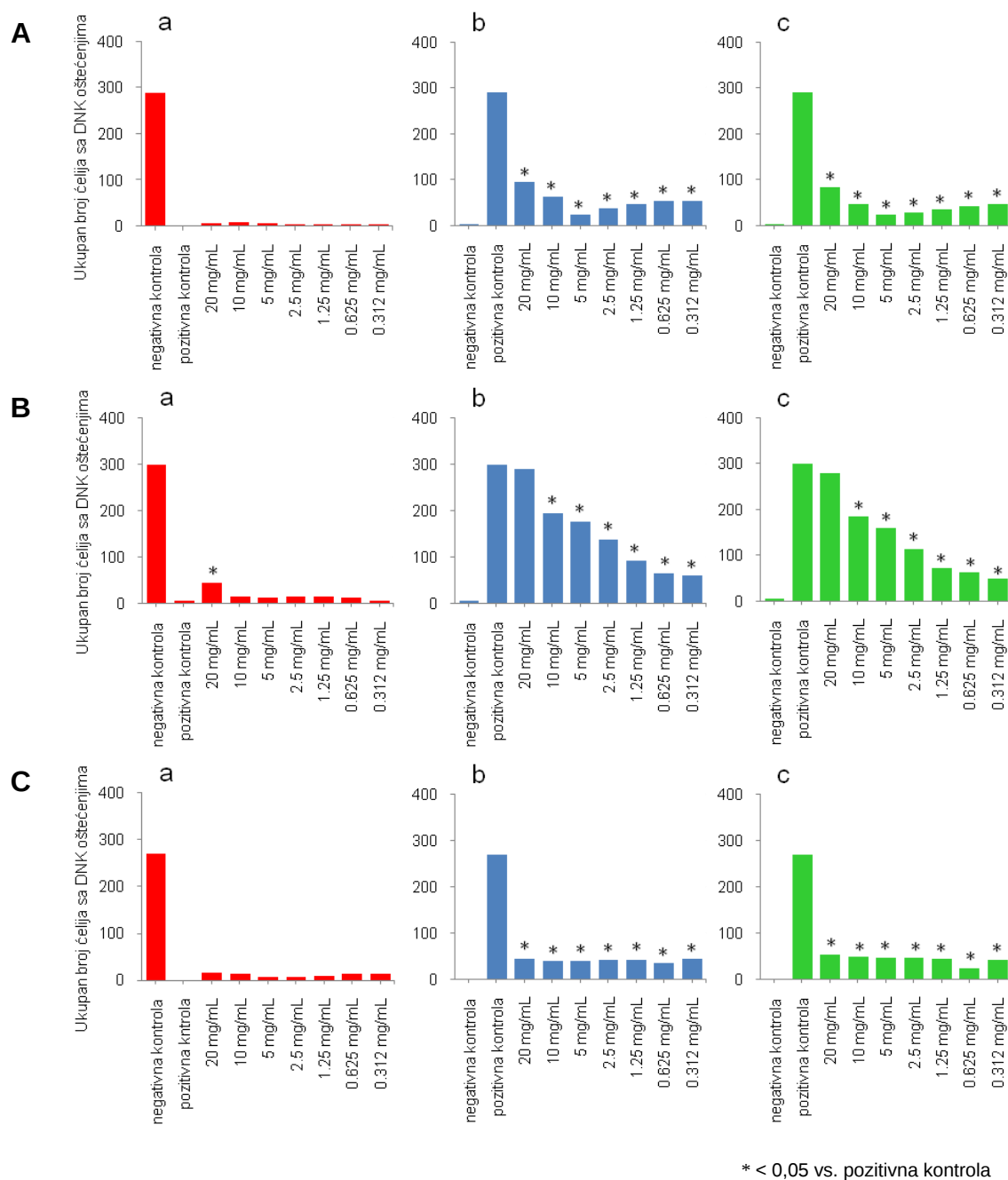
4.3.4. Genoprotektivna aktivnost

S obzirom da su davaoci krvi u eksperimentu bile zdrave osobe približno istih godina koje nisu bile pod bilo kakvom terapijom, statistički značajnih individualnih razlika u odgovoru na dejstvo ekstrakata nije bilo. Tretman leukocita periferne krvi H_2O_2 je za kratak vremenski period indukovao intenzivne jednolančane prekide DNK jedra što se u Komet testu moglo uočiti u vidu migracije fragmenata na gelu.

Ekstrakt plodonosnih tela *T. versicolor* u koncentracijama od 0,312 do 20,0 mg/mL nije izazivao značajniji porast broja ćelija sa oštećenom DNK u poređenju sa pozitivnom kontrolom što znači da nije bio genotoksični agensi (Grafik 16Aa), dok je prilikom korišćenja u pre- i post-tretmanu ćelija tretiranih H_2O_2 imao zaštitnu ulogu (Grafik 16Ab,c). I u pre- i u post-tretmanu najbolji efekat je postigao ekstrakt koncentracije 5,0 mg/mL a najslabiji onaj koncentracije 20,0 mg/mL. Prilikom tretmana ekstraktima svih testiranih koncentracija stepen ukupnih DNK oštećenja je značajno smanjen u poređenju sa pozitivnom kontrolom ($P < 0,05$).

Ekstrakt plodonosnih tela *T. hirsuta* nije pokazao genotoksičnu aktivnost pri svim testiranim koncentracijama izuzev 20,0 mg/mL kada je zabeležen blag genotoksični efekat, tj. nivo ukupnih DNK oštećenja je bio statistički značajno veći u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Grafik 16Ba). Ekstrakt je pri svim koncentracijama osim najveće, u pre- i post-tretmanu leukocita pokazao zaštitni efekat od H_2O_2 -indukovanih DNK oštećenja pokazujući značajan stepen opadanja ukupnog broja ovih oštećenja u poređenju sa pozitivnom kontrolom (Grafik 16Bb,c). Dobijeni genoprotektivni efekat ekstrakta je bio u pozitivnoj korelaciji sa njegovom koncentracijom, tj. maksimalna aktivnost je zabeležena pri koncentraciji od 0,312 mg/mL dok pri koncentraciji od 20,0 mg/mL ekstrakt nije bio aktivan.

Odsustvo genotoksičnosti i značajan antigenotoksičan efekat u vidu redukcije DNK oštećenja pri pre- i post-tretmanu su bili svojstveni i za ekstrakt plodonosnog tela *T. gibbosa* u svim testiranim koncentracijama (Grafik 16C). Međutim, za ovaj ekstrakt nije zabeležena zavisnost aktivnosti od koncentracije ekstrakta, naime postepeno smanjenje koncentracije ekstrakta nije vodilo proporcionalnoj redukciji H_2O_2 -indukovane genotoksičnosti.

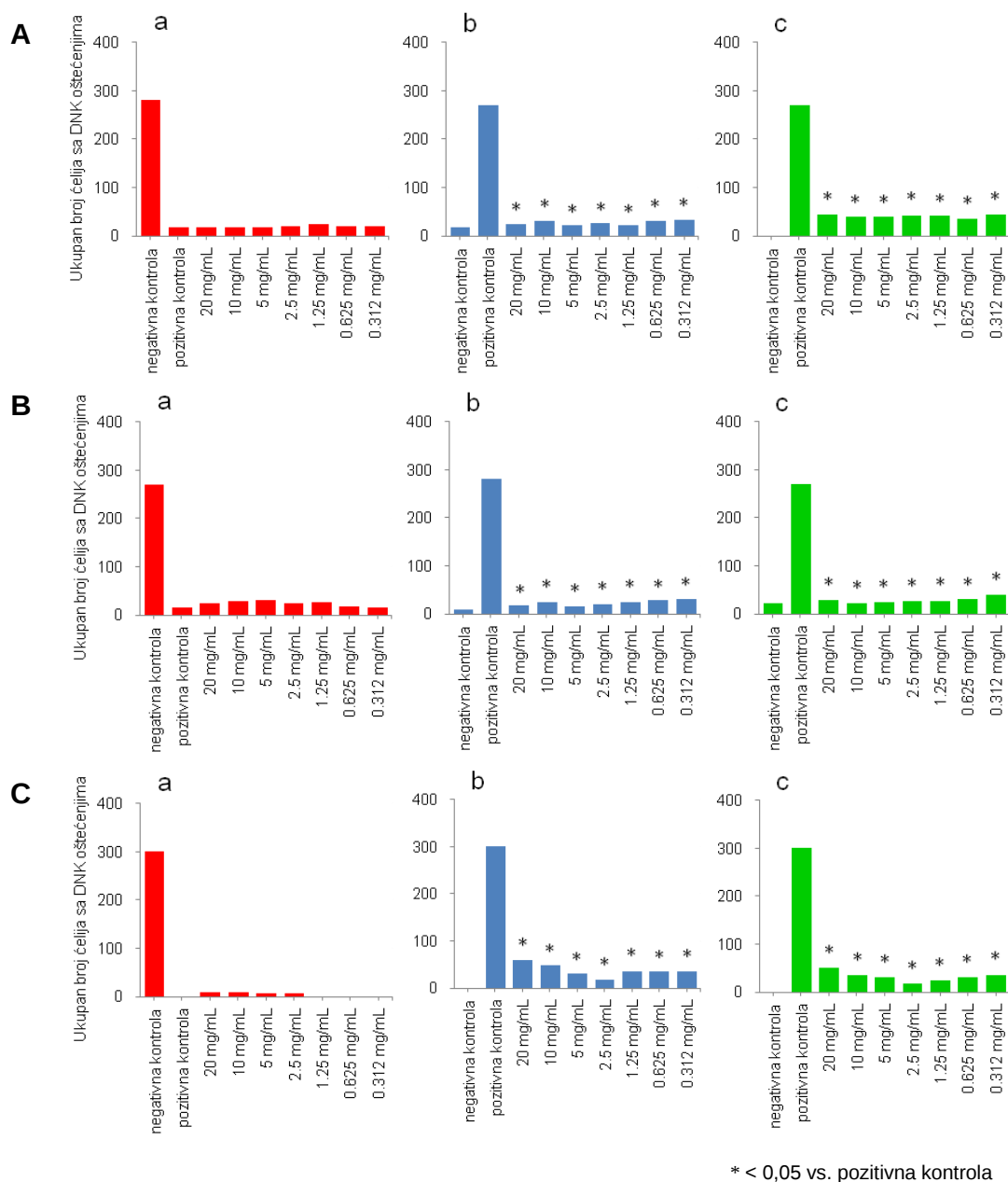


Grafik 16. Efekat ekstrakata plodonosnog tela (A) *Trametes versicolor*, (B) *Trametes hirsuta* i (C) *Trametes gibbosa*: (a) genotoksični, (b) antigenotoksični, pre-tretman i (c) antigenotoksični, post-tretman. Analizirano je 100 jedara po ponavljanju. Rezultati predstavljaju ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjima.

Ekstrakti micelije *T. versicolor*, *T. hirsuta* i *T. gibbosa* ni pri jednoj testiranoj koncentraciji nisu pokazali genotoksičnu aktivnost (Grafik 17 Aa; Ba; Ca), već su i u pre- i post-tretmanima imali značajne genoprotektivne aktivnosti protiv H₂O₂-indukovanih DNK oštećenja koje se nisu statistički značajno razlikovale ($P < 0,05$). Ekstrakti micelije *T. hirsuta* (2,5, 5,0 i 20,0 mg/mL), i *T. gibbosa* (2,5 mg/mL) su bili najefikasniji, nešto slabija aktivnost je detektovana za ekstrakt *T. versicolor* pri najnižoj koncentraciji, dok je najslabiji efekat imao ekstrakt *T. gibbosa* pri koncentraciji od 20,0 mg/mL (Grafik 17 Ab,c; Bb,c; Cb,c).

Brojna mutagena i kancerogena jedinjenja mogu biti prisutna u različitim prirodnim izvorima (Ames, 1983). Neka organska jedinjenja u zavisnosti od koncentracije i dužine izlaganja mogu biti antioksidansi ili pro-oksidansi i na taj način da imaju genotoksični ili citotoksični efekat (Miyaji i dr., 2004; Nouis i dr., 2005; Arantes-Rodrigues i dr., 2011; Prochazkova i dr., 2011). Kako su istakli Grüter i dr. (1991) makromicete mogu imati različit *in vitro* i *in vivo* efekat, naime aktivnosti dobijene *in vitro* ne moraju odgovarati onim dobijenim *in vivo*, ili zbog nestabilnosti pojedinih biološki aktivnih jedinjenja pri varenju ili zbog nemogućnosti njihove apsorpcije u gastrointestinalnom traktu. Važno je istaći da genotoksični ili antigenotoksični efekat ekstrakata gljiva zavisi od vrste, koncentracije i metode kojom se taj efekat određuje (Sterner i dr., 1982a,b; Morales i dr., 1990; Grüter i dr., 1991). Rezultati ovog istraživanja su pokazali različit kapacitet ispitivanih vrsta roda *Trametes* u smanjenju H₂O₂-indukovanih DNK oštećenja. Najslabiji efekat je imao ekstrakt plodonosnih tela *T. hirsuta* kod koga je uočena jasna inverzna zavisnost aktivnosti od koncentracije. Međutim, povećanje koncentracije ekstrakata *T. versicolor* i *T. gibbosa* iznad optimalnih vrednosti nije dovelo do poboljšanja rezultata dobijenih Komet testom što je u saglasnosti sa rezultatima koje su dobili Miyaji i dr. (2004). Ovi autori su pokazali odsustvo zavisnosti antigenotoksične aktivnosti od koncentracije ekstrakta *Lentinus edodes*. U zavisnosti od metode koja se primenjuje da bi se odredila genotoksična aktivnost rezultati mogu biti različiti. Tako Morales i dr. (1990) nisu zabeležili mutageni efekat ekstrakata bazidiokarpa *Lactarius deliciosus*, *Boletus luteus*, *Agaricus bisporus* i *Pleurotus stratus* na ćelije sisara u Ejmsovom testu (Ames

Salmonella/microsome test), dok su CHO/HPRT testom pokazali slabu mutagenu aktivnost ekstrakta *P. ostreatus*.



Grafik. 17. Efekat ekstrakata micelije (A) *Trametes versicolor*, (B) *Trametes hirsuta* i (C) *Trametes gibbosa*: (a) genotoksični, (b) antigenotoksični, pre-tretman i (c) antigenotoksični, post-tretman. Analizirano je 100 jedara po ponavljanju. Rezultati predstavljaju ukupan broj ćelija sa DNK oštećenjima.

Mehanizmi zaslužni za antigenotoksični efekat gljiva još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. Najverovatnije se zaštitni efekat ekstrakata gljiva zasniva na više mehanizama (Gebhart, 1992). Ovi mehanizmi se mogu odrediti korišćenjem kao i različitim kombinacijama ekstrakata i H_2O_2 . Pozitivni rezultati dobijeni u pre- i post-tretmanima ekstraktima *T. gibbosa* BEOFB 310, *T. hirsuta* BEOFB 301 i *T. versicolor* BEOFB 321 ukazuju da oni imaju zaštitni efekat kako na nivou prevencije tako i na nivou intervencije pa mogu da imaju ulogu desmutagena (deluju direktno na mutagen) ili bioantimutagena što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima (Kada i dr., 1982; Kada, 1983; Franke i dr., 2005). Efikasnost pre-tretmana zabeležena u ovom istraživanju se može objasniti povećanjem antioksidativnog kapaciteta ćelija putem stimulacije sinteze i aktivnosti antioksidativnih enzima u toku oksidativnog stresa (Kalogeropoulos i dr., 2013). Pozitivan efekat u post-tretmanu može biti rezultat sinergističkog delovanja neutralizacije slobodnih radikala i stimulacije antioksidativnih enzima, kao i pokretanja mehanizama DNK reparacije na način kako su to opisali Chiaramonte i dr. (2001). S obzirom da su ovi autori saopštili da do značajnije reparacije DNK molekula dolazi nakon 30 do 60 minuta izlaganja oksidativnom agensu, a da je post-tretman u ovom istraživanju podrazumevao inkubaciju u prisustvu H_2O_2 do 30 minuta, može se zaključiti da su mehanizmi reparacije imali manje važnu ulogu u zaštiti od H_2O_2 . Zbog svega iznetog može se zaključiti da se genoprotektivna aktivnost ekstrakata vrsta roda *Trametes* najverovatnije zasniva na antioksidativnim mehanizmima.

4.3.5. Citotoksična aktivnost

Ekstrakti proučavanih vrsta roda *Trametes* su pokazali nižu citotoksičnu aktivnost na testirane ćelijske linije kancera u poređenju sa komercijalnim citostaticima, *cis*-DDP i doksorubicinom, koji su korišćeni kao pozitivne kontrole (Tabela 21). Poredeći ekstrakte micelije i ekstrakte bazidiokarpa može se zaključiti da su prvi imali jači citotoksični efekat. Takođe, *T. hirsuta* je bila vrsta sa najvećim citotoksičnim potencijalom dok su najslabiji bili kako ekstrakti bazidiokarpa tako i micelije *T. gibbosa*. IC_{50} vrednostima pokazano je da su HeLa ćelije bile najosetljivije na testirane ekstrakte kao i na komercijalne citostatike.

Ove vrednosti su se kretale u opsegu od $21,01 \pm 1,95 \mu\text{g/mL}$ za micelijski ekstrakt *T. hirsuta* protiv HeLa ćelija do preko $200,00 \mu\text{g/mL}$ za isti ekstrakt *T. gibbosa* protiv svih testiranih ćelijskih linija kao i ekstrakt plodonosnih tela *T. versicolor* protiv LS174, A549 i MRC5 (Tabela 21).

Tabela 21. Citotoksična aktivnost ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes* i komercijalnih citostatika

Vrsta	Ekstrakt	IC ₅₀ [$\mu\text{g/mL}$]			
		HeLa	LS174	A549	MRC5
<i>Trametes gibbosa</i>	plodonosna tela	$193,53 \pm 8,91$	$>200,00$	$>200,00$	$>200,00$
	micelija	$>200,00$	$>200,00$	$>200,00$	$>200,00$
<i>Trametes hirsuta</i>	plodonosna tela	$116,13 \pm 3,14$	$158,46 \pm 37,15$	$177,66 \pm 20,17$	$175,70 \pm 1,45$
	micelija	$21,01 \pm 1,95$	$45,75 \pm 0,02$	$57,94 \pm 5,08$	$145,17 \pm 6,48$
<i>Trametes versicolor</i>	plodonosna tela	$168,54 \pm 28,90$	$>200,00$	$>200,00$	$>200,00$
	micelija	$42,40 \pm 0,74$	$86,12 \pm 12,34$	$65,57 \pm 7,75$	$77,37 \pm 0,82$
	cis-DDP*	$2,10 \pm 0,20$	$5,54 \pm 1,03$	$11,92 \pm 2,19$	$14,44 \pm 1,90$
	Doksorubicin*	$0,62 \pm 0,30$	$3,78 \pm 0,49$	$0,24 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,18$

*Komercijalni citostatik

Iako su rezultati pokazali da je u većini slučajeva citotoksična aktivnost ekstrakata bila slabija protiv kontrolne ćelijske linije u odnosu na ćelije kancera samo je micelijski ekstrakt *T. hirsuta* pokazao zadovoljavajući nivo selektivnosti na testirane ćelijske linije kancera. *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* se mogu smatrati odličnim izvorom jedinjenja sa značajnim potencijalom u kombinovanoj terapiji kancera što zahteva buduće analize antikancerogene aktivnosti pojedinih komponenti ekstrakata.

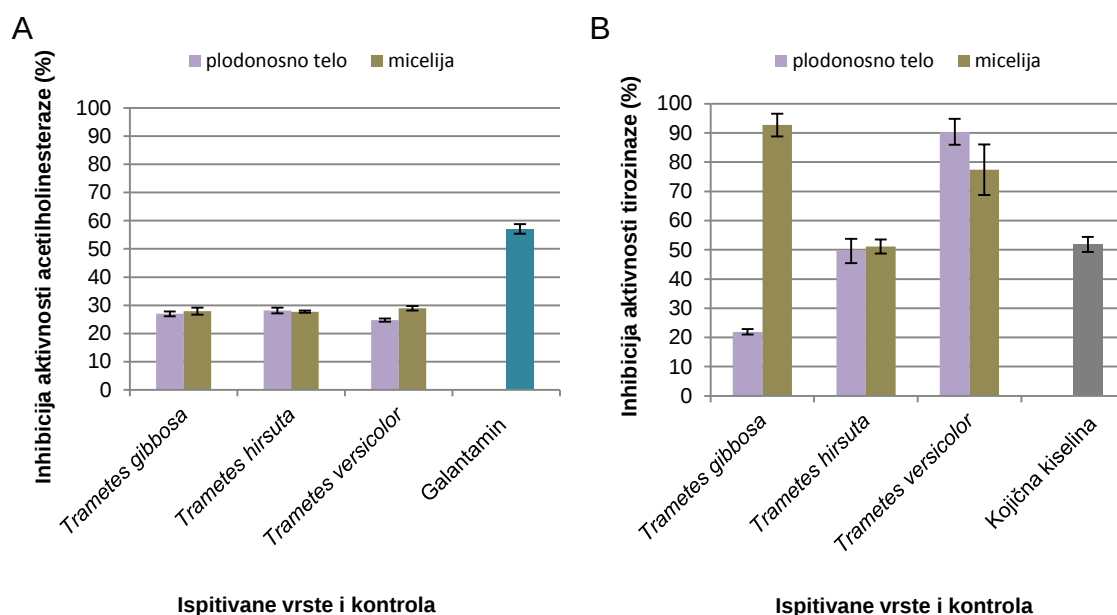
Brojna istraživanja su pokazala da ekstrakti kao i jedinjenja izolovana iz različitih vrsta roda *Trametes* poseduju značajan citotoksični potencijal (Toi i dr, 1992; Iino i dr., 1995; Yokoe, 1997; Kidd, 2000; Lau i dr., 2004; Ren i dr., 2006; Moradali i dr., 2007; Jiménez-Medina i dr., 2008; Harhaji i dr., 2008; Hirahara i dr., 2012; Zong i dr., 2012). Pokazana

sposobnost etanolnih ekstrakata plodonosnih tela i micelije *T. hirsuta* i *T. versicolor* da *in vitro* vrše supresiju proliferacije HeLa, LS174 i A549 ćelijskih linija je u saglasnosti sa rezultatima koje su Lau i dr. (2004) dobili za etanolne ekstrakte bazidiokarpa *T. versicolor* čije su se IC₅₀ vrednosti za ćelijske linije promijeloidne leukemije (HL-60 i NB-4) i Burkittovog limfoma (Raji) kretale u opsegu od 147,3 do 269,3 µg/mL. U poređenju sa rezultatima ovih autora citotoksična aktivnost etanolnog ekstrakta micelije *T. versicolor* BEOFB 321 je bila značajno veća, s obzirom da su IC₅₀ vrednosti za sve ispitivane ćelijske linije bile manje od 100,00 µg/mL. Takođe, na osnovu rezultata ovih autora kao i Harhaji i dr. (2008) za B16 ćelijsku liniju melanoma miša može se pretpostaviti da su inhibicija proliferacije i indukcija apoptoze i nekroze mehanizami kojima se ostvaruje citotoksična aktivnost ekstrakata. Hsieh i dr. (2002) su pokazali da se antiproliferativni efekat etanolnog ekstrakta *T. versicolor* zasniva na zaustavljanju ćelijskog ciklusa u G₀/G₁ fazi, a Harhaji i dr. (2008) da metanolni ekstrakt plodonosnih tela ove vrste zaustavlja ciklus ćelija melanoma B16 u S odnosno G₂/M fazi. Citotoksična aktivnost ekstrakata ispitivanih vrsta roda *Trametes* se može pripisati proteoglikanima, terpenoidnim i fenolnim jedinjenjima koja su rastvorljiva u etanolu i koja su nađena u ekstraktima bazidiokarpa i micelije vrsta ovog roda (Ren i dr., 2006; Harhaji i dr., 2008; Jiménez-Medina i dr., 2008; Hirahara i dr., 2012). S obzirom da su komponente ekstrakata vrsta roda *Trametes* pokazale značajne pozitivne rezultate u kliničkim studijama na pacijentima obolelim od različitih vrsta kancera (Kidd, 2000; Lindequist i dr., 2005; Cheng i Leung, 2008) i da je citotoksični efekat svojstvo većine antitumorskih lekova (Harhaji i dr., 2008), može se reći da je potencijal ispitivanih vrsta, a naročito selektivnost etanolnog ekstrakta micelije *T. hirsuta* u odnosu na kontrolnu ćelijsku liniju, od izuzetnog značaja za buduća istraživanja sa aspekta moguće primene u tretmanu kancera.

4.3.6. Potencijal inhibicije acetilholinesteraze i tirozinaze

Ekstrakti plodonosnih tela i micelije proučavanih vrsta su pokazali značajan potencijal u inhibiciji aktivnosti acetilholinesteraze (AChE) i tirozinaze u poređenju sa sintetičkim inhibitorima galantaminom odnosno kojičnom kiselinom (Grafik 18A,B). Nivo inhibicije

aktivnosti AChE ovim ekstraktima kretao se u opsegu od $24,7 \pm 0,6\%$ do $28,9 \pm 0,8\%$, a statistički značajnih razlika između ekstrakata plodonosnih tela i micelije nije bilo izuzev u slučaju *T. versicolor* gde je micelijski ekstrakt bio značajno bolji inhibitor aktivnosti ($P < 0,05$). Micelijski ekstrakt *T. versicolor* je bio i najefikasniji, naime inhibirao je aktivnost AChE za $28,9 \pm 0,8\%$ što je bilo skoro duplo manje od komercijalnog inhibitora galantamina ($57,1 \pm 1,7\%$) (Grafik 18A).



Grafik 18. Potencijal ekstrakata bazidiokarpa i micelije odabranih vrsta roda *Trametes* da inhibiciju aktivnost **A.** acetilholinesteraze i **B.** tirozinaze i komercijalnih inhibitora pri koncentraciji od 100 µg/mL.

Kada je u pitanju sposobnost inhibicije aktivnosti tirozinaze, najveći broj ekstrakata je pokazao visok stepen inhibicije koji se kretao od $49,5 \pm 4,2\%$ do $92,7 \pm 3,9\%$, osim u slučaju ekstrakta plodonosnih tela *T. gibbosa* gde je bio značajno niži, svega $21,9 \pm 1,0\%$ (Grafik 18B). Ekstrakti plodonosnih tela i micelije *T. gibbosa* su pokazali statistički značajne razlike u nivou inhibicije tirozinaze ($P < 0,001$), dok ta razlika nije bila uočena između ekstrakata druge dve testirane vrste. U poređenju sa kojičnom kiselinom kao sintetičkim inhibitorom aktivnosti tirozinaze koja je pri koncentraciji od 100,0 µg/mL

inhibirala $51,8 \pm 2,5\%$ enzima, ekstrakti *T. versicolor* su bili značajno bolji inhibitori aktivnosti ovog enzima (Grafik 18B).

Odabrane vrste roda *Trametes* su prvi put testirane sa aspekta inhibicije aktivnosti AChE i tirozinaze. Ranija istraživanja su pokazala da ekstrakti malog broja studiranih vrsta gljiva mogu da sadrže jedinjenja koja inhibiraju aktivnost AChE (Orhan i Üstün, 2011; Patocka, 2012; Teles i Takahashi, 2013; Wu i dr., 2015; Zhang i dr., 2015). Ova aktivnost se kod gljiva pre svega pripisuje terpenoidima i alkaloidima koji inaktivaciju molekula AChE ostvaruju vezivanjem za aktivni centar ili periferna vezujuća mesta enzima (Houghton i dr., 2006; Patocka, 2012; Jamila i dr., 2015; Zhang i dr., 2015). U poređenju sa stopom inhibicije aktivnosti AChE koju su El-Hadi i dr. (2014a) dobili za ekstrakte *Emericella unguis* (80%, pri koncentraciji od 200,0 µg/mL) inhibicija ekstraktima odabranih vrsta roda *Trametes*, koncentracije 100,0 µg/mL, se može smatrati značajnom. Ekstrakti ovih vrsta su se pokazali i kao znatno snažniji inhibitori aktivnosti tirozinaze i od ekstrakata *Aspergillus sydowii* (36%, pri koncentraciji od 200 µg/mL) i od komercijalnog inhibitora, kojične kiseline (El-Hadi i dr., 2014b). Ovaj viši potencijal ispitivanih ekstrakata u inhibiciji AChE i tirozinaze, u poređenju sa galantaminom odnosno kojičnom kiselinom, se može pripisati sinergističkoj interakciji više komponenti neprečišćenih ekstrakata u odnosu na aktivnost koju ostvaruju pojedinačna jedinjenja (Şenol i dr., 2010).

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Karakteristike Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza kao i nivo odabranog biljnog otpada zavise od tipa i dužine kultivacije, izvora ugljenika i azota, prisustva mikroelemenata i induktora:

- Čvrsta kultivacija *T. gibbosa* je optimalni tip kultivacije za aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza;
- Pšenična slama je bolji izvor ugljenika za aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza;
- Bukva je optimalni izvor ugljenika za aktivnost lakaze;
- *T. gibbosa* je efikasniji u razgradnji lignina, hemiceluloze i celuloze slame;
- Maksimalni nivoi aktivnosti Mn-oksidujućih peroksidaza i delignifikacije postižu se nakon 19 dana čvrste fermentacije pšenične slame;
- Azot u koncentraciji od 10,0 mM i formi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ uzrokuje višu aktivnost MnP (4933,5 U/L) kao i viši nivo degradacije lignina ($44,1 \pm 1,9\%$) u odnosu na kontrolu;
- Pšenične mekinje kao dodatni izvor azota u zastupljenosti od 10% u značajnoj meri indukuju aktivnost MnP (2945,2 U/L u odnosu na kontrolu 961,2 U/L) i selektivnost depolimerizacije lignoceluloze (48,3% lignina u odnosu na 27,1% celuloze);
- Prisustvo Zn i Mn stimuliše aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza, Zn i Fe povećava aktivnost lakaza a 0,5 mM Fe vodi selektivnoj razgradnji lignina;
- *p*-anizidin je najbolji testirani stimulator aktivnosti MnP dok veratril alkohol indukuje aktivnost MnIP i lakaza.
- Enzimska aktivnost u prisustvu mekinja zavisi od stope produkcije enzima a ne od broja sintetisanih izoformi.

2. Postoji značajna inter- i intraspecijska varijabilnost u aktivnosti enzima i degradaciji pšenične slame unutar roda *Trametes*:

- *p*-anizidin inhibira aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza kod najvećeg broja ispitivanih sojeva;

- Veratril alkohol stimulise aktivnost Mn-oksidujućih peroksidaza i lakaza kod najvećeg broja ispitivanih sojeva.
 - Veratril alkohol indukuje sintezu većeg broja izoformi MnP i lakaza za razliku od MnIP kod koga povećava nivo sinteze enzima;
 - Soj, prisustvo induktora i njihova međusobna interakcija značajno utiču na aktivnost ligninolitičkih enzima i nivo delignifikacije;
 - MnP je ključni enzim u procesu ligninolize;
 - *T. hirsuta* BEOFB 30 u prisustvu *p*-anizidina je najefikasniji razlagač lignina.
3. Etanolni ekstrakti micelije *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* su bolji antifungalni agensi od ekstrakata plodonosnih tela:
- Antifungalni potencijal ispitivanih vrsta opada sledećim redosledom: *T. hirsuta* > *T. versicolor* > *T. gibbosa*;
 - Bazirano na MIC vrednostima osetljivost testiranih humanih patogena na ekstrakte opada sledećim redosledom: *C. parapsilosis* > *C. albicans* > *A. glaucus* > *C. krusei* > *A. fumigates* > *A. flavus*;
 - Fungicidno dejstvo na *Aspergillus glaucus* ima samo micelijski ekstrakt *T. hirsuta*;
 - Testirani ekstrakti su značajno slabiji antifungalni agensi u odnosu na komercijalni, ketokonazol.
4. Etanolni ekstrakti plodonosnih tela i micelije *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* imaju visok antioksidativni kapacitet:
- Antioksidativni potencijal zavisi od vrste i materijala (bazidiokarp ili micelija);
 - Antioksidativni potencijal opada sledećim redosledom: *T. versicolor* > *T. hirsuta* > *T. gibbosa*;
 - Ekstrakti plodonosnih tela su efikasniji neutralizatori slobodnih radikala od ekstrakata micelije;
 - Testirani ekstrakti su slabiji antioksidansi od komercijalnog, L-askorbinske kiseline;
 - Fenoli su glavni nosioci antioksidativne aktivnosti ispitivanih vrsta.
5. Etanolni ekstrakti *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* imaju genoprotektivni efekat na leukocyte tretirane sa H₂O₂.

6. Etanolni ekstrakti plodonosnih tela i micelije *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* imaju citotoksični efekat na ćelijske linije humanog adenokarcinoma grlića materice, pluća i debelog creva;
- Ekstrakti micelije imaju veći citotoksični potencijal;
 - Ćelije humanog adenokarcinoma grlića materice (HeLa) su najosetljivije na testirane ekstrakte.
 - Ekstrakti *T. hirsuta* su najbolji i najselektivniji citostatici;
 - Testirani ekstrakti su slabiji citotoksični agensi od komercijalnih citostatika, *cis*-DDP i doksorubicina.
7. Ekstrakti plodonosnih tela i micelije *T. gibbosa*, *T. hirsuta* i *T. versicolor* su dobri inhibitori aktivnosti acetilholinesteraze i posebno tirozinaze.

6. LITERATURA

- Aaslyng, D., Rorbaek, K., Sorensen, N.H. (1996): An enzyme for dyeing keratinous fibres. International Patent Application WO9719998.
- Abraham, B.G., Berger, R.G. (1994): Higher fungi for generating aroma components through novel biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2344-2348.
- Acuña-Argüelles, M.E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. (1995): Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43: 808-814.
- Adamović, M., Grubić, G., Milenković, I., Jovanović, R., Protić, R., Sretenović, Lj., Stoićević, Lj. (1998): The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology*, 71: 357-362.
- Agostini, D'E.C., Mantovani, T.R.D., Valle, D.J.S., Paccola-Meirelles, L.D., Colauto, N.B., Linde, G.A. (2011): Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, 68: 295-300.
- Akhtar, M., Blanchette, R.A., Myers, G., Kirk, T.K. (1998): An overview of biochemical pulping research, in: Young, R.A., Akhtar, M., (Ed.), *Environmental friendly technologies for the pulp and paper industry*. New York, Wiley, Inc. pp. 309-340.
- Alic, M., Akileswaran, L., Gold, M.H. (1997): Characterization of the gene encoding manganese peroxidase isozyme 3 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1338: 1-7.
- Alonso, A., Pérez, P., Morcuende, R., Martínez-Carrasco, R. (2008): Future CO₂ concentrations, though not warmer temperatures, enhance wheat photosynthesis temperature response. *Physiologia Plantarum*, 132: 102-112.
- Alvarez, J.M., Canessa, P., Mancilla, R.A., Polanco, R., Santibanez, P.A., Vicuna, R. (2009): Expression of genes encoding laccase and manganese-dependent peroxidase in the fungus *Ceriporiopsis subvermispora* is mediated by an ACE1-like copperfist transcription factor. *Fungal Genetics and Biology*, 46: 104-111.
- Alves, M.J., Ferreira, I.C.F.R., Froufe, H.J.C., Abreu, R.M.V., Martins, A., Pintado, M. (2013): Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115: 346-357.
- Ames, B.N. (1983): Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221: 1256-1264.
- Anastasi, A., Tigini, V., Varese, G.C. (2013): The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi, U: Goltapeh, E.M. (Eds.), *Fungi as bioremediators*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 29-49.

- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P. (1994): The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. *Mutation Research*, 307: 261-271.
- Andersson, B.E., Lundstedt, S., Tornberg, K., Schnurer, Y., Lars, G., Berg, O., Mattiasson, B. (2003): Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22: 1238-1243.
- Andrews, J.M. (2001): Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48: 5-16.
- Arantes-Rodrigues, R., Henriques, A., Pires, M.J., Colaço, B., Fernandes, T., Cruz, P.L., Lopes, C., Fidalgo-Gonçalves, L., Vilela, S., Pedrosa, T., Peixoto, F., Oliveira, P.A., (2011): High doses of olive leaf extract induce liver changes in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1989-1997.
- Argyropoulos, D.S., Menachem, S.B. (1998): Biopolymers from renewable resources, in: Kaplan, D.L. (Ed.), Springer, Berlin, p. 292.
- Arias, M.E., Arenas, M., Rodriguez, J., Soliveri, J., Ball, A.S., Hernandez, M. (2003): Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a non-phenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1953-1958.
- Arora, D.S., Chander, M., Gill, P.K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50: 115-120.
- Asgher, M., Iqbal, H.M.N., Irshad, M. (2012): Characterization of purified and xerogel immobilized novel lignin peroxidase produced from *Trametes versicolor* IBL-04 using solid state medium of corncobs. *BMC Biotechnology*, doi: 10.1186/1472-6750-12-46.
- Aydin, R. (2005): Conjugated linoleic acid: Chemical structure, sources and biological properties. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 189-195.
- Bajpai, P., Bajpai, P.K., Akhtar, M., Jauhari, M.B. (2001): Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. *Journal of Pulp and Paper Science*, 27: 235-242.
- Bakkiyaraj, S., Aravindan, R., Arrivukkarasan, S., Viruthagiri, T. (2013): Enhanced laccase production by *Trametes hirsuta* using wheat bran under submerged fermentation. *International Journal of Chemical & Technology Research*, 5: 1224-1238.
- Balat, M., Balat, H. (2009): Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, 86(11): 2273-2282.
- Baldrian, P., Gabriel, J. (2002): Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 206: 69-74.
- Baldrian, P. (2003): Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 78-91.
- Baldrian, P. (2006): Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215-242.

- Bao, W., O'Malley, D., Whetten, R., Sederoff, R. (1993): A laccase associated with lignification in Loblolly pine xylem. *Science*, 260: 672-674.
- Barbisan, L.F., Scolastici, C., Miyamoto, M., Salvadori, D.M., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Camargo, J.L. (2003): Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine. *Genetics and Molecular Research*, 2: 295-308.
- Barbosa, E.S., Perrone, D., Vendramini, A.L.A., Leite, S.G.F. (2008): Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation. *BioResources*, 3: 1042-1050.
- Barrios-González, J. (2012): Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47: 175-185.
- Barron, D., Ibrahim, R.K. (1996): Isoprenylated flavonoids – a survey. *Phytochemistry*, 43: 921-982.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2007): Effect of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4781-4788.
- Belinky, P.A., Flikshtein, N., Dosoretz, C.G. (2006): Induction of lignin peroxidase via reactive oxygen species in manganese-deficient cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 222-228.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Bérdy, J. (2005): Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58: 1-26.
- Bertrand, G. (1896): Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences*, 123: 463-465.
- Blaich, R., Esser, K. (1975): Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Archives of Microbiology*, 103: 271-277.
- Blanchette, R.A., Krueger, E.W., Haight, J.E., Akhtar, M., Akin, D.E. (1997): Cell wall alterations in loblolly pine wood decayed by the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. *Journal of Biotechnology*, 53: 203-213.
- Blois, M.S. (1958): Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Blumenthal, K. (2011): Generation and treatment of municipal waste. *Eurostat, Statistics in Focus* 31: 1-12.
- Bohi, K.M.E., Sabik, L., Muzandu, K., Shaban, Z., Soliman, M., Ishizuka, M., Kazusaka, A., Fujita, S. (2005): Antigenotoxic effect of *Pleurotus cornucopiae* extracts on the mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA98 elicited by benzo [a] pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 52: 163-172.
- Bollag, J.M., Leonowicz, A. (1984): Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied and Environment Microbiology*, 48: 849-854.

- Bonnarme, P., Jeffries, T.W. (1990): Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. *Applied and Environment Microbiology*, 56: 210-217.
- Bonnarme, P., Perez, J., Jeffries, T.W. (1991): Regulation of ligninase production in white-rot fungi. U: Leathanl, G.F., Himmel, M.E. (Eds.), *Enzymes in biomass conversion: Proceedings of a symposium 1990*, Boston, MA, ACS symposium series 460. American Chemical Society, Washington, DC.
- Boominathan, K., Reddy, C.A. (1992): cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 5586-5590.
- Boominathan, K., Souza, D.T.M., Naidu, P.S., Dosoretz, C., Reddy, C.A. (1993): Temporal expression of the major lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environment Microbiology*, 59: 3946-3950.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brakhage, A.A., Liebmam, B. (2005): *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology*, 43: S75-S82.
- Brenner, M., Hearing, V.J. (2008): The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84: 539-549.
- Brown, J.A., Alic, M., Gold, M.H. (1991): Manganese peroxidase gene-transcription in *Phanerochaete chrysosporium* - activation by manganese. *Journal of Bacteriology*, 173: 4101-4106.
- Brown, J.A., Li, D., Alic, M., Gold, M.H. (1993): Heat shock induction of manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environment Microbiology*, 59:4295-4299.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D. (1985): Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. *Science*, 228: 1434-1436.
- Burton, G.J., Jauniaux, E. (2010): Oxidative stress. *Best practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 25: 1-13.
- Buswell, J.A., Cai, Y.J., Chang, S.T. (1995): Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese-peroxidase and laccase production of *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 81-88.
- Cabaleiro, D.R., Rodriguez, S., Sanroman, A., Longo, M.A. (2001): Characterisation of deactivating agents and their influence on the stability of manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76: 867-872.
- Cheung, P.C.K. (2013): Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: Preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*, 2: 162-166.
- Call, H.P., Mücke, I. (1997): History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology*, 53: 163-202.

- Calzada, J.F., Franco, L.F., Arriola, D.M.C., Rolz, C., Ortiz, M.A. (1987): Acceptability, body weight changes and digestibility of spent wheat straw after harvesting of *Pleurotus sajor-caju*. *Biological Waste* 22: 303-309.
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (1999): Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 10324-10330.
- Camarero, S., Pardo, I., Cañas, A.I., Molina, P., Record, E., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Alcalde, M. (2012): Engineering platforms for directed evolution of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environment Microbiology*, 78: 1370-1384.
- Canas, A.I., Camarero, S. (2010): Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*, 28: 694-705.
- Cancel, M.A., Orth, A.B., Tien, M. (1993): Lignin and veratryl alcohol are not inducers of the ligninolytic system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2909-2913.
- Cardona, C.A., Sánchez, Ó.J. (2007): Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12): 2415-2457.
- Castanera, R., Pérez, G., Omarini, A., Alfaro, M., Pisabarro, A.G., Faraco, V., Amore, A., Ramírez, L. (2012): Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and Environment Microbiology*, 78: 4037-4045.
- Catal, T., Liu, H., Bermek, H. (2008): Selenium induces manganese-dependent peroxidase production by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* (Willdenow) P. Karsten. *Biological Trace Element Research*, 123: 211-217.
- Chandel, A.K., Gonçalves, B.C., Strap, J.L., da Silva, S.S. (2013): Biodelignification of lignocellulose substrates: An intrinsic and sustainable pretreatment strategy for clean energy production. *Critical Reviews in Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2013.841638>.
- Chandra, R., Bura, R., Mabee, W.E., Berlin, A., Pan, X., Saddler, J.N. (2007): Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels*, 108: 67-93.
- Chang, R. (1996): Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Reviews*, 54: 257-265.
- Chen, D.M., Bastias, B.A., Taylor, A.F.S., Cairney, J.W.G. (2003): Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. *New Phytologist*, 157: 547-554.
- Cheng, K.F., Leung, P.C. (2008): General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and clinical studies. *Cancer Therapy*, 6: 117-130.
- Cheung, P.C.K. (2008): *Mushrooms as functional food*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA.
- Chiaramonte, R., Bartolini, E., Riso, P., Calzavara, E., Erba, D., Testolin, G., Comi, P., Sherbet, G.V. (2001): Oxidative stress signalling in the apoptosis of Jurkat T-lymphocytes. *Journal of Cell Biochemistry*, 82: 437-444.

- Cho, N.S., Wilkolazka, A.J., Staszczak, M., Cho, H.Y., Ohga, S. (2009): The role of laccase from white rot fungi to stress conditions. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, 54: 81-83.
- Choi, Y., Lee, S.M., Chun, J., Lee, H.B., Lee, J. (2006): Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99: 381-387.
- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H., Piontek, K. (1999): The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C β of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology*, 286: 809-827.
- Choudhury, S., Sahoo, N., Manthan, M., Rohela, R.S. (1998): Fungal treatment of pulp and paper mill effluents for pollution control. *Journal of Industrial Pollution Control*, 14: 1-13.
- Chu, K.K.W., Ho, S.S.S., Chow, A.H.L. (2002): *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42: 976-984.
- Clutterbuck, A.J. (1972): Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 70(3): 423-435.
- Collins, P.J., Dobson, A. (1997): Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environment Microbiology*, 63: 3444-3450.
- Collins, R.A., Ng, T.B. (1997). Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sciences*, 60: 383-387.
- Cordi, L., Minussi, R.C., Freire, R.S., Duran, N. (2007): Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1255-1259.
- Córdoba, K.A., Ríos, A.H. (2012): Biotechnological applications and potential uses of the mushroom *Trametes versicolor*. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 19: 70-76.
- Couto, S.R., Gundín, M., Lorenzo, M., Sanromán, M.A. (2002): Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38: 249-255.
- Cowan, M.M. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Crowe, J.D., Olsson, S. (2001): Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environment Microbiology*, 67: 2088-2094.
- Cui, F., Dolphin, D. (1991): Veratryl alcohol as mediator in lignin model compound biodegradation. *Holzforschung*, 45: 31-35.
- Cui, J., Chisti, Y. (2003): Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21: 109-122.

- Cui, D.Z., Zhao, M., Yang, H.Y., Wang, C.I., Dai, H.B. (2011): Molecular phylogeny of *Trametes* and related genera based on internal transcribed spacer (ITS) and nearly complete mitochondrial small subunit ribosomal DNA (mt SSU rDNA) sequences. *African Journal of Biotechnology*, 10(79): 18111-18121.
- Ćilerdžić, J., Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S., Knežević, A. (2011): Potential of *Trametes hirsuta* to produce ligninolytic enzymes during degradation of agricultural residues. *Bioresources*, 6: 2885-2895.
- Ćilerdžić, J., Vukojević, J., Stajić, M., Stanojković, T., Glamočlija, J. (2014): Effect of substrate on antimicrobial, antioxidant and anticancer potential of *Ganoderma lucidum* basidiocarp extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 155: 312-319.
- Daglia, M. (2012): Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 174-181.
- Das, N., Chakraborty, T.K., Mukherjee, M. (2001): Purification and characterization of a growth-regulating laccase from *Pleurotus florida*. *Journal of Basic Microbiology*, 41: 261-267.
- De Billerbeck, V.G., Roques, C.G., Bessi re, J.M., Fonvieille, J.L., Dargent, R. (2001): Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 9-17.
- Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L. (1994): Laccase and the deposition of lignin in vascular cells. *Holzforzchung*, 48: 21-33.
- Demirbas, A. (2009): Progress and recent trends in biodisel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50: 14-34.
- Dhakar, K., Pandey, A. (2013): Laccase production from a temperature and pH tolerant fungal strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397). *Enzyme Research*, Article ID 869062, 9 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/869062>.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., Evtuguin, D.V., Bezerra, R.M.F. (2010): Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 101: 6045-6050.
- Dorado, J., Van Beek, T.A., Classen, F.W., Sierra-Alvarez, R. (2001): Degradation of lipophilic wood extractive constituents in *Pinus silvestris* by the white rot fungi *Bjerkandera* sp. and *Trametes versicolor*. *Wood Science and Technology*, 35: 117-125.
- Doyle, W.A., Blodig, W., Veitch, N.C., Piontek, K., Smith, A.T. (1998): Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 37: 15097-15105.
- Ekmekcioglu, C., Feyertag, J., Marktl, W. (1998): Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. *Cancer Letters*, 128: 137-144.
- El-Hady, F.K.A., Abdel-Aziz, M.S., Shaker, K.H., El-Shahid, Z.A., Ghani, M.A. (2014a): Coral-derived fungi inhibit acetylcholinesterase, superoxide anion radical and microbial activities. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 26: 301-308.

- El-Hady, F.K.A., Abdel-Aziz, M.S., Shaker, K.H., El-Shahid, Z.A. (2014b): Tyrosinase, acetylcholinesterase inhibitory potential, antioxidant and antimicrobial activities of sponge derived fungi with correlation to their GC/MS analysis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 26: 338-345.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Bakradze, M. (2002): Physiological regulation of edible and medicinal higher basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4: 159-166.
- Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., Kvesitadze, G. (2006): Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 998-1004.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E. (2009): Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144: 37-42.
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., Agatho, S.N. (2010): Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *Journal for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37: 1091-1096.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colourimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Enshasy, H.A.E., Hatti-Kaul, R. (2013): Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, 31: 668-677.
- Erden, E., Ucar, M. C., Cigdem, M., Gezer, T., Pazarlioglu, N. K. (2009): Screening for ligninolytic enzymes from autochthonous fungi and applications for decolorization of remazole marine blue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:346-353.
- Eriksson, K. E. L., Blanchette, R. A., Ander, P. (1990): Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, pp. 407.
- Evans, C.S., Gallagher, I.M., Atkey, P.T., Wood, D.A. (1991): Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. *Biodegradation*, 2: 93-106.
- Evans, C.S., Dutton, M.V., Guillén, R.G. (1994): Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocelluloses degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13: 235-240.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.
- Faison, B.D., Kirk, T.K., Farrella, R.L. (1986): Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 52: 251-254.
- Faix, O. (1991): Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy, *Holzforschung*, 45 (21): 21-27.
- Faraco, V., Giardina, P., Sannia, G. (2003): Metal responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 149: 2155-2162.

- Fazaeli, H., Azizi, A., Amile, M. (2006): Nutritive value index of treated wheat straw with *Pleurotus* fungi fed to sheep. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9: 2444-2449.
- Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Romero, A., Hammel, K.E., Medrano, F.J., Martínez, A.T. (2014): Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology for Biofuels*, 7: 2.
- Ferreira, P., Hernandez-Ortega, A., Herguedas, B., Martínez, A. T., Medina, M. (2009a): Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation: a mechanistic study based on steady and pre-steady state kinetics and primary and solvent isotope effects with two alcohol substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 24840-24847.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009b): Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16: 1543-1560.
- Ferry, Y., Leech, D. (2005): Amperometric detection of catecholamine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis*, 17: 2113-2119.
- Fisher, M., Yang, L.X. (2002): Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Research*, 22: 1737-1754.
- Franke, S.I.R., Pra, D., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P., Da Silva, J. (2005): Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an *in vivo* analysis. *Mutagenesis*, 20: 279-283.
- Fridovich, I. (1998): Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*. 201: 1203-1209.
- Gad, G.M. (2001): *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Galhaup, C., Haltrich, D. (2001): Enhanced formation of laccase activity by the white rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 225-232.
- Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., Haltrich, D. (2002a): Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 148: 2159-2169.
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. (2002b): Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 529-536.
- Gao, Y., Zhou, S.H., Chen, G., Dai, X., Ye, J. (2003): A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Extract (ganopoly) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4: 207-214.
- Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Li, X., Zhou, S. (2005): Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. *Food Reviews International*, 21: 211-229.
- Gasser S., Raulet, D. (2006): The DNA damage response, immunity and cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 16: 344-347.
- Gebhart, E. (1992): Anticlastogenicity in cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 267: 211-220.

- Germann, U.A., Muller, G., Hunziker, P.E., Lerch, K. (1988): Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 885-896.
- Gettemy, J.M., Ma, B., Alic, M., Gold, M.H. (1998): Reverse transcription-PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 569-574.
- Ghaffar, S.H., Fan, M. (2013): Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw. *Biomass and Bioenergy*, 57: 264-279.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J. (1999): Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 3: 1-25.
- Giardina, P., Cannio, R., Martirani, L., Marzullo, L., Palmieri, G., Sannia, G. (1995): Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environment Microbiology*, 61: 2408-2413.
- Giardina, P., Palmieri, G., Scalonì, A., Fontanella, B., Faraco, V., Cennamo, G., Sannia, G. (1999): Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 341: 655-663.
- Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Riviaccio, V., Sannia, G. (2000): Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 376: 171-179.
- Ginterová, A., Lazarová, A. (1987): Degradation dynamics of lignocellulose materials by wood-rotting *Pleurotus* fungi. *Folia Microbiologica*, 32: 434-437.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.L., Bally, R. (1993): Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 108: 205-210.
- Glenn, J.K., Gold, M.H. (1985): Purification and characterization of an extracellular Mn (II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 242: 329-341.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. (1970): Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). USDA Agricultural Research Service. Handbook number 379 as modified by D.R. Mertens (1992, Personal Communication).
- Gold, M.H., Alic, M. (1993): Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*, 57: 605-622.
- Gómez, S.Q., Arana-Quenca, A., Flores, Y.M., Rodríguez, J.N.G., Téllez-Jurado, A. (2012): Effect of particle size and aeration on the biological delignification of corn straw using *Trametes* sp. 44. *Bioresources*, 7: 327-344.
- González, L.F., Sarria, V., Sánchez, O.F. (2010): Degradation of chlorophenols by sequential biological-advanced oxidative process using *Trametes pubescens* and TiO₂/UV. *BioresourceTechnology*, 101: 3493-3499.

- Goodell, B., Jellison, J., Liu, J., Daniel, G., Paszczynski, A., Fekete, F., Krishnamurthy, S., Jun, L., Xu, G. (1997): Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood-decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *Journal of Biotechnology*, 53: 133-162.
- Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G.E., Hearing, V.J., Clarimon, J., Singleton, A., Eerola, J., Hellstro. O., Tienari, P.J., Miller, D.W., Beilina, A., Bubacco, L., Cookson, M.R. (2005): Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93: 246-256.
- Grüter, A., Friederich, U., Würgler, F.E. (1991): The mutagenicity of edible mushrooms in a histidine-independent bacterial test system. *Food and Chemical Toxicology*, 29: 159-165.
- Guillén, F., Gómez-Toribio, V., Martinez, M.J., Martínez, A.T. (2000): Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl-alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383: 142-147.
- Gupta, A., Verma, J.P. (2015): Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 41: 550-567.
- Gutiérrez, A., Caramelo, L., Prieto, A., Martinez, M.J., Martinez, A.T. (1994): Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi from the genus *Pleurotus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1783-1788.
- Gutiérrez, A., Rio D.J.C., Rencoret, J., Ibarra, D., Martínez, A.T. (2006): Main lipophilic extractives in different paper pulp types can be removed using the laccase-mediator system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 845-851
- Hadar, Y. (2013): Sources for lignocellulosic raw materials for the production of ethanol, in: Faraco, V. (Ed.), *Lignocellulose conversion*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 21-38.
- Haderlein, A., Legros, R., Ramsay, B.A. (2006): Pyrene mineralization capacity increases with compost maturity. *Biodegradation*, 17: 293-302.
- Hakala, T.K., Hilden, K., Maijala, P., Olsson, C., Hatakka, A. (2006): Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73: 839-849.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989): *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hammel, E.K. (1997): Fungal degradation of lignin, U: Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition, Cadisch, G. and Giller, K.E. (Eds.), CAB INTERNATIONAL, United Kingdom, 33-45.
- Hammel, K.E. (1992): Oxidation of aromatic pollutants by lignin-degrading fungi and their extracellular enzymes, in: Sigel, H., Sigel, A. (Eds.), Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 41-60.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A., Ryan, Z.C. (2002): Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 445-453.

- Hammel, K.E., Cullen, D. (2008): Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 349-355.
- Hamzeh, Y., Ashori, A., Khorasani, Z., Abdulkhani, A., Abyaz, A. (2013): Pre-extraction of hemicelluloses from bagasse fibers: Effects of dry-strength additives on paper properties. *Industrial Crops and Products*, 43: 365-371.
- Hanson, J.R. (2008): *The Chemistry of Fungi*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Harada, H., Sakagami, H., Konno, K., Sato, T., Osawa, N., Fujimaki, M., Komatsu, N. (1989): Antimicrobial activity induction by PSK subfractions: Dependence on molecular weight. *Infection*, 17: 38-39.
- Harhaji, Lj., Mijatović, S., Maksimović-Ivanić, D., Stojanović, I., Momčilović, M., Maksimović, V., Tufegdžić, S., Marjanović, Ž., Mostarica-Stojković, M., Vučinić, Ž., Stošić-Grujičić, S. (2008): Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* study. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 1825-1833.
- Harvey, P.J., Schoemaker, I.L.L., Palmer, J.M. (1986): Veratryl alcohol as a mediator in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 95: 242-246.
- Hatakka, A., (2001): Biodegradation of lignin. U: Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (Eds.), *Biopolymers*. Vol. 1: Lignin, Humic substances and Coal. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 129-180.
- Hatvani, N. (2001): Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17: 71-74.
- Hatvani, N., Mecs, I. (2002): Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 381-386.
- Hatvani, N., Mécs, I. (2003): Effect of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 199-203.
- Havsteen, B. (1983): Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, 32: 1141-1148.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A. T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998a): Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiology Letters*, 165: 43-50.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U. (1998b): Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in the manganese-independent reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(8): 2788-2793.
- Heleno, S.A., Stojković, D., Barros, D., Glamočlija, J., Soković, M., Martins, A., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R. (2013a): A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Morchella esculenta* (L.) Pers. from Portugal and Serbia. *Food Research International*, 51: 236-243.

- Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., Queiroz, M.J.R.P. (2013b): Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, *p*-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58: 95-100.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998): The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13: 89-94.
- Hibbett, D.S., Donoghue, M.J. (2001): Analysis of character correlations among wood decay mechanisms, mating systems, and substrate ranges in homobasidiomycetes. *Systematic Biology*, 50: 215-242.
- Hilden, K., Martinez, A.T., Hatakka, A., Lundell, T. (2005): The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 403-419.
- Hirahara, N., Fujioka, M., Edamatsu, T., Fujieda, A., Sekine, F., Wada, T., Tanaka, T. (2012): Protein-bound polysaccharide-K (PSK) induces apoptosis and inhibits proliferation of promyelomonocytic leukemia HL-60 cells. *Anticancer Research*, 31: 2733-2738.
- Hleba, L., Vuković, N., Petrová, J., Kačániová, M. (2014): Antimicrobial activity of crude methanolic extracts from *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnology*, 47: 89-93.
- Hobbs, C. (1995): *Medicinal Mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture*. Botanica Press, Santa Cruz, California.
- Hoegger, P.J., Kilaru, S., James, T.Y., Thacker, J.R., Kües, U. (2006): Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*, 273: 2308-2326.
- Hofrichter, M. (2002): Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 454-466.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T. (2010): New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87: 871-897.
- Hölker, U., Lenz, J. (2005): Solid-state fermentation are there any biotechnological advantages. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 301-306.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J. (2006): Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports*, 23: 181-199.
- Hsieh, T.C., Kunicki, J., Darzynkiewicz, Z., Wu, J.M. (2002): Effects of extracts of *Coriolus versicolor* (I'm-Yunity) on cell-cycle progression and expression of interleukins-1 beta, -6, and -8 in promyelocytic HL-60 leukemic cells and mitogenically stimulated and nonstimulated human lymphocytes. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 8: 591-602.
- Huang, S.J., Tsai, S.Y., Mau, J.L. (2006): Antioxidant properties of methanolic extracts of *Agrocybe cylindracea*. *LWT – Food Science and Technology*, 39: 378-386.

- Iino, Y., Yokoe, T., Maemura, M., Horiguchi, J., Takei, H., Ohwada, S., Morishita, Y. (1995): Immunochemotherapies versus chemotherapy as adjuvant treatment after curative resection of operable breast cancer. *Anticancer Research*, 15: 2907-2911.
- Ilmen, M., Onnela, M.L., Klemsdal, S., Keranen, S., Penttila, M. (1996): Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Molecular and General Genetics*, 253: 303-314.
- Iqbal, H.M.N., Kyazze, G., Keshavarz, T. (2013): Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, 8(2), 3157-3176.
- Jain, A., Morlok, C.K., Henson, J.M. (2013): Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 905-917.
- Jamila, N., Khairuddean, M., Yeong, K.K., Osman, H., Murugaiyah, V. (2015): Cholinesterase inhibitory triterpenoids from the bark of *Garcinia hombroniana*. *Journal of Enzyme inhibition and Medicinal Chemistry*, 30: 133-139.
- Janusz, G., Rogalski, J., Barwinska, M., Szczodrak, J. (2006): Effects of culture conditions on production of extracellular laccase by *Rhizoctonia praticola*. *Polish Journal of Microbiology*, 55: 309-319.
- Janusz G, Rogalski J, Szczodrak J. (2007): Increased production of laccase by *Cerrena unicolor* in submerged liquid cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1459-1464.
- Janusz, G., Kucharzyk, K.H., Pawlik, A., Staszczak, M., Paszczynski, A.J. (2013): Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 52: 1-12.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2007): Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology*, 42: 183-191.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2011): *In-vitro* and *in-vivo* antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *African Journal of Biotechnology*, 6: 1732-1739.
- Jeffries, T.W., Choi, S., Kirk, T.K. (1981): Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environment Microbiology*, 42: 290-296.
- Jellison, J., Connolly, J., Goodel, B., Doyle, B., Illman, B., Fekete, F., Ostrofsky, A. (1997): The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 39: 165-179.
- Jentsch, S. (1992): The ubiquitin-conjugation system. *Annual Review of Genetics*, 26: 179-207.
- Jerusik, R.J. (2010): Fungi and paper manufacture. *Fungal Biology Reviews*, 24: 68-72.
- Jimenez, L., Martínez, C., Perez, I., Lopez, F. (1997): Biobleaching procedures for pulp from agricultural residues using *Phanerochaete chrysosporium* and enzymes. *Process Biochemistry*, 32: 297-304.

- Jiménez-Medina, E., Berruguilla, E., Romero, I., Algarra, I., Collado, A., Garrido, F., Garcia-Lora, A. (2008): The immunomodulator PSK induces *in vitro* cytotoxic activity in tumour cell lines via arrest of cell cycle and induction of apoptosis. *BMC Cancer*, 8: 78.
- Johansson, T., Welinder, K.G., Nyman, P.O. (1993): Isozymes of lignin peroxidase and manganese(II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*. Partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300: 57-62.
- Johansson, T., Nyman, P.O. (1996): A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene*, 170: 31-38.
- John, B., Sulaiman, C.T., Sadashiva, C.T., George, S., Reddy, V.R.K. (2013): In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition of *Baliospermum montanum*, *Humboldtia brunonis* Wall. var. *raktapushpa* and *Pittosporum viridulum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 63-65.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H. (2005): Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133: 71-84.
- Johnsy, G., Kaviyarasana, V. (2011): Antimicrobial and antioxidant properties of *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr. *Journal of Pharmacy Research*, 4: 3939-3942.
- Johnsy, G., Kaviyarasana, V. (2014): Effect of physico-chemical parameters on ligninolytic enzyme production of an indigenous isolate of *Neolentinus kauffmanii* under submerged culture condition. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2: 464-468.
- Kada, T., Inoue, T., Namiko, N. (1982): Environmental desmutagens and antimutagens, U: Klekowski, E.J. (Eds.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*. Praeger, New York, pp. 137-151.
- Kada, T. (1983): Environmental and biological factors suppressing induction of mutagens. *Toxicology Forum*, 6: 580-589.
- Kalogeropoulos, N., Yanni, A.E., Koutrotsios, G., Aloupi, M. (2013): Bioactive microconstituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 378-385.
- Kamei, I., Daikoku, C., Tsutsumi, Y., Kondo, R. (2008): Saline-dependent regulation of manganese peroxidase genes in the hypersaline-tolerant white rot fungus *Phlebia* sp. strain MG-60. *Applied and Environment Microbiology*, 74: 2709-2716.
- Kamiyama, M., Horiuchi, M., Umano, K., Kondo, K., Otsuka, Y., Shibamoto, T. (2013): Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2: 85-91.
- Kang, K.Y., Jo, B.M., Oh, J.S., Mansfield, S.D. (2003): The effects of biopulping on chemical and energy consumption during kraft pulping of hybrid poplar. *Wood and Fiber Science*, 35: 594-600.
- Kapich, A.N., Prior, B.A., Botha, A., Galkin, S., Lundell, T., Hatakka, A. (2004): Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 187-195.

- Karaman, M., Jovin, E., Malbaša, R., Matavulj, M., Popović, M. (2010): Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*, 24: 1473-1481.
- Karaman, M., Matavulj, M., Janjić, Lj. (2012): Antibacterial agents from lignicolous macrofungi. U: *Antimicrobial Agents*, Bobbarala, V. (Eds.), InTech, pp. 361-386.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. (1994): Enumeration and characterization of soil microflora from hydrocarbon contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41: 267-273.
- Kavanagh, F., Hervey, A., Robbins, W.J. (1950): Antibiotic substances from Basidiomycetes. VI. *Agrocybe dura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36: 102-106.
- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T. (1987): *De novo* synthesis of veratryl alcohol by *Coriolus versicolor*. *Wood Research*, 73: 18-21.
- Kelley, S., Glasser, W. (1987): *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, John Wiley and sons, New York, 2nd edn, vol. 8, pp 795-796.
- Kenkebashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S.P. (2012): Effect of carbon, nitrogen sources, and copper concentration on the ligninolytic enzyme production by *Coriolopsis gallica*. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology*, 1: 22-27.
- Kersten, P. J. (1990): Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 87: 2936-2940.
- Keum, Y.S., Li, Q.X. (2004): Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 588-592.
- Khan, T.S., Mubeen, U. (2012): Wheat straw: A pragmatic overview. *Journal of Biological Sciences*, 4: 673-675.
- Kidd, P.M. (2000): The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 5: 4-27.
- Kiiskinen, L.L. (2004): Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*. Helsinki, Finland: VTT Publications, p. 556.
- Kilaru, S., Hoegger, P.J., Kues, U. (2006): The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics*, 50: 45-60.
- Kim, S., Dale, B.E. (2004): Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass & Bioenergy*, 26: 361-375.
- Kim, G., Choia, Y., Kim, J. (2009): Improving the efficiency of metal removal from CCA-treated wood using brown rot fungi. *Environmental Technology*, 30: 673-679.
- Kirk, T.K. (1987): The lignin-degrading enzyme-system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 194: 157-160.

- Kirk, T.K., Farrell, R.L. (1987): Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505.
- Kirk, T.K., Obst, J.R. (1988): Lignin determination, U: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology* 161. Academic Press Inc., San Diego, pp. 87-101.
- Kirk, T.K., Cullen, D. (1998): *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi*. Editors: Young, R. A. i Akhtar, M.
- Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2011): Ligninolytic enzyme production by *Lenzites betulinus* on selected plant raw materials. *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska, Novi Sad*, 120: 333-338.
- Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Lončar, N., Brčeski, I., Vukojević, J., Čilerdžić, J. (2013a): Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117-123.
- Knežević, A., Milovanović, I., Stajić, M., Vukojević, J. (2013b): Potential of *Trametes* species to degrade lignin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85: 52-56.
- Knežević, A., Stajić, M., Vukojević, J., Milovanović, I. (2014). The effect of trace elements on wheat straw degradation by *Trametes gibbosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 152-156.
- Kobayashi, H.K., Matsunaga, K., Oguchi, Y. (1995): Antimetastatic effect of PSK (Krestin), a protein-bound polysaccharide obtained from Basidiomycetes: an overview. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 4: 275-281.
- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T. (2012): Antioxidant, antimicrobial, and anticancer activity of 3 *Umbilicaria* species. *Journal of Food Science*, 71: T20-T25.
- Kout, J., Vlasák, J. (2007): *Trametes gibbosa* (Basidiomycetes, Polyporales) in the USA and Canada. *Canadian Journal of Botany*, 85: 342-346.
- Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrić, M.M., Todorović, N., Jakovljević, D., Van Griensven, L.J.L.D. (2012): Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26: 144-153.
- Kuijk, S.J.A., Sonnenberg, A.S.M., Baars, J.J.P., Hendriks, W.H., Cone, J.W. (2015): Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed ingredient: A review. *Biotechnol Advances*, 33: 191-202.
- Kullander, S. (2010): Food security: crops for people not for cars. *Ambio*, 39: 249-256.
- Kumar, S.V.S., Prashant, S.P., Durani, S., Wangikar, P.P. (2003): Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, 83: 386-394.
- Lanfermann, I., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G. (2015): Manganese peroxidases from *Ganoderma applanatum* degrade β -carotene under alkaline conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175: 3800-3812.

- Lapierre, C. (1993): Application of new methods for the investigation of lignin structure. U: Jung, H.G., Buxton, D.R., Hatfield, R.D., Ralph, J. (Eds.) Forage Cell Wall Structure and Digestibility. American Society of Agronomy Madison, WI, pp 133-166.
- Larraya, L.M., Pérez, G., Ritter, E., Pisabarro, A.G., Ramírez, L. (2000): Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environment Microbiology, 66: 5290-5300.
- Lau, C.B.S., Ho, C.Y., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H.H.L., Chow, M.S.S. (2004): Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis. Life Sciences, 75: 797-808.
- Leatham, G.F., Kirk, T.K. (1983): Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. FEMS Microbiology Letters, 16: 65-67.
- Leatham, G.F. (1986): Ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology, 24: 51-58.
- Lekounougou, S., Mounquengui, S., Dumarçay, S., Rose, C., Courty, P.E., Garbaye, J., Gérardin, P., Jacquot, J.P., Gelhaye, E. (2008): Initial stages of *Fagus sylvatica* wood colonization by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: enzymatic characterization. International Biodeterioration and Biodegradation, 61: 287-293.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtás-Wasilewska, M., Cho, N., Hofrichter, M., Rogalski, J. (1999): Biodegradation of lignin by white rot fungi. Fungal Genetics and Biology, 27: 175-185.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J. (2001): Fungal laccase: properties and activity on lignin. Journal of Basic Microbiology, 41(3-4): 185-227.
- Levin, L., Forchiassin, F., Ramos, A.M. (2002): Copper induction of lignin-modifying enzymes in the white-rot fungus *Trametes trogii*. Mycologia, 94: 377-383.
- Levin, L., Herrmann, C., Papinutti, V.L. (2008): Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus *Trametes trogii* in solid-state fermentation using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 39: 207-214.
- Levin, L., Malignani, E., Ramos, A.M. (2010): Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. Bioresource Technology, 101: 4554-4563.
- Li, D., Alic, M., Brown, J.A., Gold, M.H. (1995): Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. Applied and Environment Microbiology, 61: 341-345.
- Li, D., Li, N., Ma, B., Mayfield, M.B., Gold, M.H. (1999): Characterization of genes encoding two manganese peroxidases from the lignin-degrading fungus *Dichomitus squalens*. Biochimica et Biophysica Acta, 1434: 356-364.

- Li, P., Wang, H., Liu, G., Li, X., Yao, J. (2011): The effect of carbon source succession on laccase activity in the co-culture process of *Ganoderma lucidum* and a yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 1-6.
- Likhitwitayawuid, K., Sritularak, B. (2001): A new dimeric stilbenewith tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *Journal of Natural Products*, 64: 1457-1459.
- Limon-Pacheco, J., Gonshebbat, M.E. (2009): The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induces oxidative stress. *Mutation Research*, 674: 137-147.
- Lin, Y., Tanaka, S. (2006): Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 627-642.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J., Jülich, W.D. (2005): The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-299.
- Litvintseva, A.P., Henson, J.M. (2002): Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environment Microbiology*, 68: 1305-1311.
- Łobarzewski, J., Trojanowski, J. (1979): Induction by ferulic acid of multiple forms of peroxidase in the fungus *Trametes versicolor* (Basidiomycetes). *Acta Biochimica Polonica*, 26: 309-317.
- Lobos, S., Larrain, J., Salas, L., Cullen, D., Vicuna, R. (1994): Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*, 140: 2691-2698.
- Locci, E., Laconi, S., Pompei, R., Scano, P., Lai, A., Marincola, F.C. (2008): Wheat bran biodegradation by *Pleurotus ostreatus*: A solid-state Carbon-13 NMR study. *Bioresource Technology*, 99: 4279-4284.
- Lomascolo, A., Stentelaire, C., Asther, M., Lesage-Meessen, L. (1999): Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in Biotechnology*, 17: 282-289.
- Lorenzo, M., Moldes, D., Sanromán, M.Á. (2006): Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere*, 63: 912-917.
- Lukáš, H., Vuković, N., Petrová, J., Kačániová, M. (2014): Antimicrobial activity of crude methanolic extracts from *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor*. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 47: 89.
- Lundell, T.K., Makela, M.R., Hilden, K. (2010): Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50: 5-20.
- Lundquist, K., Kirk, T.K. (1978): *De novo* synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry*, 17: 1676.
- Lushchak, V.I. (2011): Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 153: 175-190.
- Lykkesfeldt, J., Svendsten, O. (2007): Oxidants and antioxidants in diseases: Oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173: 502-511.

- Mach, R.L., Strauss, J., Zeilinger, S., Schindler, M., Kubicek, C.P. (1996): Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 21: 1273-1281.
- Maciel, M.J.M., Silva, A.C., Ribeiro, H.C.T. (2010): Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10.2225/vol13-issue6-fulltext-2.
- Maes, C., Delcour, A. (2002): Structural characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 35: 315-326.
- Mäkelä, M.R. (2009): The white-rot fungi *Phlebia radiata* and *Dichomitus squalens* in wood-based cultures: expression of laccases, lignin peroxidases, and oxalate decarboxylase. Academic dissertation. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finland.
- Malarczyk, E., Rdest, J.K., Wilkolazka, A.J. (2009): Influence of very low doses of mediators on fungal laccase activity - nonlinearity beyond imagination. *Nonlinear Biomedical Physics*, 3: 10.
- Mansur, M., Suarez, T., Gonzalez, A.E. (1998): Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environment Microbiology*, 64: 771-774.
- Mantovani, M.S., Bellini, M.F., Angeli, J.P., Oliveira, R.J., Silva, A.F., Ribeiro, L.R. (2008): Beta-glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Research*, 658: 154-161.
- Manubens, A., Avila, M., Canessa, P., Vicuna, R. (2003): Differential regulation of genes encoding manganese peroxidase (MnP) in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *Current Genetics*, 43: 433-438.
- Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Avila, M., Salas, L., Vicuña, R. (2007): Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEMS Microbiology Letters*, 275: 139-145.
- Martens, R., Wetzstein, H.G., Zadrazil, F., Capelari, M., Hoffmann, P., Schmeer, N. (1996): Degradation of fluoroquinolone Enrofloxacin by wood-rotting fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 4206-4209.
- Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F., Martínez, A.T. (1996): Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry*, 237: 424-432.
- Martínez-Iñogi, M.J., Gutierrez, A., Rio, J.C., Martínez, M.J., Martínez, A.T. (2001). Time course of fungal removal of lipophilic extractives from Eucalyptus globulus wood. *Journal of Biotechnology*, 84: 119-126.
- Martínez, A.T. (2002): Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 425-444.
- Martins, L.O., Soares, C.M., Pereira, M.M., Teixeira, M., Costa, T., Jones, G.H., Henriques, A.O. (2002): Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 18849-18859.

- Mau, J.L., Lin, H.S., Chen, C.C. (2002): Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6072-6077.
- Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J., Chen, C.C., (2004): Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculenta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia. *Food Chemistry*, 87: 111-118.
- Mayer, A.M. (1987): Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26: 11-20.
- Mayfield, M.B., Godfrey, B.J., Gold, M.H. (1994): Characterization of the *mnp2* gene encoding manganese peroxidase isozyme 2 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Gene*, 142: 231-235.
- McMichel, F.C.Jr., Dass, B.S., Grulke, E.A., Reddy, A.C.G. (1991): Role of manganese peroxidases and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2368-2375.
- Menendez, D., Shatz, M., Azzam, K., Garantzotis, S., Fessler, M.B., Resnick, M.A. (2011): The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLOS Genetics*. 7(3): e1001360. doi: 10.1371/journal.pgen.1001360.
- Menoli, R.C.R.N., Mantovani, M.S., Ribeiro, L.R., Speit, G., Jordão, B.Q. (2001): Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murrill extracts on V79 cells. *Mutation Research*, 496: 5-13.
- Merali, Z., Collins, S.R.A., Elliston, A., Wilson, D.R., Käsper, A., Waldron, K.W. (2015): Characterization of cell wall components of wheat bran following hydrothermal pretreatment and fractionation. *Biotechnology for Biofuels*, 8:23 DOI 10.1186/s13068-015-0207-1.
- Mester, T.A., Field, A.J. (1997): Optimization of manganese peroxidase production by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *FEMS Microbiology Letters*, 155: 161-168.
- Mester, T., Field, J.A. (1998): Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15412-15417.
- Mester, T., Tien, M. (2001): Engineering of a manganese-binding site in lignin peroxidase isozyme H8 from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 284: 723-728.
- Miki, Y., Ichinose, H., Wariishi, H. (2010): Molecular characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes cervina*: a novel fungal peroxidase. *FEMS Microbiology Letters*, 304: 39-46.
- Mikiashvili, N., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E. (2005): Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, 27: 955-959.
- Mikiashvili, N., Wasser, S.P., Nevo, E., Elisashvili, V. (2006): Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 999-1002.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407-412.

- Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S., Hah, Y.C. (2001): Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 392: 279-286.
- Ming, A. (1996): Chinese-English manual of common-used in traditional Chinese medicine. Publishing house of Guangdong Science & Technology, Guangdong, China.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N. (2002): Potential applications of laccase in the food industry. Trends in Food Science & Technology, 13: 205-216.
- Minussi, R.C., Gláucia, M.P., Durá, N. (2007): Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. Bioresource Technology, 98: 158-164.
- Mitchell, D.A., Krieger, N., Berović, M. (2006): Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation. New York, Springer-Verlag, p 447.
- Miyaji, C.K., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Cólus, I.M.S. (2004): Genotoxicity and antigenotoxicity assessment of shiitake (*Lentinula edodes* (Berkeley) Pegler) using the Comet assay. Genetics and Molecular Biology, 27: 108-114.
- Möller, C., Weber, G., Dreyfuss, M.M. (1996): Intraspecific diversity in the fungal species *Chaunopycnis alba*: Implications for microbial screening programs. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 17: 359-372.
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A. (2007): Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). International Immunopharmacology, 7: 701-724.
- Morales, P., Bermúdez, E., Sanz, B., Hernández, P.E. (1990): A study of the mutagenicity of some commercially canned Spanish mushrooms. Food and Chemical Toxicology, 28: 607-611.
- Moreira, M.T., Feijoo, G., Canaval, J., Lema, J.M. (2003): Semipilot-scale bleaching of Kraft pulp with manganese peroxide. Wood Science and Technology, 37: 117-123.
- Morgenstern, I., Robertson, D.L., Hibbett, D.S. (2010): Characterization of three *mnp* genes of *Fomitiporia mediterranea* and report of additional class II peroxidases in the order Hymenochaetales. Applied and Environment Microbiology, 76: 6431-6440.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I. (2007): "Blue,, laccases. Biochemistry (Moscow), 72: 1136-1412.
- Mossier, D.B., Fitapatrik, T.B., Hori, Y. (1993): Disorder of pigmentation. Dermatology in general medicine. 4th ed. (Eds. Fitapatrik, T.B. Eisen, A.Z. i Wolf, K.), McGrawHill, New York. pp. 949.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Holtzapple, M., Ladisch, M. (2005): Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, 96: 673-86.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, 65: 55-63.
- Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (1997): Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Current Microbiology, 34: 1-5.

- NCCLS. (1998): Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard M38-P. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Ng, T.B. (1998): A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). *General Pharmacology*, 30: 1-4.
- Nigam, P.S., Pandey, A. (2009): *Biotechnology for agro-industrial residues utilization: Utilization of agro-residues*. Springer Science & Business Media, Netherlands, p. 484.
- Nigam, P.S., Singh, A. (2011): Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37: 52-68.
- Niladevi, K.N., Prema, P. (2005): Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica*, 19:40-47.
- Niladevi, K.N. (2009): Ligninolytic enzymes, in: Nigam, P.S., Pandey, A. (Eds.), *Springer Science & Business Media*, Netherlands, pp. 398-414.
- Nousis, L., Doulias, P.T., Aligiannis, N., Bazios, D., Agalias, A., Galaris, D., Mitakou, S. (2005): DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 39: 787-795.
- Ohno, M., Abe, T. (1991): Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*, 145: 199-203.
- Okamoto, K., Nitta, Y., Maekawa, N., Yanase, H. (2011): Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 273-277.
- Oliveira, J.M., Jordão, B.Q., Ribeiro, L.R., Eira, A.F., Mantovani, M.S. (2002): Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 40: 1775-1780.
- Ooi, V.E., Liu, F. (2000): Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide–proteins complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7: 715-729.
- Orhan, I., Üstün, O. (2011): Determination of total phenol content, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition in selected mushrooms from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24: 386-390.
- Orhan, I.E., Senol, F.S., Ozturk, N., Akaydin, G., Sener, B. (2012): Profiling of *in vitro* neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. *Food Chemistry*, 132: 1360-1367.
- Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J., Miyazaki, T. (1994): Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a Basidiomycete *Agaricus blazei*, *Yakugaku-Zasshi*, 114: 342-350.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, M., Rostagno, M.A., Martínez, J.A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A. (2011): Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128: 674-678.

- Palmieri, G., Giardina, P., Marzullo, L., Desiderio, B., Nitti, G., Cannio, R., Sannia, G. (1993): Stability and activity of a phenol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 632-636.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sannia, G. (1997): A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 31301-31307.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G. (2000): Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environment Microbiology*, 66: 920-924.
- Palmieri, G., Bianco, C., Cennamo, G., Giardina, P., Marino, G., Monti, M., Sannia, G. (2001): Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2754-2759.
- Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G., Giardina, P. (2003): Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 220-230.
- Palonen, H., Viikari, L. (2004): Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and Bioengineering*, 86: 550-557.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999): Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science*, 77: 149-152.
- Pandey, A. (2003): Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- Panthapulakkal, S., Zereskian, A., Sain, M. (2006). Preparation and characterization of wheat straw fibers for reinforcing application in injection molded thermoplastic composites. *Bioresource Technology*, 97: 265-272.
- Papinutti, V.L., Diorio, L.A., Forchiassin, F. (2003): Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 157-160.
- Park, Y.K., Koo, M.H., Ikegaki, M., Contado, J.L. (1997): Comparison of the flavonoid aglycone content of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40: 97-106.
- Pasti, M.B., Pometto, III A.L., Nuti, M.P., Crawford, D.L. (1990): Lignin solubilizing ability of actinomycetes isolated from Termite (Termitidae) gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2213-2318.
- Patocka, J. (2012): Natural cholinesterase inhibitors from mushrooms. *Military Medical Science Letters*, 81: 40-44.
- Pauly, M., Keegstra, K. (2008): Cell wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 54: 559-568.
- Pazarlioglu, N.K., Sarijik, M., Telefoncu, A. (2005): Laccase: Production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, 40: 1673-1678.

- Perez-Boada, M., Ruiz-Dueñas, F.J., Pogni, R., Basosi, R., Choinowski, T., Martinez, M.J., Piontek, K., Martínez, A.T. (2005): Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of Molecular Biology*, 354: 385-402.
- Perie, F.H., Gold, M.H. (1991): Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environment Microbiology*, 57: 2240-2245.
- Petersen, J.F.W., Kadziola, A., Larsen, S. (1994): Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.6 Å resolution. *FEBS Letters*, 339: 291-296.
- Pezzella, C., Lettera, V., Piscitelli, A., Giardina, P., Sannia, G. (2012): Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 705-717.
- Phillips, R. (1981): Mushrooms and other fungi of Great Britain and Europe. Pan Books Ltd., London.
- Picman, A.K., Schneider, F.E., Picman, J. (1995): Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 23: 683-693.
- Pinto, P.A., Dias, A.A., Fraga, I., Marques, G., Rodrigues, M.A.M., Colaco, J., Sampaio, A., Bezerra, R.M.F. (2012): Influence of ligninolytic enzymes on straw saccharification during fungal pretreatment. *Bioresource Technology*, 111: 261-267.
- Piontek, K., Glumoff, T., Winterhalter, K. (1993): Low pH crystal structure of glycosylated lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.5 Å resolution. *FEBS Letters*, 315: 119-124.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., Faraco, V. (2011): Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12: 104-112.
- Pointing, S.B., Bucher, V.V.C., Vrijmoed, L.L.P. (2000): Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorization ability. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 199-205.
- Pokhrel, D., Viraraghavan, T. (2004): Treatment of pulp and paper mill wastewater – a review. *Science of Total Environment*, 333: 37-58.
- Pranitha, V., Krishna, G., Singara-Charya, M.A. (2014): Evaluation of antibacterial and antifungal activity of fruiting body extracts of *Trametes versicolor*. *Biolife*, 2: 1181-1184.
- Prasad, G.K., Gupta, R.K. (1997): Decolourization of pulp and paper mill effluent by two white-rot fungi. *Indian Journal of Environmental Health*, 39: 89-96.
- Prasher, I.B., Chauhan, R. (2015): Effect of carbon and nitrogen sources on the growth, reproduction and ligninolytic enzymes activity of *Dictyoarthrinium synnemeticum* Somrith. *Advances in Zoology and Botany*, 3: 24-30.
- Prochazkova, D., Bousova, I., Wilhelmova, N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82: 513-523.

- Puddu, P., Puddu, G.M., Cravero, E., Rosati, M., Muscari, A. (2008): The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press*, 17: 70-77.
- Purnomo, A.F., Kamei, I., Kondo, R. (2008): Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105: 614-621.
- Quik, M., Wonnacott, S. (2011): $\alpha 6\beta 2^*$ and $\alpha 4\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors as drug targets for Parkinson's disease. *Pharmacological Reviews*, 63: 938-966.
- Rai, S.N., Walli, T.K., Gupta, B.N. (1989): The chemical composition and nutritive value of rice straw after treatment with urea or *Coprinus fimetarius* in a solid state fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, 26: 81-92.
- Ramachandra, M., Pometto, A.L., Crawford, D.L. (1987): Extracellular enzyme activities during lignocelluloses degradation by *Streptomyces* spp: A comparative study of wild type and genetically manipulated strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2754-2760.
- Ramirez, D.A., Muñoz, S.V., Atehortua, L., Michel, Jr.F.C. (2010): Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresource Technology*, 101: 9213-9220.
- Ramos, J., Rojas, T., Navarro, F., Dávalos, F., Sanjuán, R.N., Rutiaga, J., Young, R.A. (2004): Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 52: 5057-5062.
- Rayner, A.D.M., Boddy, L. (1988): Fungal decomposition of wood: its biology and ecology. John Wiley, Chichester, UK.
- Reddy, C.A. (1993): An overview of the recent advances on the physiology and molecular biology of lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology*, 30: 91-107.
- Reddy, C.A., Mathew, Z. (2001): Bioremediation potential of white rot fungi. In: Gadd, G.M. (Eds.), Fungi in bioremediation. Cambridge University Press, Cambridge, pp 52-78.
- Reis, F.S., Barros, L., Martins, A., Ferreira, I.C.F.R. (2012): Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 191-197.
- Ren, G., Liu, X.Y., Zhu, H.K., Yang, S.Z., Fu, C.X. (2006): Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal polypore fungi from China. *Fitoterapia*, 77: 408-410.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20: 933-956.
- Riva, S. (2006): Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 219-226.
- Robertson, S.A., Mason, S.L., Hack, E., Abbott, G.D. (2008): A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. *Organic Geochemistry*, 39: 945-951.
- Rodríguez, S., Toca, J.L. (2006): Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513.

- Rodríguez, M.A.M., Pinto, P., Bezerra, R.M.F., Dias, A.A., Guedes, C.V.M., Cardoso, V.M.G., Cone, J.W., Ferreira, L.M.M., Colaço, J., Sequeira, C.A. (2008): Effect of enzyme extracts isolated from white-rot fungi on chemical composition and in vitro digestibility of wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*, 141: 326-38.
- Rodríguez, E., Ruiz-Dueñas, F.J., Kooistra, R., Ram, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2008): Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel3 encoded protein. *Journal of Biotechnology*, 134: 9-19.
- Rodríguez Couto, S., Sanromán, M.A., Gübitz, G.M. (2005): Influence of redox mediators and metal ions on synthetic acid dye decolorization by crude laccase from *Trametes hirsuta*. *Chemosphere* 58: 417-422.
- Rogalski, J., Lundell, T., Leonowicz, A., Htakka, A. (1991): Production of laccase, lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase by various strains of *Trametes versicolor* depending on culture conditions. *Acta Microbiologica Polonica*, 40: 221-234.
- Rogalski, J., Leonowicz, A. (1992): *Phlebia radiata* laccase forms induced by veratric acid and xylinine in relation to lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase. *Acta Biotechnologica*, 12: 213-221.
- Rogalski, J., Szczodrak, J., Janusz, G. (2006): Manganese peroxidase production in submerged cultures by free and immobilized mycelia of *Nematoloma frowardii*. *Bioresource Technology* 97: 469-476.
- Ronne, H. (1995): Glucose repression in fungi. *Trends in Genetics*, 11: 12-17.
- Rosa, L.E., Machado, K.M.G., Jacob, C.C., Capelari, M., Rosa, C.A., Zani, C.L. (2003): Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98: 967-974.
- Rothschild, N., Hadar, Y., Dosoretz, C. (1995): Ligninolytic system formation by *Phanerochaete chrysosporium* in air. *Applied and Environment Microbiology*, 61: 1833-1838.
- Roupas, P., Keogh, J., Noakes, M., Margetts, C., Taylor, P. (2012): The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*, 4: 687-709.
- Sakagami, H.K., Sugaya, A., Utsumi, S., Fujinaga, S., Sato, T., Takeda, M. (1993): Stimulation by PSK of interleukine-1 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Anticancer Research*, 13: 671-675.
- Salony, J.L., Garg, N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T.K., Bisaria, V.S. (2008): Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784: 259-268.
- Salvachúa, D., Prieto, A., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2011): Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technol.* 102, 7500-7506.
- Samson, R.A., Houbaken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C., Anderson, B. (2010): Food and indoor fungi. 1st ed. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Utrecht. Netherlands. 390 pp.

- Sánchez-Amat, A., Solano, F. (1997): A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine *Alteromonas* sp. shares catalytic capabilities of tyrosinases and laccases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 240: 787-792.
- Sánchez, C. (2009): Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27: 185-194.
- Sannia, G., Giardina, P., Luna, M., Rossi, M., Buonocore, V. (1986): Laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*, 8: 797-800.
- Sarath, G., Mitchel, R.B., Satler, S.E., Funnell, D., Pedersen, J.F., Graybosch, R.A., Vogel, K.P. (2008): Opportunities and roadblocks in utilizing orages and small grains for liquid fuels. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 343-354.
- Sarkanen, S., Razal, R.A., Piccariello, T., Yamamoto, E., Lewis, N.G. (1991): Lignin peroxidase: toward a clarification of its role *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 3636-3643.
- Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007): Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324.
- Sati, S.C., Bisht, S. (2006): Utilization of various carbon sources for the growth of waterborne conidial fungi. *Mycologia*, 98: 678-681.
- Scheel, T., Hofer, M., Ludwig, S., Holker, U. (2000): Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 686-691.
- Schlosser, D., Grey, R., Fritsche, W. (1997): Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation of glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 415-418.
- Schlosser, D., Fahr, K., Karl, W., Wetzstein, H.G. (2000): Hydroxylated metabolites of 2,4-dichlorophenol imply a Fenton-type reaction in *Gloeophyllum striatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2479-2483.
- Schmidt, B., Heimgartner, U., Kozulic, B., Leisola, M.S.A. (1990): Lignin peroxidases are oligomannose type glycoproteins. *Journal of Biotechnology*, 13: 223-228.
- Schmidt, O. (2006). *Wood and three fungi: biology, damage, protection and use*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 138-139.
- Schwarze, F.W.M.R. (2007): Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews*, 30: 1-38.
- Schweigert, N., Zehnder, A.J.B., Eggen, R.I.L. (2001): Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiology*, 3: 81-91.
- Segal, I.H. (1992): *Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*. Wiley-Interscience Publication, New York, USA.

- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K. (2006): Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 43: 152-159.
- Şenol, F.S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yilmaz, G., Şener, B. (2010): Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 120: 34-43.
- Shah, M.M., Barr, D.P., Chung, N., Aust, S.D. (1992): Use of the white rot fungi in the degradation of environmental chemicals. *Toxicology Letters*, 64: 493-501.
- Shah, V., Dobiášová, P., Baldrian, P., Nerud, F., Kumar, A., Seal, S. (2010): Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 178: 1141-1145.
- Sheikh, I.A., Vyas, D., Ganaie, M.A. Dehariya, K., Singh, V. (2014): HPLC Determination of phenolics and free radical scavenging activity of ethanolic extracts of two polypore mushrooms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6: 679-684.
- Shi, Y., James, A.E., Benzie, I.F.F., Buswell, J.A. (2002): Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 22: 103-111.
- Shi, Y., James, A.E., Benzie, I.F.F., Buswell, J.A. (2004): Genoprotective activity of edible and medicinal mushroom components. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 6: 1-14.
- Shrivastava, B., Nandal, P., Sharma, A., Jain, K.K., Khasa, Y.P., Das, T.K., Mani, V., Kewalramani, N.J., Kundu, S.S., Kuhad, R.C. (2012): Solid state bioconversion of wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp. rckk02. *Bioresource Technology*, 107: 347-351.
- Silva, R.N. (2013): Regulation of plant cell wall degrading enzymes formation in filamentous fungi. In: Polizeli, M.D.L.T.M., Rai, M. *Fungal enzymes*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC. p. 194.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- Singh, A.P., Singh, T. (2014): Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass & Bioenergy*, 62: 198-206.
- Singhal, V., Rathore, V.S. (2001): Effects of Zn²⁺ and Cu²⁺ on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *Phanerocheate chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 235-240.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sivaprakasam, E., Kavitha, D., Balakumar, R., Sridhar, S., Kumar, J.S. (2011): Antimicrobial activity of whole fruiting bodies of *Trametes hirsute* (Wulf.Fr.) Pil. against some common pathogenic bacteria and fungus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3: 219-221.

- Smith, N., Shnyreva, A., Wood, D.A., Thurston, C.S. (1998): Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 144: 1063-1069.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E., Hadar, Y. (2006): Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology Letters*, 28: 1425-1429.
- Souza, S.C.M.M., Melo, I.S., Oliveira, P.R. (2005): Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 324-329.
- Souza, N.A.B., Lima, E.D.O., Guedes, D.N., Pereira, F.D.O., Souza, E.L.D., Sousa, F.B.D. (2010): Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46: 499-508.
- Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J. (2006a) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases activity by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 65-73.
- Stajić, M., Persky, L., Hadar, Y., Friesem, D., Duletić-Laušević, S., Wasser, S.P., Nevo, E. (2006b): Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128: 87-96.
- Stajić, M., Kukavica, B., Vukojević, J., Simonić, J., Veljović-Jovanović, S., Duletić-Laušević, S. (2010): Wheat straw conversion by enzymatic system of *Ganoderma lucidum*. *Bioresources*, 5: 2362-2373.
- Stajić, M., Vukojević, J., Knežević, A., Milovanović, I. (2013a): Influence of trace elements on ligninolytic enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius*. *Bioresources*, 8: 3027-3037.
- Stajić, M., Vukojević, J., Knežević, A., Duletić Laušević, S., Milovanović, I. (2013b): Antioxidant protective effects of mushroom metabolites. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13: 2660-2676.
- Stamets, P. (2002): Novel antimicrobials from mushrooms. *Herbal Gram*, 54: 2-6.
- Standish, L.J., Wenner, C.A., Sweet, E.S., Bridge, C., Nelson, A., Martzen, M., Novack, J. Torkelson, C. (2008): *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 6: 122-128.
- Staszczak, M. (2002): Proteasomal degradation pathways in *Trametes versicolor* and *Phlebia radiata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 537-541.
- Staszczak, M., Jarosz-Wilkolazka, A. (2005): Inhibition of the proteasome strongly affects cadmium stimulated laccase activity in *Trametes versicolor*. *Biochimie*, 87: 755-762.
- Staszczak, M. (2007): The 26S proteasome of the lignin-degrading Basidiomycete *Phlebia radiata*. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 347-353.
- Staszczak, M. (2008): The role of the ubiquitin-proteasome system in the response of the ligninolytic fungus *Trametes versicolor* to nitrogen deprivation. *Fungal Genetics and Biology*, 45: 328-337.

- Sterner, O., Bergman, R., Kihlberg, E., Magnusson, G., Nilsson, L., Wickberg, B., Zimerson, E. (1982a): Mutagens in larger fungi. I. 48 species screened for mutagenic activity in the Salmonella/microsome assay. *Mutation Research*, 101: 269-281.
- Sterner, O., Bergman, R., Frenzen, C., Kesler, E., Nilsson, L. (1982b): Mutagens in larger fungi. II. The mutagenicity of commercial pickled *Lactarius necator* in the *Salmonella* assay. *Mutation Research*, 104: 233-237.
- Stevenson, L., Phillips, F., Walton, J. (2012): Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63: 1001-1013.
- Strauss, J., Horvath, H.K., Abdallah, B.M., Kindermann, J., Mach, R.L., Kubicek, C.P. (1999): The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Molecular Microbiology*, 32: 169-178.
- Strebotnik, E., Hammel, K.E. (2000): Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*, 81: 179-188.
- Suay, I., Arenal, F., Asensio, F.J., Basilio, A., Cabello, M.A., Diez, M.T., Garcia, J.B., Val, A.G., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Peláez, F., Vicente, M.F. (2000): Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78: 129-139.
- Subramaniam, R., Vimala, R. (2012): Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3: 480-486.
- Sun, R.C., Sun, X.F. (2001): Identification and quantitation of lipophilic extractives from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 14: 51-64.
- Suto, M., Tomita, F. (2001): Induction and catabolite repression mechanisms of cellulose in fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 305-311.
- Suzuki, T., Endo, K., Ito, M., Tsujibo, H., Miyamoto, K., Inamori, Y.A. (2003): Thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, characterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67: 2167-2175.
- Tabka, M.G., Herpoel-Gimbert, I., Monod, F., Asther, M., Sigoillot, J.C. (2006): Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 897-902.
- Takeuchi, T., Iinuma, H., Iwanaga, J., Takahashi, S., Takita, T., Umezawa, H. (1969): Coriolin, a new basidiomycetes antibiotic. *Journal of Antibiotics*, 22: 215-217.
- Teles, A.P.C., Takahashi, J.A. (2013): Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbial Research*, 168: 204-210.
- Tello, M., Corsini, G., Larrondo, L.F., Salas, L., Lobos, S., Vicuna, R. (2000): Characterization of three new manganese peroxidase genes from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1490: 137-144.

- Teoh, Y.P., Mashitah, M.D. (2012): Screening of antifungal activities from genera *Trametes* against growth of selected wood-degrading fungi from Malaysia. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6: 79-85.
- Terry, R.D., Masliah, E. (1991): Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30: 572-580.
- Thiele, D.J. (1992): Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 20: 1183-1191.
- Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013): Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81: 146-161.
- Thurston, C.F. (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26.
- Tien, M., Kirk, T.K. (1983): Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221: 661-663.
- Tien, M., Kirk, T.K. (1984): Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 81(8): 2280-2284.
- Tigini, V., Prigione, V., Di Toro, S., Fava, F., Varese, G.C. (2009): Isolation and characterization of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microbial Cell Factories* 8: 5.
- Toi, M., Hattori, T., Akagi, M., Inokuchi, K., Orita, K., Sugimachi, K., Dohi, K., Nomura, Y., Monden, Y., Hamada, Y. (1992): Randomized adjuvant trial to evaluate the addition of tamoxifen and Krestin (PSK)TM to chemotherapy in patients with primary breast cancer. 5-Year results from the Nishi-Nippon Group of the Adjuvant Chemoendocrine Therapy for Breast Cancer Organization. *Cancer*, 70: 2475-2483.
- Tomšovský, M., Kolařík, M., Paňoutová, S., Homolka, L. (2006). Molecular phylogeny of European *Trametes* (Basidiomycetes, Polyporales) species based on LSU and ITS (nrDNA) sequences. *Nova Hedwigia*, 82: 269-280.
- Trudel, P., Courchesne, D., Roy, C., Chartrand, P. (1988): Cloning of *Trametes versicolor* genes induced by nitrogen starvation. *Applied and Environmental microbiology*, 54: 1550-1556.
- Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwonchugi, K.J. (1999): A Developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology*, 181: 6469-6477.
- Tuomela, M., Hatakka, A., 2011. Oxidative fungal enzymes for bioremediation. In: Moo-Young, M., Agathos, S. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, Spain, pp. 183-196.
- Urzua, U., Fernando-Larrondo, L., Lobos, S., Larrain, J., Vicuna, R. (1995): Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEBS Letters*, 371: 132-136.

- Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., Asther, M., Record, E., Lomascolo, A. (2010): High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white biotechnology: from gene cloning to enzyme characterization and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 2199-2213.
- Valderrama, B., Oliver, P., Medrano-Soto, A., Vazquez-Duhalt, R. (2003): Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84: 289-299.
- Valentine, J., Clifton-Brown, J., Hastings, A., Robson, P., Allison, G., Smith, P. (2012): Food vs. fuel: the use of land for lignocellulosic 'next generation' energy crops that minimize competition with primary food production. *GCB Bioenergy*, 4: 1-19.
- Van Griensven, L.J.L.D., Wei, S. (2008): Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10: 315-324.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991): Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- Vandamme, E.J. (2009): Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products, in: Nigam, P.S., Pandey, A. (Ed.), Springer Science & Business Media, Netherlands, pp. 3-60.
- Varela, E., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J. (2001): Expression of *Pleurotus eryngii* aryl-alcohol oxidase in *Aspergillus nidulans*: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546: 107-113.
- Vicuña, R. (1988): Bacterial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 646-655.
- Vidossich, P., Alfonso-Prieto, M., Carpena, X., Fita, I., Loewen, P., Rovira, C. (2010): The dynamic role of distal side residues in heme hydroperoxidase catalysis. Interplay between X-ray crystallography and ab initio MD simulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500: 37-44.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gomez, S.J., Díaz-Godínez, G., Augur, C. (2003): Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 157-167.
- Vukojević, J., Hadžić, I. (2013): Atlas gljiva i internacionalni rečnik narodnih imena gljiva. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet. Alta Nova, Beograd.
- Wariishi, H., Akileswaran, L., Gold, H.M. (1988): Manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: spectral characterization of the oxidized states and catalytic cycle. *Biochemistry*, 27: 5364-5370.
- Wan, J.M.F. (2006): Polysaccharide Krestin (PSK) and Polysaccharopeptide PSP, U: Kastin, A.J. (Eds.), Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press, Elsevier Inc. pp. 180-183.
- Wan, C., Li, Y. (2010): Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispota* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, 47: 31-36.
- Wan, C., Li, Y. (2012): Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30: 1447-1457.

- Wang, D., Sakoda, A., Suzuki, M. (2001): Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology*, 78: 293-300.
- Wang, P., Hu, X., Cook, S., Begonia, M., Lee, K.S., Hwang, H.M. (2008): Effect of culture conditions on the production of ligninolytic enzymes by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 20696) and separation of its lignin peroxidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 2205-2212.
- Wang, F., Guo, C., Wei, T., Zhang, T., Liu, C.Z. (2012): Heat shock treatment improves *Trametes versicolor* laccase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168: 256-265.
- Wasser, S.P., Weis, A.L. (1999): Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current Perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 47-50.
- Wasser, S.P. (2010): Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12: 1-16.
- Wawrzyn, G.T., Bloch, S.E., Schmidt-Dannert, C. (2012): Discovery and Characterization of Terpenoid Biosynthetic Pathways of Fungi. U: *Methods in Enzymology*, Vol. 515., (Eds.), Hopwood, D.A., Academic Press.
- Wheeler, M.H., Bell A.A. (1988): Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: McGinnis, M. R. (Eds.), *Current topics in medical mycology*, 338–387. Springer-Verlag, New York.
- Wu, B., Ohlendorf, B., Oesker, V., Wiese, J., Malien, S., Schmaljohann, R., Imhoff, J.F. (2015): Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. strain LF458. *Marine Biotechnology*, 17: 110-119.
- Xavier, R.B., Maria, A., Tavares Mora, A.P., Ferreira, R., Amado, F. (2007): *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 444-451.
- Xu, F. (1999): Laccase. U: Flickinger, M.C., Drew, S.W. (Eds.), *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, pp. 1545-1554.
- Yague, S., Terron, M.C., Gonzalez, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C., Gonzalez, A.E. (2000): Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14: 905-910.
- Yahaya, Y.A., Don, M.M. (2012): Evaluation of *Trametes lactinea* extracts on the inhibition of hyaluronidase, lipoxigenase and xanthine oxidase activities *in vitro*. *Journal of Physical Science*, 23: 1-15.
- Yamaç, M., Bilgili, F. (2006): Antimicrobial activities of Fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, 44: 660-667.
- Yang, Q.Y., Hu, Y.J., Li, X.Y., Yang, S.X., Liu, J.X., Liu, T.F., Xu, G.M., Liao, M.L. (1993): A new biological response modifier substance - PSP, U: Yang, Q.Y., Kwok, C.Y. (Eds.), *Proceedings of PSP International Symposium*. Fudan University Press, Shanghai, China, pp. 247-259.

- Yang, Q.Y. (1997): Yun Zhi polysaccharopeptide (PSP) and the general aspects of its research. *Fungal Science*, 12: 1-8.
- Yang, J.S., Liu, W., Ni, J.R. (2006): Isolation, identification of lignin-degrading bacteria and purification of lignin peroxidase. *Huanjing Kexue/Chinese Journal of Environmental Science*, 27: 981-985.
- Yang, B., Wyman, C.E. (2008): Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 2: 26-40.
- Yang, B., Dai, Z., Ding, S.Y., Wyman, C.E. (2011): Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2: 421-450.
- Yokoe, T., Iino, Y., Takei, H., Horiguchi, J., Koibuchi, Y., Maemura, M., Ohwada, S., Morishita, Y. (1997): HLA antigen as predictive index for the outcome of breast cancer patients with adjuvant immunochemotherapy with PSK. *Anticancer Research*, 17: 2815-2818.
- Yoshida, H. (1883): Chemistry of lacquer (Urushi), Part 1. *Journal of the Chemical Society*, 43: 472-486.
- Zafar, S.I., Abdullah, N., Iqbal, M., Sheeraz, Q. (1996): Influence of nutrient amendment on the biodegradation of wheat straw during solid state fermentation with *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 38: 83-87.
- Zaidman, B.Z., Yassin, M., Mahajna, J., Wasser, S.P. (2005): Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 453-468.
- Zapata-Castillo, P., Villalonga-Santana, M.L., Tamayo-Cortés, J., Rivera-Muñoz, G., Solís-Pereira, S. (2012): Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology*, 11: 3603-3611.
- Zechendorf, B. (1999): Sustainable development: how can biotechnology contribute? *Feature*, 17: 219-225.
- Zhang, Y.H.P. (2008): Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 367-375.
- Zhang, S., Jiang, M., Zhou, Z., Zhao, M., Li, Y. (2012): Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by *Phanerochaete chrysosporium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75: 89-95.
- Zhang, S.S., Ma, Q.Y., Huang, S.Z., Dai, H.F., Guo, Z.K., Yu, Z.F., Zhao, Y.X. (2015): Lanostanoids with acetylcholinesterase inhibitory activity from the mushroom *Haddowia longipes*. *Phytochemistry*, 110: 133-139.
- Zjawiony, J.K. (2004): Biologically Active Compounds from Aphyllophorales (Polypore) Fungi. *Journal of Natural Products*, 67: 300-310.
- Zong, A., Cao, H., Wang, F. (2012): Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90: 1395-1410.
- Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimitz, M., Berger, R.G. (2003): A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -Carotene to flavor compounds. *Biological Chemistry*, 384: 1049-1056.

Ukupno 515 literaturnih navoda.

BIOGRAFIJA

Aleksandar Knežević je rođen 14. 08. 1981. godine u Nišu gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000. godine, smer Biologija, a diplomirao je septembra 2009. godine sa prosečnom ocenom 8,79.

Doktorske studije je upisao 2009. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Eksperimentalna mikologija. Od januara 2011. godine angažovan je na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom: „Karakterizacija i primena metabolite gljiva i utvrđivanje potencijala novih biofungicida“ (ON173032). Od 2011. godine je zaposlen kao istraživač-pripravnik na Katedri za algologiju, mikologiju i lihenologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a 2012. je izabran u zvanje istraživača saradnika.

Dosadašnji naučno-istraživački rad Aleksandra Kneževića je iz oblasti mikologije. Objavio je 12 naučnih radova u časopisima međunarodnog značaja i dva u vodećem časopisu nacionalnog značaja i učestvovao sa 21 saopštenjem na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima, što ukupno čini 33 bibliografske jedinice. Član je Srpskog biološkog društva, Mikološkog društva Srbije i Srpskog društva za zaštitu voda.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Александар Кнежевић

број индекса Б3803/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Лигнинолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes* Fr.“

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: **Александар Кнежевић**

Број индекса: **Б3803/2009**

Студијски програм: **Експериментална микологија**

Наслов рада: „**Лигнинолитички потенцијал и медицинска својства екстракта
врста рода *Trametes* Fr.**“

Ментори: проф. др Мирјана Стајић и проф. др Јелена Вукојевић

Потписани **Александар Кнежевић**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Лигнинолитички потенцијал и медицинска својства екстракта врста рода *Trametes Fr.* која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

☒ 2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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 прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.